

Phylogenetic analysis of coccidia (Apicomplexa: Eimeriorina) in the belica *Leucaspilus delineatus* (Heckel, 1843)

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

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

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

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

ABSTRACT. This study was aimed to carry out a comparative analysis and reconstruction of the phylogenetic position of coccidia from the intestine of the belica *Leucaspilus delineatus* (Heckel, 1843) from the Irkutsk Reservoir. Determination and comparative analysis of the nucleotide sequences of the *cox1* gene fragment, obtained and available in genetic databases, demonstrated paraphilia of the genera *Eimeria* and *Goussia*. The sequences in the phylogenetic tree formed a distinct cluster at the base of the tree. Thus, the hypothesis that fish coccidia were ancestors of coccidia of other vertebrates was indirectly confirmed. The need for additional research and revision of coccidia in fishes from the Angara River and Lake Baikal is discussed.

Keywords: Eimeriorina, *Leucaspilus delineatus*, gene *cox1*, Irkutsk Reservoir, Baikal Region

1. Introduction

The efforts of human economic activities aimed at altering and regulating of natural watercourses, recreational developing of the coastal zone and aquaculture growth have increased significantly over the past 100 years. The side effect of this process has been the expansion outside of natural habitats and introduction of various hydrobiont species (Băncilă et al., 2022; Bernery et al., 2022; Zhu et al., 2022; Truter et al., 2023).

In addition to the obvious consequences of interactions between native fauna and invasive species (competition and predation; genetic influences, hybridization and introgression), there is a threat of introducing associated parasites and other pathogens (Ellender and Weyl, 2014; Truter et al., 2023). Significant epizootics have been described in populations of various fish species caused by viruses, imported with aquacultural species, oomycetes, and protozoa (Kaminskas, 2021). For example, a significant damage to the ichthyofauna of Europe and America was caused by *Sphaerothecum destruens* Arkush, Mendoza, Adkison & Hedrick, 2003 – an intracellular parasite of the stone moroco *Pseudorasbora parva* (Temminck

& Schlegel, 1846) introduced from China (Andreou et al., 2012). In this regard, molecular genetic studies are particularly in demand when describing the distribution of invasive fish species as well as their parasites (Ali et al., 2022; Alyamkin et al., 2022; Dos Santos and Avenant-Oldewage, 2022).

All representatives of the protists of Sporozoa or Apicomplexa, belonging to the group Alveolata, are unicellular obligate parasites of multicellular animals and are also considered one of the most successful parasites in the world (Morrison, 2009). More than 6000 species described are thought to represent only 0.1% of their total diversity (Morrison, 2009). Representatives of Apicomplexa, which belong to the genera *Cryptosporidium*, *Plasmodium*, *Toxoplasma*, and *Babesia*, are pathogens of humans and animals. In addition, coccidia cause significant damage to agricultural production (Conoidasida: Eimeriorina). However, despite their widespread distribution and economic importance, research on the evolutionary relationships within this group is in its infancy (Arisue and Hashimoto, 2015; Xavier et al., 2018). The taxonomy of coccidia is in the developmental stage, and many genera are paraphyletic that call into question the value of strict morphological and ecological characters

*Corresponding author.

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

Received: July 03, 2023; Accepted: July 26, 2023;

Available online: August 15, 2023

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



for parasite classification (Ogedengbe et al., 2018; Xavier et al., 2018). Moreover, representatives of the suborder Eimeriorina have been much less studied in aquatic animals than in terrestrial animals. However, even the poor data available for the small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) sequences suggest that these are the basic groups within the families (Jirků et al., 2009; Xavier et al., 2018).

The belica *Leucaspius delineatus* (Heckel, 1843), which historically was a representative of the Ponto-Caspian ichthyofauna, has significantly expanded its habitat through accidental introduction and further self-distribution (Slynko and Tereschenko, 2014; Reshetnikov et al., 2017). Molecular genetic studies of the belica from the Irkutsk Reservoir confirmed the information about accidental introduction of the species from the European part of Russia (Kulakova et al., 2022). Representatives of coccidia have been found in the native habitat of the belica (Jastrzębski, 1984; Belova and Krylov, 2006; Pugachev et al., 2012). There are few data on parasite fauna of the belica from the Irkutsk Reservoir (Denikina et al., 2023). Therefore, the study was aimed to carry out a comparative analysis and reconstruction of the phylogenetic position of coccidia from the intestine of the belica.

2. Materials and methods

The capture site 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 with hooked gear in July and August 2019. Fish were euthanized with an overdose of anesthetic (GOST 33219-2014, 2016) using a 2% lidocaine solution (Lidocaine Bufus, Renewal, Russia). A total of 20 adults 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 (Kulakova et al., 2022; Denikina et al., 2023).

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 using an AmpliSense DNA-sorb-AM extraction kit (Russia). A fragment of the cytochrome c oxidase (*cox1*) subunit 1 gene was amplified with MiSeq primers: COIintF 5'ctgctggcagcgtcagatgtg-tataagagacagGGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC and dgHCO2198 5'gtctcgtgggctcggagatgtgataagagacagTAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA (Leray et al., 2013). A library from the purified amplicon pool was constructed using the Nextera XT kit (Illumina, Hayward, CA, USA), and nucleotide sequences were determined with Illumina NextSeq. After bioinformatic processing, the resulting overlapping paired reads (contigs) were filtered according to the quality of the reads and their length. The data obtained were deposited into the NCBI international database with the bioproject registration number PRJNA648490 (Denikina et al., 2023).

Primary processing and translation of the nucleotide sequences obtained and data on representatives of the suborder Eimeriorina in the

GenBank database (Table) were performed using the BioEdit program and aligned with the ClustalW software. Phylogenetic analysis was performed using MEGA7 software (Kumar et al., 2016).

The evolutionary history based on nucleotide sequences was inferred with the Maximum Likelihood Estimation (MLE) method using the Tamura-Nei model (Tamura and Nei, 1993). The evolutionary history based on amino-acid sequences was derived with the Le-Gascuel method (Nei and Kumar, 2000; Le and Gascuel, 2008). In both cases, the discrete gamma distribution was applied to model differences in evolutionary rates among sites. Statistical support for branch nodes was assessed using bootstrap analysis, 2000 replicates.

3. Results and discussion

Analysis of metagenomic DNA sequencing data from the intestine of the belica resulted in the determination of coccidia sequences. Eimeriorina accounted for more than 6.4% of the total pool of sequences obtained. Polymorphism of the parasite population was detected: there were 9 genotypes, with 99% of the sequences belonged to four (76.14; 10.65; 7.95 and 4.3%). The genotypes differ from each other by point mutations, only three sites resulted in amino acid replacements with similar charge and radical (V to I). The results obtained do not allow a clear conclusion about the abundance of Eimeriorina species in the analyzed material and require further research.

Fish coccidia are relatively understudied and nucleotide data for them are extremely scarce (at best, SSU rRNA genes have been identified). This fact is due to the lack of taxon-specific conserved regions in the SSU rRNA gene, which makes direct molecular genetic diagnosis of Eimeriorina more difficult. The *cox1* mtDNA gene sequences of fish coccidia are not available in the GenBank database. Sequences of Eimeriorina representatives of birds, rodents, primates, marsupials, and reptiles were used in the analysis; the *cox1* mtDNA gene sequence of *Toxoplasma gondii* was presented as an out-group (Table, Fig. 1).

In the dendrogram, the nucleotide sequences of coccidian of the belica formed a distinct cluster Eimeriorina* located at the base of the tree (Fig. 1). In this case, the tree is not resolved, and the support of the major branches is extremely low (from 0%). The phylogenetic reconstruction based on the analysis of the corresponding amino acid sequences (Fig. 2) is much more reliable: the Eimeriorina* cluster is formed with a more significant support (85%). The branching within the coccidia cluster from terrestrial vertebrates is weakly and unreliably supported, as in the case of the nucleotide sequences (Fig. 2).

On the one hand, this fact is evidence of a significant gap in our knowledge of the mitochondrial genomes of these parasites because the *cox1* mtDNA gene sequences of fish coccidia are not available in the GenBank database. Moreover, there is no correlation of branching order with genus affiliation, and a very relative affiliation with a host in the phylogenetic tree constructed on the basis of SSU rRNA gene sequences

Table. Characterization of the nucleotide sequences of the *cox1* gene of the representatives of the suborder Eimeriorina from the GenBank database.

