

The first detection of coccidia (Conoidasida: Eimeriidae) DNA in Godlewski's sculpin *Abyssocottus* (*Limnocottus*) *godlewskii* (Dybowski, 1874)

Dzyuba E.V.^{id}, Bukin Yu.S.^{id}, Khanaev I.V.^{id}, Bogdanov B.E.^{id}, Yakhnenko A.S.^{id}, Sapozhnikova Yu.P.*^{id}, Denikina N.N.^{id}

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

ABSTRACT. For the first time, fragments of the *cox1* gene of a representative of the family Eimeriidae were obtained by high-throughput sequencing in the digestive tract of Godlewski's sculpin *Abyssocottus* (*Limnocottus*) *godlewskii* (Dybowski, 1874). The nucleotide sequences of the coccidia, which accounted for less than 0.01% of the total data set, belonged to a single genotype and were significantly different from all previously known. Phylogenetic reconstruction based on the translated amino acid sequences reliably revealed the basal location of branches belonging to representatives of the family Eimeriidae among fishes. The question of the genus of the detected organism remains unresolved due to the limited nucleotide data for representatives of the genera *Eimeria*, *Calyptospora*, and *Goussia* from fish.

Keywords: Eimeriidae, *Abyssocottus* (*Limnocottus*) *godlewskii* (Dybowski, 1874), *cox1* gene, Lake Baikal

For citation: Dzyuba E.V., Bukin Yu.S., Khanaev I.V., Bogdanov B.E., Yakhnenko A.S., Sapozhnikova Yu.P., Denikina N.N. The first detection of coccidia (Conoidasida: Eimeriidae) DNA in Godlewski's sculpin *Abyssocottus* (*Limnocottus*) *godlewskii* (Dybowski, 1874) // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 5. - P. 1206-1218. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-5-1206

1. Introduction

The analysis of fish parasites is an essential part of studies on their ecology. The advantage of the molecular genetic approach using high-throughput sequencing technologies is the ability to analyze and identify relatively short fragments of foreign DNA from the contents of the digestive tract, organs, and tissues of fish. These methods are efficient due to their high resolution and ability to identify a wide range of species (Harms-Tuohy et al., 2016; Jakubavičiūtė et al., 2017; Yoon et al., 2017). Despite a number of drawbacks, including inaccurate species identification due to the limited genetic data in publicly available databases (Siddall et al., 2012; Kvist, 2013) and the detection of organisms from the digestive tract of food using DNA (Sakaguchi et al., 2017), metabarcoding can serve as a complementary approach to traditional methods for studying fish parasite fauna (Ogedengbe et al., 2011; Villsen et al., 2022; Denikina et al., 2023a; b).

All members of the protozoan type Sporozoa or Apicomplexa of the Alveolata group are unicellular obligate parasites of multicellular animals and are also considered to be among the most successful parasites in the world (Morrison, 2009). It is estimated that more than

6,000 described species represent only 0.1% of the total diversity of the group (Morrison, 2009). Representatives of the genera *Cryptosporidium*, *Plasmodium*, *Toxoplasma*, and *Babesia* are causative agents of human and animal diseases. Coccidia cause significant damage to agricultural production (Conoidasida: Eimeriidae). Despite their widespread distribution and economic importance, research on the evolutionary relationships within this group is still in its infancy (Arisue and Hashimoto, 2015; Xavier et al., 2018). The taxonomy of coccidia is still evolving, with many genera being paraphyletic. This raises questions about the value of strict morphological and ecological traits for their classification (Ogedengbe et al., 2018; Xavier et al., 2018). Representatives of the family Eimeriidae are less well studied in aquatic animals than in terrestrial animals. Nevertheless, even the limited sequence data available for the small subunit ribosomal RNA (ssrRNA) enable to suggest that these are the base groups within the families (Jirků et al., 2009; Xavier et al., 2018; Denikina et al., 2023b). The NCBI database currently contains mtDNA *cox1* gene sequences for the following fish species: redlip blenny *Ophioblennius macclurei* (Silvester, 1915), white perch *Morone americana* (Gmelin, 1789), and belica *Leucaspius delineatus* (Heckel, 1843).

*Corresponding author.