Species	Host	Location of sampling site	No. GenBank
<i>Caryospora bigenetica</i> Wacha and Christensen, 1982	<i>Sistrurus catenatus</i> (Say, 1823)	USA	KF859856
<i>Cyclospora cayetanensis</i> Ortega, Gilman & Sterling, 1994	<i>Homo sapiens</i> Linnaeus, 1758	USA	MN260359; MN260361; MN260362; MN260363; MN260364; MN260366; MN316534; MN316535
<i>Eimeria acervulina</i> Tyzzer, 1929	<i>Gallus gallus</i> (Linnaeus, 1758)	PRC	EF158855
<i>Eimeria anseris</i> (Kotlan, 1932)	<i>Anser albifrons</i> (Scopoli, 1769)	PRC	MH758793
<i>Eimeria brunetti</i> Levine, 1942	<i>G. gallus</i>	Canada	HM771675
<i>Eimeria falciformis</i> (Eimer, 1870)	<i>Mus musculus</i> Linnaeus, 1758	Germany	MH777557
<i>Eimeria flavescens</i> Marotel & Guillhon, 1941	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Linnaeus, 1758)	PRC	KP025693
<i>Eimeria furonis</i> Hoare, 1927	<i>Mustela putorius</i> Linnaeus, 1758	Canada	MF774035
<i>Eimeria gaimardi</i> Barker, O'Callaghan, and Beveridge, 1988	<i>Bettongia gaimardi</i> (Desmarest, 1822)	Australia	MK202809
<i>Eimeria maxima</i> Tyzzer, 1929	<i>G. gallus</i>	USA	FJ236459
<i>Eimeria meleagridis</i> Tyzzer 1929	<i>Meleagris gallopavo</i> Linnaeus, 1758	Canada	KJ526131
<i>Eimeria mephitidis</i> Andrews 1928	<i>Mephitis mephitis</i> (Schreber, 1776)	Canada	KT203398
<i>Eimeria mitis</i> Tyzzer, 1929	<i>G. gallus</i>	Czech Republic	FR796699
<i>Eimeria mundayi</i> Barker, O'Callaghan, and Beveridge, 1988	<i>Potorous tridactylus</i> (Kerr, 1792)	Australia	MK202808
<i>Eimeria necatrix</i> Johnson, 1930	<i>G. gallus</i>	Canada	HM771680
<i>Eimeria papillata</i> Ernst, Chobotar, & Hammond, 1971	<i>M. musculus</i>	Canada	KT184377
<i>Eimeria piriformis</i> Kotlan & Pospesch, 1934	<i>O. cuniculus</i>	Czech Republic	JQ993698
<i>Eimeria potoroi</i> Barker, O'Callaghan, and Beveridge, 1988	<i>P. tridactylus</i>	Australia	MK202807
<i>Eimeria praecox</i> Johnson, 1930	<i>G. gallus</i>	Canada	JQ659301
<i>Eimeria tenella</i> (Railliet & Lucet, 1891) Fantham, 1909	<i>G. gallus</i>	Sudan	MF497440
<i>Eimeria subspherica</i> Christensen, 1941	<i>Bos taurus</i> Linnaeus, 1758	Turkey	KU351704
<i>Eimeria trichosuri</i> O'Callaghan & O'Donoghue, 2001	<i>Trichosurus caninus</i> (Ogilby, 1835)	Australia	JN192136
<i>Eimeria vermiformis</i> Ernst, Chobotar and Hammond, 1971	<i>Apodemus flavicollis</i> (Melchior, 1834)	Germany	MK257110
<i>Eimeria woyliei</i> Northover et al., 2019	<i>Bettongia anhydra</i> Finlayson, 1957	Australia	MK202806
<i>Eimeria zuernii</i> (Rivolta, 1878) Martin, 1909	<i>B. taurus</i>	Canada, PRC, Australia	HM771687; KX495130; OL770312
<i>Eimeria</i> sp.	<i>Coturnix coturnix</i> (Linnaeus, 1758)	Egypt	MF496271

Species	Host	Location of sampling site	No. GenBank
<i>Eimeria</i> sp. 1	<i>Tiliqua rugosa</i> subsp. <i>rugosa</i> Gray, 1825	Australia	JX839284
<i>Isoospora amphiboluri</i> Cannon, 1967	<i>Ctenophorus nuchalis</i> (De Vis, 1884)	Australia	KR108297; MW720599
<i>Isoospora butcheriae</i> Yang, Brice, Jian & Ryan, 2018	<i>Zosterops lateralis</i> (Latham, 1802)	Australia	KY801687
<i>Isoospora coerebae</i> Berto et al., 2011	<i>Coereba flaveola</i> (Linnaeus, 1758)	Brazil	OK194672
<i>Isoospora coronoidae</i> Liu et al., 2019	<i>Corvus coronoides</i> Vigors & Horsfield, 1827	Australia	MK867778
<i>Isoospora greineri</i> Hafeez et al. 2014	<i>Lamprolornis superbus</i> Rüppell, 1845	Canada	KR108298
<i>Isoospora gryphoni</i> Olson, Gissing, Barta & Middleton, 1998	<i>Carduelis tristis</i> (Linnaeus, 1758)	Canada	KC346355
<i>Isoospora lacazei</i> (Labbé, 1893)	<i>Pavo cristatus</i> Linnaeus, 1758	PRC	MW775672
<i>Isoospora manorinae</i> Yang, Brice, Jian & Ryan 2016	<i>Manorina flavigula</i> subsp. <i>wayensis</i> (Mathews, 1912)	Australia	KT224377
<i>Isoospora mayuri</i> Patnaik, 1966	<i>P. cristatus</i>	PRC	MW775673
<i>Isoospora phylidonyrisae</i> Yang, Brice, Berto & Ryan, 2021	<i>Phylidonyris novaehollandiae</i> (Latham, 1790)	Australia	MW423631
<i>Isoospora picoflavae</i> Rejman, Hak-Kovacs & Barta, 2021	<i>Colaptes auratus</i> subsp. <i>luteus</i> Bangs, 1898	Canada	NC_065382
<i>Isoospora serini</i> (Aragao, 1933)	<i>Serinus canaria</i> (Linnaeus, 1758)	Brazil	ON584773
<i>Isoospora serinuse</i> Yang, Brice, Elliot & Ryan 2015	<i>S. canaria</i>	Australia	KX276860
<i>Isoospora superbusi</i> Hafeez et al. 2014	<i>Lamprolornis superbus</i> Rüppell, 1845	Canada	KT203396
<i>Isoospora svecica</i> Trefancová & Kvičeroová, 2019	<i>Luscinia svecica</i> subsp. <i>cyanecula</i> (Wolf, 1810)	Czech Republic	MK573841
<i>Isoospora</i> sp.	<i>Sturnus vulgaris</i> Linnaeus, 1758	USA	OL999169
<i>Isoospora</i> sp. 1	<i>S. canaria</i>	Canada	KP658103
<i>Isoospora</i> sp. 2	<i>M. gallopavo</i>	Canada	KC346356
<i>Isoospora</i> sp. 3	<i>S. vulgaris</i>	USA	OL999161
<i>Isoospora</i> sp. 4	<i>Carduelis carduelis</i> (Linnaeus, 1758)	Great Britain	OL999140
<i>Lanksterella minima</i> (Chaussat, 1850) Nöller, 1912	<i>Lithobates clamitans</i> (Latreille, 1801)	Canada	KT184381
<i>Toxoplasma gondii</i> (Nicolle & Manceaux, 1908)	Strain ME49, Center for tropical and emerging global diseases, University of Georgia, USA		MN077082

(Molnár et al., 2012; Couso-Pérez et al., 2019; Liu et al., 2021). On the other hand, it was previously hypothesized that it was the fish coccidia that gave rise to all known coccidia lineages in other vertebrates (Rosenthal et al., 2016; Xavier et al., 2018). Perhaps, our results are an indirect confirmation of this hypothesis, and the Eimeriorina* cluster (Figs. 1, 2) will be replenished when new nucleotide data on mitochondrial genomes of fish coccidia appear.

The obvious paraphilia of the genera *Eimeria* and *Goussia*, which was discussed many times and proven previously (Jirků et al., 2009; Ogedengbe et al., 2018; Xavier et al., 2018), is also reflected in our dendrograms. Undoubtedly, a revision of the

main phenotypic characteristics, which determine the taxonomic affiliation of coccidia, is required.

Eimeria cyprinorum Stankovich, 1921 (Syn.: *Goussia carpelli* (Léger et Stankovich, 1921), *Goussia carpelli* (Léger et Stankovich, 1921) (Syn.: *Eimeria carpelli* Léger et Stankovich, 1921; *E. cyprini* Plehn, 1924; *E. cyprinorum* Stankovich, 1921; *E. wierzejskii* Hoer, 1904) and *Eimeria* sp. (Jastrzębski, 1984; Kirjušina and Vismans, 2007; Belova and Krylov, 2006; Pugachev et al., 2012) were found in the belica in the native habitat (water bodies and watercourses of the Ponto-Caspian basin as well as the Baltic Sea basin).

Earlier, *G. carpelli* was found in several species (Pugachev et al., 2012), including Lake Baikal hornbill

fish: bighead sculpin *Batrachocottus baicalensis* (Dybowski, 1874), sand sculpin *Leocottus kesslerii* (Dybowski, 1874), and deepwater sculpin *Cyphocottus eurystomus* (Taliev, 1955) (Schulman and Zaika, 1964; Zaika, 1965). The spectrum of parasitic species of the common belica in a given water body depends on the conditions of the host habitat 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 thousand hectares, and almost 25% of it is accounted for by bays and shallow waters. The bighead sculpin can be found in the upper and middle areas of the Irkutsk Reservoir in stony-silty soils. The sand sculpin is spread in the Angara River from the source to the mouth; the highest abundance is found in the coastal zone of the reservoir with sandy, silty-sandy, and stony-sandy soils (Bogdanov, 2015). The belica prefers shallow and well heated stretches of water with silty and sandy bottoms. Nowadays, *G. carpelli* is considered to be a specific parasite of the carp *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758 (Molnár et al., 2005) and many fishes from its former host list have their own separate coccidia species (Sokolov and Moshu, 2014). In this regard, a complex morphological and molecular genetic study of these parasites, which are particularly widespread in different systematic groups of fish *G. carpelli*, is required.

Moreover, it was previously shown under experimental conditions it was that feeding on fish by oligochaetes of the genera *Tubifex* and *Limnodrilus*, containing *G. carpelli* sporozoites, contributes to the infection of fish (Molnar and Ostoros, 2007). Representatives of these genera, dwelling in slow-flowing or stagnant silty and/or sandy bottoms, have been found in the zoobenthos composition of waters in the Baikal region (Semernoy, 2001). 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 the water level, unfavorable temperature conditions, etc.) resulted in the greatest distribution of oligochaetes among other representatives of benthic fauna, which contributed to an increase in the infection of fish with parasites (Novokhatskaya et al., 2008; Jirsa et

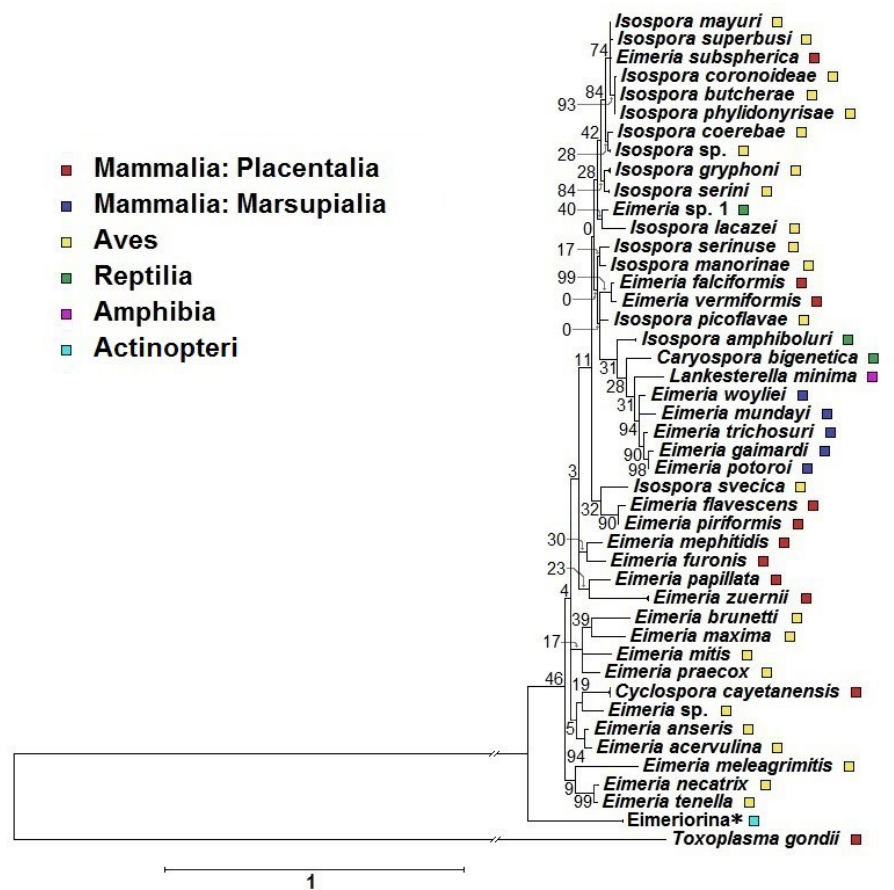


Fig.1. Phylogenetic tree of the representatives of the suborder Eimeriorina was derived with the Maximum Likelihood Estimation (MLE) method on the basis of nucleotide sequences of the *cox1* mitochondrial DNA gene fragments. Eimeriorina* – sequences from the belica.

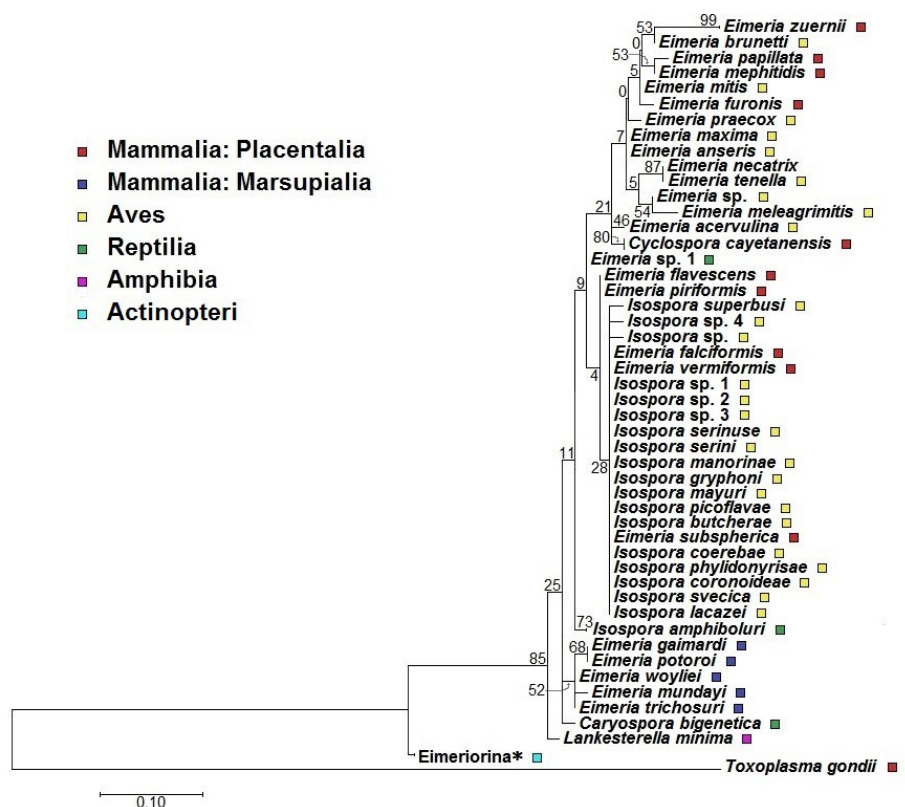


Fig.2. Phylogenetic tree of the representatives of the suborder Eimeriorina was derived with the Maximum Likelihood Estimation (MLE) method on the basis of amino acid sequences of the *cox1* gene fragments. Eimeriorina* – sequences from the belica.

al., 2008), for instance, with cestodes of the genus *Caryophyllaeus* (Denikina et al., 2023). Thus, the presence of the nucleotide sequences of the representatives of Eimeriorina in the intestines of fish could indicate feeding of the belica by infected oligochaetes. In this regard, the need for revision of parasites in fish of the Angara River and Lake Baikal and additional studies of their biology and ecology is considered.

4. Conclusion

The results of comparative analysis and reconstruction of the phylogenetic position of coccidia from the intestine of the belica from the Irkutsk Reservoir revealed a significant gap in the knowledge of their mitochondrial genomes expressed in the absence of the *cox1* mtDNA gene sequences of Eimeriorina representatives from fish in the GenBank database. Determination of the *cox1* gene fragment and comparative analysis of the obtained nucleotide sequences and those available in genetic databases revealed paraphilia of the genera *Eimeria* and *Goussia*. In the dendrograms, the sequences of the belica coccidia formed a distinct cluster Eimeriorina*, located at the base of the tree. Polymorphism of the parasite population was detected, but the results obtained did not allow a clear conclusion about the abundance of Eimeriorina species in the analyzed material and required further investigations. Thus, the hypothesis that coccidia of fish were ancestors of coccidia of other vertebrates was indirectly confirmed. In this regard, the need for revision of parasites in fish of the Angara River and Lake Baikal and additional studies of their biology and ecology are considered.