E-mail address: jsap@mail.ru (Yu.P. Sapozhnikova)

Received: June 19, 2024; **Accepted:** September 04, 2024;

Available online: October 31, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



Godlewski's sculpin *Abyssocottus (Limnocottus) godlewskii* (Dybowski, 1874) is an endemic species of lake sculpins that inhabits depths ranging from 100 to 900 m (Bogdanov, 2023). Difficulties in studying of the ecology and parasite fauna of deepwater species arise from the limited number of fish samples due to the labor-intensive capture process. A study of the food spectrum of Godlewski's sculpin using next-generation sequencing techniques has resulted in coccidia sequences. The aim of the work was to determine the phylogenetic position of a representative of the family Eimeriidae from the digestive tract of Godlewski's sculpin.

2. Materials and methods

The samples were collected in September 2019 from the R/V "G.Y. Vereshchagin" in the area around the Chivyrkuisky Bay of Lake Baikal (53°59.674'N, 109°09.086'E) at depths of 790 to 820 m. The fish species were identified according to the latest revisions (Bogdanov, 2017; 2023). Five individuals of Godlewski's sculpin with weights ranging from 8.7 to 28.5 g and total lengths from 95 to 149 mm were used for the analysis.

In vitro, the contents of the entire digestive tract (250-700 µl) of each individual were diluted with an equal volume of mQ water, ground and mixed thoroughly. Total DNA was extracted using the DNA-sorb-AM kit (Russia) according to the manufacturer's instructions. An approximately 350 bp fragment of the *cox1* gene was amplified for each sample in 30 cycles with reducing the annealing temperature by 0.3°C from the initial 55°C, using MiSeq primers: COIintF 5'tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagGGWACWGGWT-GAACWGTWTAAYCCYCC and dgHCO2198 5'gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagTAIACYTCIGGRTGIC-CRAARAAYCA (Leray et al., 2013). All amplicons from the digestive tract were pooled and used to prepare the sample for sequencing.

A library was constructed from the purified amplicon pool using the Nextera XT kit (Illumina, Hayward, California, USA). The nucleotide sequences were determined using Illumina NextSeq. The registration number of the data obtained in the international NCBI database is PRJNA1086215.

All original reads were trimmed for quality using the program Trimmomatic V 0.39 (Bolger et al., 2014) with options: average read quality 20, minimum read length 140. The original reads were assembled into contigs corresponding to the full-length amplification products using the program metaSPAdes (Nurk et al., 2017) with k-mer lengths of 21, 33, 55, 77, 99, and 121. The chosen k-mer lengths allowed the aggregation to be brought into single contigs containing only reads specific to the original *cox1* fragments of the DNA mixture of different metagenomic sample species.

The complete sequence set of the *cox1* marker from the International Barcode of Life Database (iBOL) (<https://ibol.org/>) was used as a reference database for the taxonomic analysis. The DNA sequences of the amplicon assembly were compared to a reference

database using the local BLASTn application (Altschul et al., 1990). The results of the BLAST analysis were converted into a table of taxonomic representation in the DNA of the host digestive tract contents. The primary processing of the obtained nucleotide sequences of representatives of the family Eimeriidae and the corresponding data in the NCBI database (Table 1) was performed with the editor BioEdit and aligned with the program ClustalW. The sequence is registered in NCBI under the number PP552829. Phylogenetic analysis, including model selection for estimating evolutionary divergence and reconstructing evolutionary history, was performed using the program MEGA7 (Kumar et al., 2016). The evolutionary divergence between the sequence groups was estimated with the maximum likelihood method using the Tamura-Nei model (TrN DNA evolutionary model) (Tamura and Nei, 1993).

Phylogenetic reconstruction of evolutionary history based on amino acid sequences was performed with the maximum likelihood method using the Le-Gascuel model with gamma correction for differences in rates of substitution accumulation at different sites (LG + G protein evolutionary model) (Nei and Kumar, 2000; Le and Gascuel, 2008). A non-parametric booster (1000 replicates) was used to test the validity of the phylogenetic tree topology.

3. Results and discussion

As a result of analyzing data from metagenomic DNA sequencing of the Godlewski's sculpin digestive tract contents, sequences from representatives of the family Eimeriidae with a relative representation of <0.01% were detected. The sequences obtained belonged to the only haplotype significantly different from all known sequences of the *cox1* gene of coccidia, including *G. bayae* and Eimeriidae derived from the belica, and showed the highest degree of homology (86.71%) with the nucleotide sequences of *Cyclospora cayetanensis* (Ortega, Gilman & Sterling, 1994).