Acknowledgements

The work was supported by the State projects No. 121032300224-8, 121032300196-8, and 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)
- Andreou D., Arkush K.D., Gue'gan J.-F. et al. 2012. Introduced pathogens and native freshwater biodiversity: a case study of *Sphaerothecum destruens*. *PLoS ONE* 7(5): e36998. DOI: [10.1371/journal.pone.0036998](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036998)
- Arisue N., Hashimoto T. 2015. Phylogeny and evolution of apicomplexans and apicomplexan parasites. *Parasitology International* 64: 254-259. DOI: [10.1016/j.parint.2014.10.005](https://doi.org/10.1016/j.parint.2014.10.005)
- Belova L.M., Krylov M.V. 2006. Coccidia (Eimeriidae) of fish (Cypriniformes) of continental waters of Russia. *Parazitologiya [Parasitology]* 40(5): 447-461. (in Russian)
- Bernery C., Bellard C.A., Courchamp F. et al. 2022. Freshwater fish invasions: a comprehensive review. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 53: 427-456. DOI: [10.1146/annurev-ecolsys-032522-015551](https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-032522-015551)
- Bogdanov B.E. 2015. Variability and status of intraspecific forms of sand sculpin *Leocottus kesslerii* (Scorpaeniformes: Cottidae). *Journal of Ichthyology*. 55 (4): 386-396. DOI: [10.7868/S0042875215030029](https://doi.org/10.7868/S0042875215030029)
- Bychkov I.V., Nikitin V.M. 2015. Water-level regulation of Lake Baikal: problems and possible solutions. *Geography and Natural Resources* 3: 5-16. DOI: [10.1134/S1875372815030014](https://doi.org/10.1134/S1875372815030014)
- Băncilă R.I., Skolka M., Ivanova P. et al. 2022. Alien species of the Romanian and Bulgarian Black Sea coast: state of knowledge, uncertainties, and needs for future research. *Aquatic Invasions* 17(3): 353-373. DOI: [10.3391/ai.2022.17.3.02](https://doi.org/10.3391/ai.2022.17.3.02)
- Couso-Pérez S., Ares-Mazás E., Gómez-Couso H. 2019. First molecular data on *Eimeria truttae* from brown trout (*Salmo trutta*). *Parasitology Research* 118: 2121-2127. DOI: [10.1007/s00436-019-06320-y](https://doi.org/10.1007/s00436-019-06320-y)
- Denikina N.N., Kulakova N.V., Bukin Yu.S. et al. 2023. The first detection of DNA of *Caryophyllaeus laticeps* (Pallas, 1781) in sunbleak *Leucaspius delineatus* (Heckel, 1843). *Limnology and Freshwater Biology* 1: 6-10. DOI: [10.31951/2658-3518-2023-A-1-1](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2023-A-1-1)
- Dorovskikh G.N. 2019. The parasite fauna of the *Leucaspius delineatus* (Heckel, 1843) from large river systems of the European north-east Russia. *Vestnik Syktyvkar'skogo universiteta. Seriya 2. Biologiya. Geologiya. Khimiya. Ekologiya [Syktyvkar University Bulletin. Series 2. Biology. Geology. Chemistry. Ecology]* 4(12): 77-89. (in Russian)
- Dos Santos Q.M., Avenant-Oldewage A. 2022. Smallmouth yellowfish, *Labeobarbus aeneus* (Teleostei: Cyprinidae), as a potential new definitive host of the invasive parasite *Atractolytococestus huronensis* (Cestoda: Caryophyllidea) from common carp: example of recent spillover in South Africa? *Aquatic Invasions* 17(2): 259-276. DOI: [10.3391/ai.2022.17.2.08](https://doi.org/10.3391/ai.2022.17.2.08)
- Ellender B.R., Weyl O.L.F. 2014. A review of current knowledge, risk and ecological impacts associated with non-native freshwater fish introductions in South Africa. *Aquatic Invasions* 9: 117-132. DOI: [10.3391/ai.2014.9.2.01](https://doi.org/10.3391/ai.2014.9.2.01)
- 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)
- Jastrzębski M. 1984. Coccidiofauna of cultured and feral fishes in fish farms. *Wiadomości parazytologiczne T. XXX, NR 2*: 141-163
- Jirků M., Jirků M., Oborník M. et al. 2009. *Goussia* Labbé, 1896 (Apicomplexa, Eimeriorina) in Amphibia: diversity, biology, molecular phylogeny and comments on the status of the genus. *Protist* 160: 123-136. DOI: [10.1016/j.protis.2008.08.003](https://doi.org/10.1016/j.protis.2008.08.003)
- 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)
- Kaminskas S. 2021. Alien pathogens and parasites impacting native freshwater fish of southern Australia: a scientific and historical review. *Australian Zoologist* 41 (4):

696-730. DOI: [10.7882/AZ.2020.039](https://doi.org/10.7882/AZ.2020.039)

Kirjušina M., Vismanis K. 2007. Checklist of the parasites of fishes of Latvia. Technical Paper no. 369/3. FAO Fisheries, Rome.

Kulakova N.V., Bukin Yu.S., Denikina N.N. et al. 2022. Comparative analysis and reconstruction of phylogenetic position of sunbleak *Leucaspilus 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)

Kumar S., Stecher G., Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution 33: 1870-1874. DOI: [10.1093/molbev/msw054](https://doi.org/10.1093/molbev/msw054)

Le S.Q., Gascuel O. 2008. An improved general amino acid replacement matrix. Molecular Biology and Evolution 25 (7): 1307-1320. DOI: [10.1093/molbev/msn067](https://doi.org/10.1093/molbev/msn067)

Leray M., Yang J.Y., Meyer C.P. et al. 2013. A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. Frontiers in Zoology 10(34): P. 1-13. DOI: [10.1186/1742-9994-10-34](https://doi.org/10.1186/1742-9994-10-34)

Liu D., Brice B., Elliot A. et al. 2021. Morphological and molecular characterization of *Isoospora amphiboluri* (Apicomplexa: Eimeriidae), a coccidian parasite, in a central netted dragon (*Ctenophorus nuchalis*) (De Vis, 1884) in Australia. Parasitology International 84: P. 102386. DOI: [10.1016/j.parint.2021.102386](https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102386)

Molnar K., Ostoros G. 2007. Efficacy of some anticoccidial drugs for treating coccidial enteritis of the common carp caused by *Goussia carpelli* (Apicomplexa: Eimeriidae). Acta Veterinaria Hungarica 55: 67-76. DOI: [10.1556/AVet.55.2007.1.7](https://doi.org/10.1556/AVet.55.2007.1.7)

Molnár K., Ostoros G., Baska F. 2005. Cross-infection experiments confirm the host specificity of *Goussia* spp. (Eimeriidae: Apicomplexa) parasitizing cyprinid fish. Acta Protozoologica 44: 43-49.

Molnár K., Ostoros G., Dunams-Morel D. et al. 2012. Eimeria that infect fish are diverse and are related to, but distinct from, those that infect terrestrial vertebrates. Infection, Genetics and Evolution 12 (8): P. 1810-1815. DOI: [10.1016/j.meegid.2012.06.017](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.06.017)

Morrison D.A. 2009. Evolution of the Apicomplexa: where are we now? Trends in Parasitology 25: 375-382. DOI: [10.1016/j.pt.2009.05.010](https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.05.010)

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

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)

Ogedengbe M.E., El-Sherry S., Ogedengbe J.D. et al. 2018. Phylogenies based on combined mitochondrial and nuclear sequences conflict with morphologically defined genera in the eimeriid coccidian (Apicomplexa). International Journal for Parasitology 48: 59-69. DOI: [10.1016/j.ijpara.2017.07.008](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.07.008)

Pugachev O.N., Krylov M.V., Belova L.M. 2012. Fish Coccidia of the order Eimeriida of Russia and adjacent territories. St. Petersburg: ZIN RAS. (in Russian)

Reshetnikov A.N., Golubtsov A.S., Zhuravlev V.B. et al. 2017. Range expansion of rotan *Perccottus glenii*, sunbleak *Leucaspilus delineatus*, and bleak *Alburnus alburnus* in the Ob River Basin. Siberian Ecological Journal 24(6): 696-707. DOI: [10.15372/SEJ20170603](https://doi.org/10.15372/SEJ20170603)

Rosenthal B.M., Dunams-Morela D., Ostoros G. et al. 2016. Coccidian parasites of fish encompass profound phylogenetic diversity and gave rise to each of the major parasitic groups in terrestrial vertebrates. Infection, Genetics and Evolution 40: 219-227. DOI: [10.1016/j.meegid.2016.02.018](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.02.018)

Schulman S.S., Zaika V.E. 1964. Coccidia of fish of Lake Baikal. Izvestiya Sibirskogo Otdeleneya Akadamaii Nauk SSSR [Scientific journal of Siberian Branch of the USSR Academy of Sciences], series of biological and medical sciences, 8: 126-130. (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)

Slynko Yu.V., Tereschenko V.G. 2014. Freshwater fishes of the Ponto-Caspian Basin (diversity, faunogenesis, population dynamics, adaptation mechanisms). Moscow: Polygraph Plus Publ. (in Russian)

Sokolov S.G., Moshu A.Ya. 2014. *Goussia obstinata* sp. n. (Sporozoa: Eimeriidae), a new coccidian species from intestines of the Amur sleeper *Perccottus glenii* Dybowski, 1877 (Perciformes: odontobutidae). Parazitologiya [Parasitology] 48(5): 382-392. (in Russian)

Tamura K., Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular Biology and Evolution 10: 512-526. DOI: [10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023)

Truter M., Hadfield K.A., Smit N.J. 2023. Parasite diversity and community structure of translocated *Clarias gariepinus* (Burchell) in South Africa: Testing co-introduction, parasite spillback and enemy release hypotheses. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife 20 170-179. DOI: [10.1016/j.ijppaw.2023.02.004](https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2023.02.004)

Xavier R., Severino R., Pérez-Losada M. et al. 2018. Phylogenetic analysis of apicomplexan parasites infecting commercially valuable species from the North-East Atlantic reveals high levels of diversity and insights into the evolution of the group. Parasites & Vectors 11(63): 1-12. DOI: [10.1186/s13071-018-2645-7](https://doi.org/10.1186/s13071-018-2645-7)

Zaika V.E. 1965. Parazitofauna ryb ozera Baikal [Parasitofauna of fish of Lake Baikal]. Moscow, Nauka publ. (in Russian)

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)

Филогенетический анализ кокцидий (Apicomplexa: Eimeriorina) у обыкновенной 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

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

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

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

АННОТАЦИЯ. Целью данной работы явилось проведение сравнительного анализа и реконструкции филогенетического положения кокцидий из пищеварительного тракта обыкновенной верховки *Leucaspius delineatus* (Heckel, 1843) из Иркутского водохранилища. Определение и сравнительный анализ полученных и имеющихся в генетических базах данных нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *cox1* продемонстрировали парафилию родов *Eimeria* и *Goussia*. Последовательности на филогенетическом древе сформировали отдельный кластер в основании древа. Таким образом, косвенно подтверждена гипотеза о том, что кокцидии рыб являются предками кокцидий других позвоночных животных. Обсуждается необходимость дополнительных исследований и проведения ревизии кокцидий у рыб р. Ангара и оз. Байкал.