Fish coccidia are relatively understudied, and very little nucleotide data is available for them. In addition to the sequences of the *cox1* mtDNA gene from the common sunbleak, which were previously obtained in a similar experiment (Denikina et al., 2023b), only two sequences of representatives of the family Eimeriidae from fish are currently available in the NCBI database. The sequences of *G. bayae* from the gall bladder of the white perch (Matsche et al., 2019) and a sequence from the blood of the redlip blenny were also obtained. However, the latter, referred to as *Coccidia* sp. (NCBI: OR822199.1), actually belongs to a clade of a new widespread group of fish parasites of the Apicomplexa type, sister to the order Corallicolida and called "ichthyocolids" by the authors (Bonacolta et al., 2024). Based on the above, these data were not included in the phylogenetic analysis. The phylogenetic tree was constructed using data from representatives of the family Eimeriidae of vertebrates; the sequence of the *Toxoplasma gondii* mtDNA *cox1* gene was represented as an outgroup (Nicolle & Manceaux, 1908) (Table 1, Fig. 1).

Table 1. The *cox1* gene nucleotide sequence numbers from the NCBI database used in the analysis.

Host	No.No. NCBI; Species
Mammalia: Placentalia	MN260359; MN260361; MN260362; MN260363; MN260364; MN316534; MN316535; <i>Cyclospora cayetanensis</i> Ortega, Gilman & Sterling, 1994 KP025693; <i>Eimeria flavescens</i> Marotel & Guilhon, 1941 KT203398; <i>Eimeria mephitidis</i> Andrews 1928 JQ993698; <i>Eimeria piriformis</i> Kotlan & Pospesch, 1934 HM771687; KX495130; OL770312; <i>Eimeria zuernii</i> (Rivolta, 1878) Martin, 1909 MN077082; <i>Toxoplasma gondii</i> (Nicolle & Manceaux, 1908)
Mammalia: Marsupialia	MK202809; <i>Eimeria gaimardi</i> Barker, O'Callaghan, and Beveridge, 1988 MK202808; <i>Eimeria mundayi</i> Barker, O'Callaghan, and Beveridge, 1988 MK202807; <i>Eimeria potoroi</i> Barker, O'Callaghan, and Beveridge, 1988 JN192136; <i>Eimeria trichosuri</i> O'Callaghan & O'Donoghue, 2001 MK202806; <i>Eimeria woyliei</i> Northover et al., 2019
Reptilia	KF859856; <i>Caryospora bigenetica</i> Wacha and Christensen, 1982 KR108297; MW720599; <i>Isoospora amphiboluri</i> Cannon, 1967 MW720599; <i>Isoospora lunulatae</i> Yang, Brice, Berto & Zahedid, 2021
Aves	EF158855; <i>Eimeria acervulina</i> Tyzzer, 1929 MH758793; <i>Eimeria anseris</i> (Kotlan, 1932) HM771675; <i>Eimeria brunetti</i> Levine, 1942 JQ659301; KX094945; <i>Eimeria praecox</i> Johnson, 1930 MF497440; <i>Eimeria tenella</i> (Railliet & Lucet, 1891) Fantham, 1909 KC346355; <i>Isoospora gryphoni</i> Olson, Gissing, Barta & Middleton, 1998 KT224377; <i>Isoospora manorinae</i> Yang, Brice, Jian & Ryan 2016 NC_065382; <i>Isoospora picoflavae</i> Rejman, Hak-Kovacs & Barta, 2021 ON584773; <i>Isoospora serini</i> (Aragao, 1933) KX276860; <i>Isoospora serinuse</i> Yang, Brice, Elliot & Ryan 2015
Amphibia	KT184381; <i>Lankesterella minima</i> (Chaussat, 1850) Nöller, 1912
Actinopteri	PP590353; PP590354; PP590355; PP590356; Eimeriidae MH792860; <i>Goussia bayae</i> Matsche, Adams & Blazer, 2019

It is important to note that for all currently available sequences of the family Eimeriidae from fish, the closest homologs are those of parasites from homeothermic animals and birds: *G. bayae* is homologous to *Choleoecimeria taggarti* (Amery-Gale et al., 2018) Kruth, Michel, Amery-Gale & Barta, 2020 (79.33%, NCBI: MK813349) from the yellow-footed antechinus *Antechinus flavipes flavipes* (Waterhouse, 1838). Representatives of the family Eimeriidae from the belica are most closely related to *Eimeria praecox* (Johnson, 1938) (82.95%, NCBI: KX094945) from the red junglefowl *Gallus gallus* (Linnaeus, 1758); *Isoospora serini* (Aragao, 1933) (84.62%, NCBI: ON584773) and *Isoospora serinuse* (Yang, Brice, Elliot & Ryan, 2015) (82.37%; NCBI: KX276860) from the common canary *Serinus canaria* (Linnaeus, 1758). A comparative analysis of the nucleotide sequences revealed a high degree of similarity between representatives of the family Eimeriidae from Godlewski's sculpin and parasites of marsupials (Table 2).