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

1. Введение

Активность хозяйственной деятельности человека, направленной на изменение и регуляцию естественных водотоков, рекреационное освоение береговой зоны и развитие аквакультуры, существенно возросла за последние 100 лет. Побочным эффектом этого процесса стало распространение за пределы естественных ареалов и интродукция различных видов гидробионтов (Băncilă et al., 2022; Bernery et al., 2022; Zhu et al., 2022; Truter et al., 2023).

Наряду с очевидными последствиями взаимодействия местной фауны с видами-вселенцами (конкуренция и хищничество; генетические воздействия, гибридизация и интрогрессия), существует угроза интродукции ассоциированных паразитов и других патогенных агентов (Ellender and Weyl, 2014; Truter et al., 2023). Описаны значительные эпизоотии в популяциях различных видов рыб, вызванные завезенными вместе с объектами аквакультуры вирусами, оомицетами

и простейшими (Kaminskas, 2021). Например, существенный урон ихтиофауне Европы и Америки нанес *Sphaerothecum destruens* Arkush, Mendoza, Adkison & Hedrick, 2003 – внутриклеточный паразит интродуцированного из Китая амурского чебачка *Pseudorasbora parva* (Temminck & Schlegel, 1846) (Andreou et al., 2012). В связи с этим, молекулярно-генетические исследования особенно востребованы при описании распространения инвазивных видов рыб, а также их паразитов (Ali et al., 2022; Alyamkin et al., 2022; Dos Santos and Avenant-Oldewage, 2022).

Все представители типа простейших Sporozoa или Apicomplexa из группы Alveolata являются одноклеточными облигатными паразитами многоклеточных животных, а также считаются одними из самых успешных паразитов в мире (Morrison, 2009). Предполагается, что более 6000 описанных видов составляют всего 0,1% от общего их разнообразия (Morrison, 2009). Представители Apicomplexa, принадлежащие родам *Cryptosporidium*, *Plasmodium*, *Toxoplasma* и *Babesia* являются возбудителями заболеваний человека и животных,

*Corresponding author.

E-mail address: denikina@lin.irk.ru (Н.Н. Деникина)

Поступила: 03 июля 2023; Принята: 26 июля 2023;

Опубликована online: 15 августа 2023

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



значительный урон сельскохозяйственному производству наносят кокцидии (Coccioidasida: Eimeriorina). Однако, несмотря на широкое распространение и хозяйственное значение, исследования эволюционных отношений внутри этой группы только начинаются (Arisue and Hashimoto, 2015; Xavier et al., 2018). Таксономия кокцидий к настоящему времени находится в стадии разработки, многие роды являются парафилетическими, что ставит под сомнение ценность строгих морфологических и экологических признаков для классификации паразитов (Ogedengbe et al., 2018; Xavier et al., 2018). При этом представители подотряда Eimeriorina у водных животных изучены значительно хуже, чем у наземных. Однако, даже имеющиеся скудные данные о последовательностях малой субъединицы рибосомальной РНК (МСЕ рРНК) позволяют предположить, что именно они являются базовыми группами внутри семейств (Jirků et al., 2009; Xavier et al., 2018).

Обыкновенная верховка *Leucaspis delineatus* (Heckel, 1843), исторически являвшаяся представителем Понто-Каспийской ихтиофауны, значительно расширила свой ареал в результате непреднамеренной интродукции и последующего саморасселения (Слынько и Терещенко, 2014; Решетников и др., 2017). Молекулярно-генетические исследования обыкновенной верховки из Иркутского водохранилища подтвердили сведения о случайном заносе вида из Европейской части России (Kulakova et al., 2022). В нативном ареале у обыкновенной верховки отмечены представители кокцидий (Jastrzębski, 1984; Белова и Крылов, 2006; Пугачев и др., 2012). Сведения о фауне паразитов обыкновенной верховки из Иркутского водохранилища малочисленны (Деникина и др., 2023). В связи с этим, целью исследования являлось проведение сравнительного анализа и реконструкции филогенетического положения кокцидий из пищеварительного тракта обыкновенной верховки.

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 (Lidocaine Bufus, 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 \pm SE) составила 2,6 \pm 0,2 г и 58 \pm 1,4 см соответственно (Kulakova et al., 2022; Деникина и др., 2023).

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. Фрагмент гена первой субъединицы цитохром-с-оксидазы (*cox1*) амплифицировали с праймерами MiSeq: COLintF 5'tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagG GWACWGGWTGAACWGTWTAAYCCYCC и dgHCO2198 5'gtctcgtgggctcgagatgtgtataagagacagTAIACYTCIGGR TGICCRAARAAYCA (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. После биоинформационной обработки полученные перекрывающиеся парные прочтения (контиги) были отфильтрованы по качеству прочтений и их длине. Регистрационный номер полученных данных в международной базе NCBI: PRJNA648490 (Деникина и др., 2023).

Первичную обработку и трансляцию полученных нуклеотидных последовательностей и данных о представителях подотряда Eimeriorina, представленных в базе GenBank (Таблица), проводили в редакторе BioEdit, выравнивали с помощью программы ClustalW.

Филогенетический анализ проводили с использованием программы MEGA7 (Kumar et al., 2016). Эволюционную историю, основанную на нуклеотидных последовательностях, выводили методом максимального правдоподобия с помощью модели Тамуры-Нея (Tamura and Nei, 1993). Для выведения эволюционной истории, основанной на аминокислотных последовательностях, была выбрана модель Ли-Гаскуэля (Nei and Kumar, 2000; Le and Gascuel, 2008). В обоих случаях для моделирования различий в скорости эволюции между сайтами использовали дискретное гамма-распределение, Статистическую поддержку узлов ветвей оценивали с помощью бут-стреп анализа, 2000 репликаций.

3. Результаты и обсуждение

В результате анализа данных метагеномного секвенирования ДНК пищеварительных трактов обыкновенной верховки были определены последовательности кокцидий. Представленность последовательностей Eimeriorina в общем пуле составила более 6,4%. Выявлен полиморфизм популяции паразитов: присутствуют 9 генотипов, при этом 99% последовательностей принадлежат к четырем (76,14; 10,65; 7,95 и 4,3%). Генотипы отличаются между собой точечными мутациями, только в трех сайтах приводящими к заменам аминокислот на сходные по заряду и радикалу (V на I). Полученные результаты не позволяют сделать однозначный вывод о количестве видов Eimeriorina в проанализированном материале и требуют дополнительных исследований.

Кокцидии рыб сравнительно малоизучены и нуклеотидные данные для них крайне скудны (в лучшем случае определены гены МСЕ рРНК). Этот факт обусловлен отсутствием таксон-специфичных

Таблица. Характеристика представленных в базе данных GenBank нуклеотидных последовательностей гена *cox1* представителей *Eimeriorina*

Вид	Хозяин	Место отбора проб	№№ GenBank
<i>Caryospora bigenetica</i> Wacha and Christiansen, 1982	<i>Sistrurus catenatus</i> (Say, 1823)	США	KF859856
<i>Cyclospora cayetanensis</i> Ortega, Gilman & Sterling, 1994	<i>Homo sapiens</i> Linnaeus, 1758	США	MN260359; MN260361; MN260362; MN260363; MN260364; MN260366; MN316534; MN316535
<i>Eimeria acervulina</i> Tyzzer, 1929	<i>Gallus gallus</i> (Linnaeus, 1758)	КНР	EF158855
<i>Eimeria anseris</i> (Kotlan, 1932)	<i>Anser albifrons</i> (Scopoli, 1769)	КНР	MH758793
<i>Eimeria brunetti</i> Levine, 1942	<i>G. gallus</i>	Канада	HM771675
<i>Eimeria falciformis</i> (Eimer, 1870)	<i>Mus musculus</i> Linnaeus, 1758	Германия	MH777557
<i>Eimeria flavescens</i> Marotel & Guilhon, 1941	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Linnaeus, 1758)	КНР	KP025693
<i>Eimeria furonis</i> Hoare, 1927	<i>Mustela putorius</i> Linnaeus, 1758	Канада	MF774035
<i>Eimeria gaimardi</i> Barker, O'Callaghan, and Beveridge, 1988	<i>Bettongia gaimardi</i> (Desmarest, 1822)	Австралия	MK202809
<i>Eimeria maxima</i> Tyzzer, 1929	<i>G. gallus</i>	США	FJ236459
<i>Eimeria meleagridis</i> Tyzzer 1929	<i>Meleagris gallopavo</i> Linnaeus, 1758	Канада	KJ526131
<i>Eimeria mephitidis</i> Andrews 1928	<i>Mephitis mephitis</i> (Schreber, 1776)	Канада	KT203398
<i>Eimeria mitis</i> Tyzzer, 1929	<i>G. gallus</i>	Чешская Республика	FR796699
<i>Eimeria mundayi</i> Barker, O'Callaghan, and Beveridge, 1988	<i>Potorous tridactylus</i> (Kerr, 1792)	Австралия	MK202808
<i>Eimeria necatrix</i> Johnson, 1930	<i>G. gallus</i>	Канада	HM771680
<i>Eimeria papillata</i> Ernst, Chobotar, & Hammond, 1971	<i>M. musculus</i>	Канада	KT184377
<i>Eimeria piriformis</i> Kotlan & Pospesch, 1934	<i>O. cuniculus</i>	Чешская Республика	JQ993698
<i>Eimeria potoroi</i> Barker, O'Callaghan, and Beveridge, 1988	<i>P. tridactylus</i>	Австралия	MK202807
<i>Eimeria praecox</i> Johnson, 1930	<i>G. gallus</i>	Канада	JQ659301
<i>Eimeria tenella</i> (Railliet & Lucet, 1891) Fantham, 1909	<i>G. gallus</i>	Судан	MF497440
<i>Eimeria subspherica</i> Christensen, 1941	<i>Bos taurus</i> Linnaeus, 1758	Турция	KU351704
<i>Eimeria trichosuri</i> O'Callaghan & O'Donoghue, 2001	<i>Trichosurus caninus</i> (Ogilby, 1835)	Австралия	JN192136
<i>Eimeria vermiformis</i> Ernst, Chobotar and Hammond, 1971	<i>Apodemus flavicollis</i> (Melchior, 1834)	Германия	MK257110
<i>Eimeria woyliei</i> Northover et al., 2019	<i>Bettongia anhydra</i> Finlayson, 1957	Австралия	MK202806
<i>Eimeria zuernii</i> (Rivolta, 1878) Martin, 1909	<i>B. taurus</i>	Канада, КНР, Австралия	HM771687; KX495130; OL770312
<i>Eimeria</i> sp.	<i>Coturnix coturnix</i> (Linnaeus, 1758)	Египет	MF496271

Вид	Хозяин	Место отбора проб	№№ GenBank
<i>Eimeria</i> sp. 1	<i>Tiliqua rugosa</i> subsp. <i>rugosa</i> Gray, 1825	Австралия	JX839284
<i>Isoospora amphiboluri</i> Cannon, 1967	<i>Ctenophorus nuchalis</i> (De Vis, 1884)	Австралия	KR108297; MW720599
<i>Isoospora butchererae</i> Yang, Brice, Jian & Ryan, 2018	<i>Zosterops lateralis</i> (Latham, 1802)	Австралия	KY801687
<i>Isoospora coerebae</i> Berto et al., 2011	<i>Coereba flaveola</i> (Linnaeus, 1758)	Бразилия	OK194672
<i>Isoospora coronoidae</i> Liu et al., 2019	<i>Corvus coronoides</i> Vigors & Horsfield, 1827	Австралия	MK867778
<i>Isoospora greineri</i> Hafeez et al. 2014	<i>Lamprotornis superbus</i> Rüppell, 1845	Канада	KR108298
<i>Isoospora gryphoni</i> Olson, Gissing, Barta & Middleton, 1998	<i>Carduelis tristis</i> (Linnaeus, 1758)	Канада	KC346355
<i>Isoospora lacazei</i> (Labbé, 1893)	<i>Pavo cristatus</i> Linnaeus, 1758	КНР	MW775672
<i>Isoospora manorinae</i> Yang, Brice, Jian & Ryan 2016	<i>Manorina flavigula</i> subsp. <i>wayensis</i> (Mathews, 1912)	Австралия	KT224377
<i>Isoospora mayuri</i> Patnaik, 1966	<i>P. cristatus</i>	КНР	MW775673
<i>Isoospora phylidonyrisae</i> Yang, Brice, Berto & Ryan, 2021	<i>Phylidonyris novaehollandiae</i> (Latham, 1790)	Австралия	MW423631
<i>Isoospora picoflavae</i> Rejman, Hak-Kovacs & Barta, 2021	<i>Colaptes auratus</i> subsp. <i>luteus</i> Bangs, 1898	Канада	NC_065382
<i>Isoospora serini</i> (Aragao, 1933)	<i>Serinus canaria</i> (Linnaeus, 1758)	Бразилия	ON584773
<i>Isoospora serinuse</i> Yang, Brice, Elliot & Ryan 2015	<i>S. canaria</i>	Австралия	KX276860
<i>Isoospora superbusi</i> Hafeez et al. 2014	<i>Lamprotornis superbus</i> Rüppell, 1845	Канада	KT203396
<i>Isoospora svecica</i> Trefančová & Kvičerová, 2019	<i>Luscinia svecica</i> subsp. <i>cyaneula</i> (Wolf, 1810)	Чешская Республика	MK573841
<i>Isoospora</i> sp.	<i>Sturnus vulgaris</i> Linnaeus, 1758	США	OL999169
<i>Isoospora</i> sp. 1	<i>S. canaria</i>	Канада	KP658103
<i>Isoospora</i> sp. 2	<i>M. gallopavo</i>	Канада	KC346356
<i>Isoospora</i> sp. 3	<i>S. vulgaris</i>	США	OL999161
<i>Isoospora</i> sp. 4	<i>Carduelis carduelis</i> (Linnaeus, 1758)	Великобритания	OL999140
<i>Lankesterella minima</i> (Chaussat, 1850) Nöller, 1912	<i>Lithobates clamitans</i> (Latreille, 1801)	Канада	KT184381
<i>Toxoplasma gondii</i> (Nicolle & Manceaux, 1908)	Штамм ME49, Центр тропических и новых глобальных заболеваний, Университет Джорджии, США		MN077082

консервативных районов в гене MCE рНК, что затрудняет прямую молекулярно-генетическую диагностику *Eimeriorina*. Последовательности гена *cox1* мтДНК кокцидий рыб в базе GenBank отсутствуют. В анализе были использованы последовательности представителей *Eimeriorina* птиц, грызунов, приматов, сумчатых и пресмыкающихся; в качестве аут-группы представлена последовательность гена *cox1* мтДНК *Toxoplasma gondii* (Таблица, Рис. 1).

На дендрограмме нуклеотидные последовательности кокцидий из верховки сформировали отдельный кластер *Eimeriorina**, расположенный в основании древа (Рис. 1). При этом древо неразрешенное, поддержки

крупных ветвей крайне низки (от 0%). Филогенетическая реконструкция, основанная на анализе соответствующих аминокислотных последовательностей (Рис. 2), гораздо достовернее: кластер *Eimeriorina** сформирован с более значимой поддержкой (85%). При этом ветвление внутри кластера кокцидий из наземных позвоночных, как и в случае нуклеотидных последовательностей, поддержано слабо и малодостоверно (Рис. 2).

С одной стороны, этот факт является свидетельством значительного пробела в знаниях о митохондриальных геномах этих паразитов, поскольку последовательности гена *cox1* мтДНК кокцидий из рыб в базе GenBank отсутствуют.

Кроме того, на филогенетическом древе, построенном на основании последовательностей генов МСЕ рРНК, нет корреляции порядка ветвления с принадлежностью роду, и весьма относительная с принадлежностью хозяину (Molnár et al., 2012; Couso-Pérez et al., 2019; Liu et al., 2021). С другой стороны, ранее была сформулирована гипотеза о том, что именно кокцидии рыб дали начало всем известным линиям кокцидий у других позвоночных животных (Rosenthal et al., 2016; Xavier et al., 2018). Возможно, наши результаты являются косвенным подтверждением этой гипотезы, и при появлении новых нуклеотидных данных о митохондриальных геномах кокцидий рыб кластер *Eimeriorina** (Рис. 1, 2) будет пополняться.

Очевидная парафилия родов *Eimeria* и *Goussia*, неоднократно обсужденная и доказанная ранее (Jirků et al., 2009; Ogedengbe et al., 2018; Xavier et al., 2018), нашла отражение и на наших дендрограммах. Несомненно, требуется пересмотр основных фенотипических признаков, определяющих таксономическую принадлежность кокцидий.

В нативном ареале (водоемы и водотоки Понто-Каспийского бассейна), а также в бассейне Балтийского моря у обыкновенной верховки отмечены *Eimeria cyprinorum* Stankovich, 1921 (Syn.: *Goussia carpelli* (Léger et Stankovith, 1921), *Goussia carpelli* (Léger et Stankovith, 1921) (Syn.: *Eimeria carpelli* Léger et Stankovith, 1921; *E. cyprini* Plehn, 1924; *E. cyprinorum* Stankovith, 1921; *E. wierzejskii* Hoer, 1904) и *Eimeria* sp. (Jastrzębski, 1984; Kirjušina and Vismanis, 2007; Белова и Крылов, 2006; Пугачев и др., 2012).