Analysis of phylogenetic relationships based on the *cox1* mtDNA nucleotide sequences proved to be

uninformative; the tree was unresolved with low support. However, representatives of the family Eimeriidae of fish have formed basal branches. The phylogenetic reconstruction based on translated amino acid sequences (Fig. 1) demonstrates that representatives of the family Eimeriidae from fishes are reliably located at the base of the tree. The hypothesis that fish coccidia were the source of all known coccidia lineages in other vertebrates (Rosenthal et al., 2016; Xavier et al., 2018; Matsche et al., 2019; Denikina et al., 2023b) was indirectly confirmed.

It has been previously suggested that the *cox1* gene fragment has sufficient phylogenetic potential to contribute to the resolution of the apparent paraphyly within coccidia (Ogedengbe et al., 2011). The results obtained do not allow us to definitely confirm this hypothesis, as data on *cox1* mtDNA sequences of representatives of the genera *Eimeria*, *Calyptospora*, and *Goussia* from fish are currently insufficient. For the above reasons, it is premature to determine to which genus the detected representative of the family Eimeriidae belongs.

Metagenomic studies (metabarcoding) of eukaryotes from marine and terrestrial ecosystems have shown the high diversity and dominance of Apicomplexa representatives (Mahé et al., 2017; Lentendu et al., 2018), which are parasites of invertebrates and vertebrates, and have complex life cycles that differ significantly between groups (Votýpka et al., 2016; Rueckert et al., 2019). The family Eimeriidae is the most diverse taxon of protozoa. The main characteristic of its representatives is the formation of environmentally stable oocysts, that are released with the host's feces. The general morphology of the oocysts, as well as the number of sporocysts and sporozoites are commonly used to identify individual genera. However, the results of recent phylogenetic studies correlate poorly with current taxonomy. They have also shown that several diagnostic traits thought to be unique and are also found in representatives of several genetically distant genera (Votýpka et al., 2016). It is now known that members of the genera *Eimeria*, *Goussia* and *Calyptospora* are most commonly found in various species of marine and freshwater fish (Xavier et al., 2018).

Previously, five species of coccidia were identified in fish from Lake Baikal (Shulman and Zaika, 1964; Zaika, 1965; Pronina, 1990), and only one was observed in representatives of the Cottidae family:

1. *Goussia carpelli* (Leger et Stankovitch, 1921) (Syn.: *Eimeria carpelli* (Leger et Stankovitch, 1921); *E. cyprini* (Plehn, 1924); *Goussia carpelli* sensu (Dykova et Lom, 1983). The parasite is localized in the intestinal and gall bladder walls of the bighead sculpin *Batrachocottus baicalensis* (Dybowski, 1874), the sandy sculpin *Leocottus kesslerii* (Dybowski, 1874), the broad-snout sculpin *Abyssocottus (Cyphocottus) eurystomus* (Taliev, 1955), and the siberian river minnow *Phoxinus rivularis* (Pallas, 1773).

2. *Goussia leucisci* (Schulman et Zaika, 1964) Lom, Desser, Dykova, 1989 (Syn.: *Eimeria leucisci* (Schulman et Zaika, 1964); *E. freemani* (Molnar et Fernando, 1974); *Goussia freemani* (Molnar et Fernando, 1974)). The parasite is localized in the kidneys and in the walls of the gall bladder of the Siberian dace *Leuciscus baicalensis* (Dybowski, 1874).

3. *Eimeria esoci* Schulman et Zaika, 1964. The parasite is localized in the intestinal and gall bladder walls of the northern pike *Esox lucius* (Linnaeus, 1758).