Ранее *G. carpelli* была отмечена у разных видов (Пугачев и др., 2012), в том числе и у рогатковидных рыб оз. Байкал: большеголовой широколобки *Batrachocottus baicalensis* (Dybowski, 1874), песчаной широколобки *Leocottus kesslerii* (Dybowski, 1874) и широкорылой широколобки *Cyphocottus eurytomus* (Taliev, 1955) (Шульман и Заика, 1964; Заика, 1965). Спектр видов паразитов верховки в конкретном водоеме зависит от условий обитания хозяина и состава паразитофауны доминирующих видов рыбного населения (Доровских, 2019). Иркутское водохранилище расположено на участке р. Ангара от Байкала до г. Иркутска. Общая его площадь составляет 15 тыс. га и почти

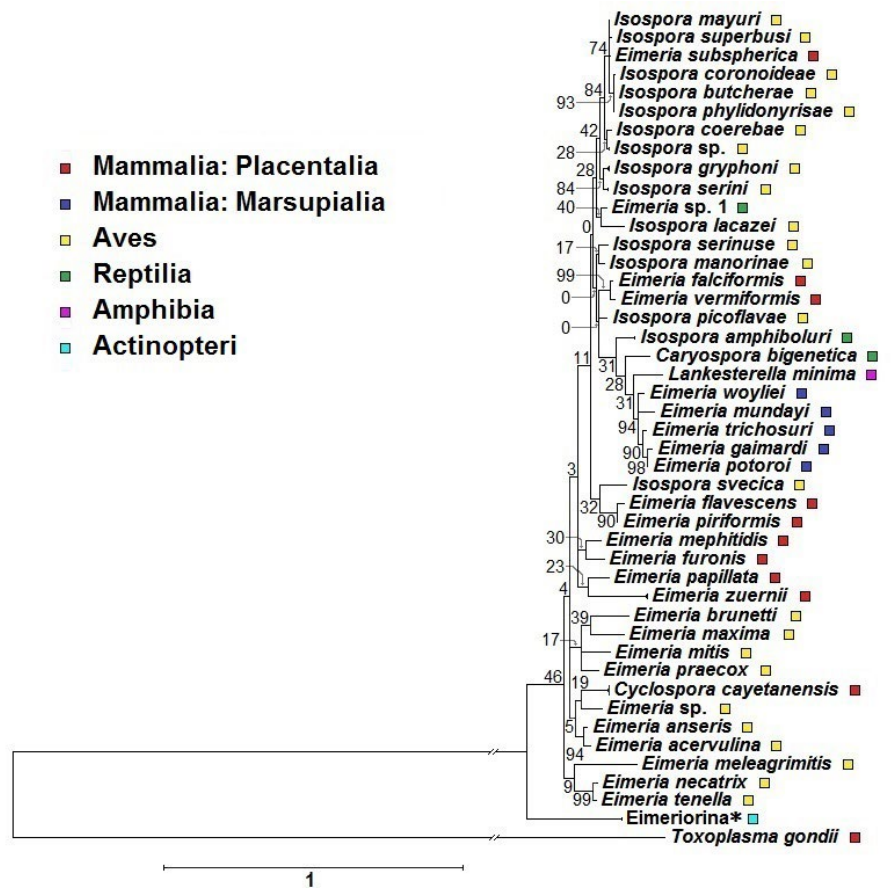


Рис.1. Филогенетическое древо представителей подотряда *Eimeriorina*, построенное методом максимального правдоподобия на основании нуклеотидных последовательностей фрагментов гена *cox1* митохондриальной ДНК. *Eimeriorina** – последовательности из обыкновенной верховки.

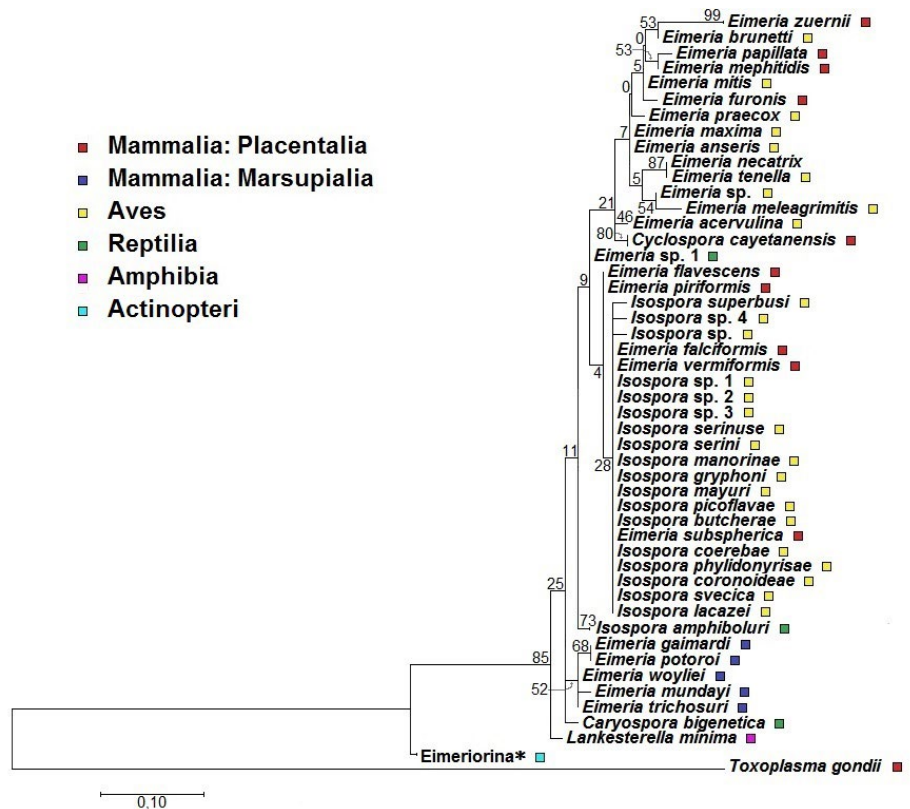


Рис.2. Филогенетическое древо представителей подотряда *Eimeriorina*, построенное методом максимального правдоподобия на основании аминокислотных последовательностей фрагментов белка *Cox1*. *Eimeriorina** – последовательности из обыкновенной верховки.

четверть ее приходится на заливы и мелководья. Большеголовая широколобка в верхнем и среднем створах Иркутского водохранилища встречается на каменисто-илистых грунтах. Песчаная широколобка распространена в реке Ангара от истока до устья, наибольшей численности достигает в прибрежной зоне водохранилища с песчаными, илисто-песчаными и каменисто-песчаными грунтами (Богданов, 2015). Верховка предпочитает мелководные и хорошо прогреваемые участки акватории с илистым и песчаным грунтом. В настоящее время принято считать, что *G. carpelli* является специфичным паразитом карпа *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758 (Molnár et al., 2005), а у многих рыб из прежнего списка ее хозяев имеются свои отдельные виды кокцидий (Соколов и Мошу, 2014). В связи с этим, необходимо комплексное морфологическое и молекулярно-генетическое изучение этих паразитов, особенно широко распространенной у различных систематических групп рыб *G. carpelli*.

Кроме этого, ранее в экспериментальных условиях было показано, что питание рыб олигохетами родов *Tubifex* и *Limnodrilus*, содержащими спорозоиты *G. carpelli*, способствует заражению рыб (Molnár and Ostoros, 2007). Представители этих родов, обитающие в медленнотекущих или стоячих водоемах с илистыми и/или песчаными грунтами были отмечены в составе зообентоса водоемов бассейна оз. Байкал (Семерной, 2001). 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 паразитами (Новохацкая и др., 2008; Jirsa et al., 2008), например, цестодами рода *Caryophyllaeus* (Деникина и др., 2023). Таким образом, наличие в пищеварительном тракте рыб нуклеотидных последовательностей представителей *Eimeriorina* может свидетельствовать о питании верховки зараженными олигохетами. В связи с этим перспективным является не только проведение ревизии паразитов у рыб р. Ангара и оз. Байкал, но и исследование их биологии и экологии.

4. Заключение

Результаты сравнительного анализа и реконструкция филогенетического положения кокцидий из пищеварительного тракта обыкновенной верховки из Иркутского водохранилища выявили значительный пробел в знаниях об их митохондриальных геномах, выражающийся в отсутствии последовательностей гена *cox1* мтДНК представителей *Eimeriorina* из рыб в базе GenBank. Определение фрагмента гена *cox1* и сравнительный

анализ полученных и имеющихся в генетических базах данных нуклеотидных последовательностей продемонстрировали парафилию родов *Eimeria* и *Goussia*. Последовательности кокцидий из верховки на дендрограммах сформировали отдельный кластер, расположенный в основании дерева. Выявлен полиморфизм популяции паразитов, однако полученные результаты не позволяют сделать однозначный вывод о количестве видов *Eimeriorina* в проанализированном материале и требуют дополнительных исследований. Таким образом, была косвенно подтверждена гипотеза о том, что кокцидии рыб являются предками кокцидий других позвоночных животных. В связи с этим перспективным является не только проведение ревизии этих видов паразитов у рыб р. Ангара и оз. Байкал, но и исследование их биологии и экологии.

Благодарности

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

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Белова Л.М., Крылов М.В. 2006. Кокцидии (Eimeriidae) рыб (Cypriniformes) континентальных вод России. *Паразитология* 40(5): 447-461.
- Богданов Б.Э. 2015. Изменчивость и статус внутривидовых форм песчаной широколобки *Leocottus kesslerii* (Scorpaeniformes: Cottidae). *Вопросы ихтиологии*. 55 (4): 386-396. DOI: [10.7868/S0042875215030029](https://doi.org/10.7868/S0042875215030029)
- Бычков И.В., Никитин В.М. 2015. Регулирование уровня озера Байкал: проблемы и возможные решения. *География и природные ресурсы* 2015(3): 5-16. DOI: [10.1134/S1875372815030014](https://doi.org/10.1134/S1875372815030014)
- ГОСТ 33219-2014. 2016. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за рыбами, амфибиями и рептилиями. М.: Стандартинформ.
- Деникина Н.Н., Кулакова Н.В., Букин Ю.С. и др. 2023. Первое обнаружение ДНК *Caryophyllaeus laticeps* (Pallas, 1781) у верховки *Leucaspius delineatus* (Heckel, 1843). *Limnology and Freshwater Biology* 2023 (1): 6-10. DOI: [10.31951/2658-3518-2023-A-1-1](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2023-A-1-1)
- Доровских Г.Н. 2019. Паразитофауна верховки обыкновенной *Leucaspius delineatus* (Heckel, 1843) из крупных речных систем европейского северо-востока России. *Вестник Сыктывкарского университета. Серия 2. Биология. Геология. Химия. Экология* 4(12): 77-89.
- Заика В.Е. 1965. Паразитофауна рыб озера Байкал. М.: Наука.
- 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.
- Пугачев О.Н., Крылов М.В., Белова Л.М. 2012. Кокцидии отряда Eimeriida рыб России и сопредельных территорий. – СПб., ЗИН РАН.