4. *Eimeria percae* (Riviere, 1914) (Syn.: *Coccidium percae* Riviere, 1914; *Eimeria percae*

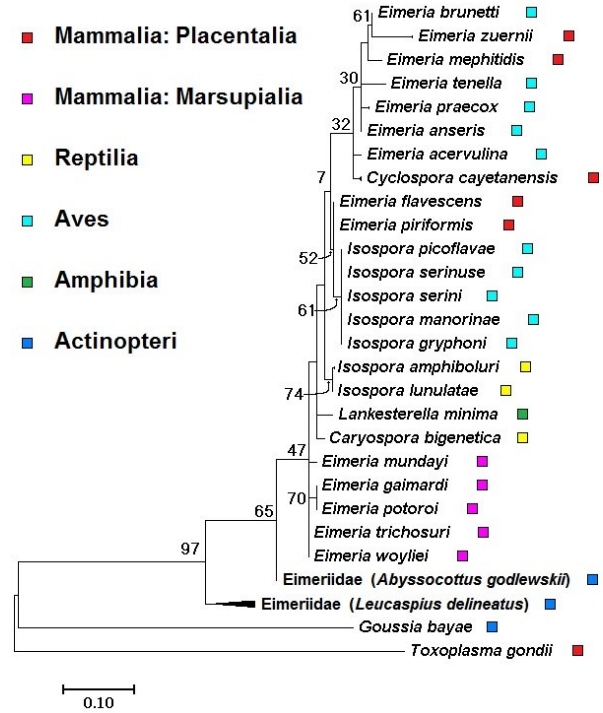


Fig.1. A phylogenetic tree of representatives of the family Eimeriidae constructed using the maximum likelihood method based on translated amino acid sequences of the mtDNA *cox1* gene fragments. *T. gondii* as an outgroup

Reichenow, 1921; *E. rivieri* Yakimoff, 1929). The parasite is localized in the intestinal walls and kidneys of the European perch *Perca fluviatilis* (Linnaeus, 1758).

5. *Eimeria* sp. The parasite is localized in the intestinal walls of the Baikal omul *Coregonus migratorius* (Georgi, 1775).

One species, *G. carpelli*, has previously been recorded in representatives of the family Cottidae, including coastal species of the bigheaded and sand sculpins, as well as in the deep-water species, the broad-snout sculpin. For the parasitic protozoa Apicomplexa, which are transmitted and spread by oral-fecal means, the resistance of the oocysts to environmental factors is of great importance (Clopton et al., 2016). Due to these properties, they can be detected in a variety of environmental samples, including paleontological samples (Rueckert et al., 2011; Côté and Le Bailly, 2018; Le Bailly et al., 2019; Singer et al., 2020; Beltrame et al.,

Table 2. The estimation of evolutionary divergence between sequence groups. The standard errors are given above the diagonal

	1	2	3	4	5	6	7
1. Eimeriidae (<i>Abyssocottus godlewskii</i>)		0.029	0.062	0.019	0.020	0.022	0.076
2. Eimeriidae (<i>Leucaspium delineatus</i>)	0.119		0.047	0.026	0.024	0.021	0.069
3. <i>Goussia bayae</i>	0.385	0.271		0.053	0.049	0.050	0.065
4. Mammalia: Marsupialia	0.061	0.105	0.315		0.010	0.012	0.077
5. Reptilia + Amphibia	0.070	0.102	0.293	0.020		0.004	0.068
6. Mammalia: Placentalia + Aves	0.087	0.089	0.303	0.034	0.010		0.069
7. <i>Toxoplasma gondii</i>	0.486	0.450	0.423	0.487	0.433	0.443	

2022). Oocysts, including those of the genera *Eimeria* and *Goussia*, may be present in the external environment, including bottom sediments (Siński and Behnke, 2004). In coccidia of aquatic animals, young oocysts are usually released with the feces that are not sporulated and are not infectious, as their development is terminated only in the external environment, where the formation of sporocysts with sporozoites occurs (Votýpka et al., 2016). Two modes of transmission are observed in the life cycle of coccidia in fish: direct with fecal contamination and indirect, which includes invertebrates (Steinhagen and Korting, 1988; Davis and Ball, 1993). It can therefore be assumed that the DNA of a representative of the family Eimeriidae could enter the digestive tract of Godlewski's sculpin with equal probability in two ways: directly from the external environment and/or indirectly via its food objects.

Sequences derived from representatives of the family Eimeriidae accounted for <0.01% of all metagenomic DNA sequencing data from the contents of the digestive tract of fish. However, we cannot currently confirm whether the parasite we detected is specific to the Godlewski's sculpin. *G. carpelli*, which is found in members of the family Cottidae, is considered a specific parasite of the common carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) (Molnár et al., 2005). However, other fish species on its host list have their own separate coccidia species (Sokolov and Moshu, 2014). In this context, a comprehensive morphological and molecular genetic study of these parasites is required, with particular attention to the widespread *G. carpelli* from different systematic fish groups.

4. Conclusion

When analyzing the metagenomic DNA sequencing data of the Godlewski's sculpin digestive tract contents with a relative representation of <0.01%, sequences from representatives of the family Eimeriidae were detected for the first time. The sequences obtained belonged to the only haplotype that was reliably different from all previously known. In contrast to the analysis of the nucleotide sequences of the *cox1* mtDNA, the phylogenetic reconstruction based on translated amino acid sequences reliably demonstrated the basal location of the branches of representatives of the family Eimeriidae in fish. The question of the genus of the detected organism remains unresolved due to the limited nucleotide data for representatives of the genera *Eimeria*, *Calyptospora*, and *Goussia* in fish. The results obtained indicate the need for targeted and complex studies, including molecular genetic studies, of the fauna of parasitic protozoa in fish.

Acknowledgements

The authors are grateful to the team of the R/V "G.Yu. Vereshchagin" for assistance in collecting the samples and Sergej Kirilchik for his valuable assistance in preparing the manuscript. The work was supported by the State projects No. 121032300224-8 and 121032300196-8.

Conflict of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Altschul S.F., Gish W., Miller W. et al. 1990. Basic local alignment searchtool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410. DOI: [10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- 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)
- Beltrame M.O., Tietze E., Cañal V. et al. 2022. Paleogenetic and microscopic studies of *Eimeria* spp. (Apicomplexa: Eimeriidae) as a tool to reveal the zoological origin of coprolites: The case of study of artiodactyl coprolites from an archeological site from Patagonia, Argentina. *The Holocene* 32(11): 1144-1150. DOI: [10.1177/09596836221114287](https://doi.org/10.1177/09596836221114287)
- Bogdanov B.E. 2017. Review of genus *Limnocottus* sculpins (Pisces: Cottidae): nomenclature, phenetic relationships and diagnostic characters. *Baikalskij zoologičeskij žurnal [Baikal Zoological Journal]* 2(21): 46-55. (in Russian)
- Bogdanov B.E. 2023. The Sculpins (Perciformes: Cottidae) of Lake Baikal and Baikal region: updated checklist with the description of new tax. *Limnology and Freshwater Biology* 6(3): 63-95. DOI: [10.31951/2658-3518-2023-A-3-63](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2023-A-3-63)
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30: 2114-2120. DOI: [10.1093/bioinformatics/btu170](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170)
- Bonacolta A.M., Krause J., Smit N. et al. 2024. A new and widespread group of fish apicomplexan parasites. *Current Biology*: 1-28. DOI: [10.2139/ssrn.4698405](https://doi.org/10.2139/ssrn.4698405)
- Clopton R.E., Steele S.M., Clopton D.T. 2016. Environmental persistence and infectivity of oocysts of two species of gregarines, *Blabericola migrator* and *Blabericola cubensis* (Apicomplexa: Eugregarinida: Blabericolidae), parasitizing Blaberid Cockroaches (Dictyoptera: Blaberidae). *Journal of Parasitology* 102(2): 169-173. DOI: [10.1645/15-934](https://doi.org/10.1645/15-934)
- Côté N.M.-L., Le Bailly M. 2018. Palaeoparasitology and palaeogenetics: review and perspectives for the study of ancient human parasites. *Parasitology* 145(5): 656-664. DOI: [10.1017/S003118201700141X](https://doi.org/10.1017/S003118201700141X)
- Davis A.J., Ball S.J. 1993. The biology of fish Coccidia. *Advances in Parasitology* 32: 293-366.
- Denikina N.N., Kulakova N.V., Bukin Y.S. et al. 2023. The first detection of DNA of *Caryophyllaeus laticeps* (Pallas, 1781) in sunbleak *Leucaspis delineates* (Heckel, 1843). *Limnology and Freshwater Biology* 2023 (1): 1-10. DOI: [10.31951/2658-3518-2023-A-1-1](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2023-A-1-1)
- Denikina N.N., Kulakova N.V., Bukin Y.S. et al. 2023. Phylogenetic analysis of coccidia (Apicomplexa: Eimeriorina) in the belica *Leucaspis delineatus* (Heckel, 1843). *Limnology and Freshwater Biology* 6(4): 104-118. DOI: [10.31951/2658-3518-2023-A-4-104](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2023-A-4-104)
- Harms-Tuohy C.A., Schizas N.V., Appeldoorn R.S. 2016. Use of DNA metabarcoding for stomach content analysis in the invasive lionfish *Pterois volitans* in Puerto Rico. *Marine Ecology-Progress Series* 558: 181-191. DOI: [10.3354/meps11738](https://doi.org/10.3354/meps11738)
- Jakubavičiūtė E., Bergström U., Eklöf J.S. et al. 2017. DNA metabarcoding reveals diverse diet of the three-spined stickleback in a coastal ecosystem. *PLoS One* 12(10): e0186929. DOI: [10.1371/journal.pone.0186929](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186929)
- 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)