- Решетников А.Н., Голубцов А.С., Журавлев В.Б. и др. 2017. Расширение ареалов ротана *Perccottus glenii*, верховки *Leucaspilus delineatus* и уклейки *Alburnus alburnus* в бассейне р. Обь. Сибирский экологический журнал 24(6): 696-707. DOI: [10.15372/SEJ20170603](https://doi.org/10.15372/SEJ20170603)
- Семерной В.П. 2001. Малоцетинковые черви (Annelida: Oligochaeta) и эолосоматиды (Annelida: Aeolosomatidae). В книге: Тимошкин О.А. (Ред.), Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна. Новосибирск: Наука: 377-427.
- Слынько Ю.В., Терещенко В.Г. 2014. Рыбы пресных вод Понто-Каспийского бассейна (разнообразие, фауногенез, динамика популяций, механизмы адаптаций). М.: Полиграф-Плюс.
- Соколов С.Г., Мошу А.Я. 2014. *Goussia obstinata* sp. n. (Sporozoa: Eimeriidae) – новый вид кокцидий из кишечника ротана *Perccottus glenii* Dybowski, 1877 (Perciformes: Odontobutidae). Паразитология 48(5): 382-392.
- Шульман С.С., Заика В.Е. 1964. Кокцидии рыб озера Байкал. Известия Сибирского отделения АН СССР, серия биологических и медицинских наук, 8: 126-130.
- 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)
- Andreou D., Arkush K.D., Gue'gan J.-F. et al. 2012. Introduced pathogens and native freshwater biodiversity: a case study of *Sphaerothecum destruens*. PLoS ONE 7(5): e36998. DOI: [10.1371/journal.pone.0036998](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036998)
- Arisue N., Hashimoto T. 2015. Phylogeny and evolution of apicoplasts and apicomplexan parasites. Parasitology International 64: 254-259. DOI: [10.1016/j.parint.2014.10.005](https://doi.org/10.1016/j.parint.2014.10.005)
- Băncilă R.I., Skolka M., Ivanova P. et al. 2022. Alien species of the Romanian and Bulgarian Black Sea coast: state of knowledge, uncertainties, and needs for future research. Aquatic Invasions 17(3): 353-373. DOI: [10.3391/ai.2022.17.3.02](https://doi.org/10.3391/ai.2022.17.3.02)
- Bernery C., Bellard C.A., Courchamp F. et al. 2022. Freshwater fish invasions: a comprehensive review. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 53: 427-456. DOI: [10.1146/annurev-ecolsys-032522-015551](https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-032522-015551)
- Couso-Pérez S., Ares-Mazás E., Gómez-Couso H. 2019. First molecular data on *Eimeria truttae* from brown trout (*Salmo trutta*). Parasitology Research 118: 2121-2127. DOI: [10.1007/s00436-019-06320-y](https://doi.org/10.1007/s00436-019-06320-y)
- Dos Santos Q.M., Avenant-Oldewage A. 2022. Smallmouth yellowfish, *Labeobarbus aeneus* (Teleostei: Cyprinidae), as a potential new definitive host of the invasive parasite *Atractolytocestus huronensis* (Cestoda: Caryophyllidea) from common carp: example of recent spillover in South Africa? Aquatic Invasions 17(2): 259-276. DOI: [10.3391/ai.2022.17.2.08](https://doi.org/10.3391/ai.2022.17.2.08)
- Ellender B.R., Weyl O.L.F. 2014. A review of current knowledge, risk and ecological impacts associated with non-native freshwater fish introductions in South Africa. Aquatic Invasions 9: 117-132. DOI: [10.3391/ai.2014.9.2.01](https://doi.org/10.3391/ai.2014.9.2.01)
- Jastrzębski M. 1984. Coccidiofauna of cultured and feral fishes in fish farms. Wiadomości parazytologiczne T. XXX, NR 2: 141-163
- Jirků M., Jirků M., Oborník M. et al. 2009. *Goussia Labbé*, 1896 (Apicomplexa, Eimeriorina) in Amphibia: diversity, biology, molecular phylogeny and comments on the status of the genus. Protist 160: 123-136. DOI: [10.1016/j.protis.2008.08.003](https://doi.org/10.1016/j.protis.2008.08.003)
- 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)
- Kaminskas S. 2021. Alien pathogens and parasites impacting native freshwater fish of southern Australia: a scientific and historical review. Australian Zoologist 41 (4): 696-730. DOI: [10.7882/AZ.2020.039](https://doi.org/10.7882/AZ.2020.039)
- Kirjušina M., Vismanis K. 2007. Checklist of the parasites of fishes of Latvia. Technical Paper no. 369/3. FAO Fisheries, Rome.
- Kulakova N.V., Bukin Yu.S., Denikina N.N. et al. 2022. Comparative analysis and reconstruction of phylogenetic position of sunbleak *Leucaspilus 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)
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution 33: 1870-1874. DOI: [10.1093/molbev/msw054](https://doi.org/10.1093/molbev/msw054)
- Le S.Q., Gascuel O. 2008. An improved general amino acid replacement matrix. Molecular Biology and Evolution 25 (7): 1307-1320. DOI: [10.1093/molbev/msn067](https://doi.org/10.1093/molbev/msn067)
- Leray M., Yang J.Y., Meyer C.P. et al. 2013. A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. Frontiers in Zoology 10(34): P. 1-13. DOI: [10.1186/1742-9994-10-34](https://doi.org/10.1186/1742-9994-10-34)
- Liu D., Brice B., Elliot A. et al. 2021. Morphological and molecular characterization of *Isospora amphiboluri* (Apicomplexa: Eimeriidae), a coccidian parasite, in a central netted dragon (*Ctenophorus nuchalis*) (De Vis, 1884) in Australia. Parasitology International 84: P. 102386. DOI: [10.1016/j.parint.2021.102386](https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102386)
- Molnar K., Ostoros G. 2007. Efficacy of some anticoccidial drugs for treating coccidial enteritis of the common carp caused by *Goussia carpelli* (Apicomplexa: Eimeriidae). Acta Veterinaria Hungarica 55: 67-76. DOI: [10.1556/AVet.55.2007.1.7](https://doi.org/10.1556/AVet.55.2007.1.7)
- Molnár K., Ostoros G., Baska F. 2005. Cross-infection experiments confirm the host specificity of *Goussia* spp. (Eimeriidae: Apicomplexa) parasitizing cyprinid fish. Acta Protozoologica 44: 43-49.
- Molnár K., Ostoros G., Dunams-Morel D. et al. 2012. *Eimeria* that infect fish are diverse and are related to, but distinct from, those that infect terrestrial vertebrates. Infection, Genetics and Evolution 12 (8): P. 1810-1815. DOI: [10.1016/j.meegid.2012.06.017](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.06.017)
- Morrison D.A. 2009. Evolution of the Apicomplexa: where are we now? Trends in Parasitology 25: 375-382. DOI: [10.1016/j.pt.2009.05.010](https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.05.010)
- Nei M., Kumar S. 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, New York.
- Ogedengbe M.E., El-Sherry S., Ogedengbe J.D. et al. 2018. Phylogenies based on combined mitochondrial and nuclear sequences conflict with morphologically defined genera in the eimeriid coccidian (Apicomplexa). International Journal for Parasitology 48: 59-69. DOI: [10.1016/j.ijpara.2017.07.008](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.07.008)
- Rosenthal B.M., Dunams-Morel D., Ostoros G. et al. 2016. Coccidian parasites of fish encompass profound phylogenetic diversity and gave rise to each of the major parasitic groups in terrestrial vertebrates. Infection, Genetics and Evolution 40: 219-227. DOI: [10.1016/j.meegid.2016.02.018](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.02.018)
- Tamura K., Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular Biology and Evolution 10: 512-526. DOI: [10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023)

Truter M., Hadfield K.A., Smit N.J. 2023. Parasite diversity and community structure of translocated *Clarias gariepinus* (Burchell) in South Africa: Testing co-introduction, parasite spillback and enemy release hypotheses. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 20 170-179. DOI: [10.1016/j.ijppaw.2023.02.004](https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2023.02.004)

Xavier R., Severino R., Pérez-Losada M. et al. 2018. Phylogenetic analysis of apicomplexan parasites infecting commercially valuable species from the North-East Atlantic reveals high levels of diversity and insights into the evolution of the group. *Parasites & Vectors* 11(63): 1-12. DOI: [10.1186/s13071-018-2645-7](https://doi.org/10.1186/s13071-018-2645-7)

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)