- 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)
- Kvist S. 2013. Barcoding in the dark? A critical view of the sufficiency of zoological DNA barcoding databases and a plea for broader integration of taxonomic knowledge. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69(1): 39-45. DOI: [10.1016/j.ympev.2013.05.012](https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.05.012)
- Le Bailly M., Goepfert N., Prieto G. et al. 2019. Camelid gastrointestinal parasites from the archaeological site of Huanchaquito (Peru): first results. *Environmental Archaeology* 25(3): 325-332. DOI: [10.1080/14614103.2018.1558804](https://doi.org/10.1080/14614103.2018.1558804)
- 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)
- Lentendu G., Mahé F., Bass D. et al. 2018. Consistent patterns of high alpha and low beta diversity in tropical parasitic and free-living protists. *Molecular Ecology* 27: 2846-2857. DOI: [10.1111/mec.14731](https://doi.org/10.1111/mec.14731)
- 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): 1-13. DOI: [10.1186/1742-9994-10-34](https://doi.org/10.1186/1742-9994-10-34)
- Mahé F., de Vargas C., Bass D. et al. 2017. Parasites dominate hyperdiverse soil protist communities in Neotropical rainforests. *Nature Ecology & Evolution* 1 (0091): 1-8. DOI: [10.1038/s41559-017-0091](https://doi.org/10.1038/s41559-017-0091)
- Matsche M.A., Adams C.R., Blazer V.S. 2019. Newly described coccidia *Goussia bayae* from White Perch *Morone americana*: morphology and phylogenetics support emerging taxonomy of *Goussia* within piscine hosts. *Journal of Parasitology* 105(1): 1-10. DOI: [10.1645/18-67](https://doi.org/10.1645/18-67)
- 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.
- 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*. New York: Oxford University Press.
- Nurk S., Meleshko D., Korobeynikov A. et al. 2017. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome research* 27(5): 824-834. DOI: [10.1101/gr.213959.116](https://doi.org/10.1101/gr.213959.116)
- Ogedengbe J.D., Hanner R.H., Barta J.R. 2011. DNA barcoding identifies *Eimeria* species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriina, Apicomplexa, Alveolata). *International Journal for Parasitology* 41(8): 843-850. DOI: [10.1016/j.ijpara.2011.03.007](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.03.007)
- 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)
- Pronina S.V. 1990. First information about the coccidia *Eimeria* sp. in the Baikal omul *Coregonus autumnalis migratorius*. In: IX All-Union Meeting on Parasites and Diseases of Fish. Leningrad, pp. 104-105. (in Russian)
- 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)
- Rueckert S., Betts E.L., Tsaousis A.D. 2019. The Symbiotic spectrum: where do the Gregarines fit? *Trends in Parasitology* 35(9): 687-694. DOI: [10.1016/j.pt.2019.06.013](https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.06.013)
- Rueckert S., Simdyanov T.G., Aleoshin V.V. et al. 2011. Identification of a divergent environmental DNA sequence clade using the phylogeny of gregarine parasites (Apicomplexa) from crustacean hosts. *PLoS ONE* 6(3): e18163. DOI: [10.1371/journal.pone.0018163](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018163)
- Sakaguchi S.O., Shimamura S., Shimizu Y. et al. 2017. Comparison of morphological and DNA-based techniques for stomach content analyses in juvenile chum salmon *Oncorhynchus keta*: A case study on diet richness of juvenile fishes. *Fisheries Science* 83: 47-56. DOI: [10.1007/s12562-016-1040-6](https://doi.org/10.1007/s12562-016-1040-6)
- Shulman S.S., Zaika V.E. 1964. Coccidia fishes of Lake Baikal. In: Proceedings of the Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, a series of biological and medical sciences, 8, pp. 126-130. (in Russian)
- Siddall M.E., Kvist S., Phillips A. et al. 2012. DNA Barcoding of Parasitic Nematodes: Is it Kosher? *Journal of Parasitology* 98(3): 692-694. DOI: [10.1645/GE-2994.1](https://doi.org/10.1645/GE-2994.1)
- Singer D., Duckert C., Heděnc P. et al. 2020. High-throughput sequencing of litter and moss eDNA reveals a positive correlation between the diversity of Apicomplexa and their invertebrate hosts across alpine habitats. *Soil Biology and Biochemistry* 147: 107837. DOI: [10.1016/j.soilbio.2020.107837](https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107837)
- Siński E., Behnke J.M. 2004. Apicomplexan parasites: environmental contamination and transmission. *Polish Journal of Microbiology* 53: 67-73.
- Sokolov S.G., Moshu A.Ja. 2014. *Goussia obstinata* sp. n. (Sporozoa: Eimeriidae), a new coccidian species from intestines of the amur sleeper *Percocottus glenii* Dybowski, 1877 (Perciformes: Odontobutidae) *Parazitologija* [Parasitology] 48(5): 382-392. (in Russian)
- Steinhagen D., Korting W. 1988. Experimental transmission of *Goussia carpelli* (Leger; Stankovitch, 1921, Protista: Apicomplexa) to common carp, *Cyprinus carpio* L. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 8: 112-112.
- 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)
- Villsen K., Corse E., Archambaud-Suard G. et al. 2022. Diet metabarcoding reveals extensive dietary overlap between two benthic stream fishes (*Zingel asper* and *Cottus gobio*) and provides insights into their coexistence. *Diversity* 14(5): 412. DOI: [10.3390/d14050412](https://doi.org/10.3390/d14050412)
- Votýpka J., Modrý D., Oborník M. et al. 2016. Apicomplexa. *Handbook of the Protists*, 1-58. DOI: [10.1007/978-3-319-32669-6_20-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-32669-6_20-1)
- 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)
- Yoon T.-H., Kang H.-E., Lee S.R. et al. 2017. Metabarcoding analysis of the stomach contents of the Antarctic Toothfish (*Dissostichus mawsoni*) collected in the Antarctic Ocean. *PeerJ* 5: e3977. DOI: [10.7717/peerj.3977](https://doi.org/10.7717/peerj.3977)
- Zaika V.E. 1965. Parasite fauna of fishes of Lake Baikal. Moscow: Nauka. (in Russian)

Первое обнаружение ДНК кокцидий (Conoidasida: Eimeriidae) у широколобки Годлевского *Abyssocottus (Limnocottus) godlewskii* (Dybowski, 1874)

Дзюба Е.В.¹, Букин Ю.С.¹, Ханаев И.В.¹, Богданов Б.Э.¹, Яхненко А.С.¹, Сапожникова Ю.П.^{1*}, Деникина Н.Н.¹

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

АННОТАЦИЯ. Впервые в пищеварительном тракте широколобки Годлевского *Abyssocottus (Limnocottus) godlewskii* (Dybowski, 1874) методом высокопроизводительного секвенирования получены фрагменты гена *cox1* представителя семейства Eimeriidae. Детектированные нуклеотидные последовательности кокцидий составили < 0,01% от общего массива данных и принадлежали единственному генотипу, достоверно отличавшемуся от всех ранее известных. Филогенетическая реконструкция на основании транслированных аминокислотных последовательностей достоверно продемонстрировала базальное расположение ветвей представителей сем. Eimeriidae из рыб. Вопрос о родовой принадлежности детектированного организма остается открытым из-за недостаточного количества нуклеотидных данных представителей родов *Eimeria*, *Calyptospora* и *Goussia* из рыб.

Ключевые слова: Eimeriidae, *Abyssocottus (Limnocottus) godlewskii* (Dybowski, 1874), ген *cox1*, озеро Байкал

Для цитирования: Дзюба Е.В., Букин Ю.С., Ханаев И.В., Богданов Б.Э., Яхненко А.С., Сапожникова Ю.П., Деникина Н.Н. Первое обнаружение ДНК кокцидий (Conoidasida: Eimeriidae) у широколобки Годлевского *Abyssocottus (Limnocottus) godlewskii* (Dybowski, 1874) // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 5. - С. 1206-1218. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-5-1206

1. Введение

Анализ фауны паразитов рыб является необходимой частью исследований, посвященных вопросам их экологии. Преимущество молекулярно-генетического подхода с использованием современных технологий высокопроизводительного секвенирования заключается в возможности анализа и идентификации относительно коротких фрагментов чужеродной ДНК из содержимого пищеварительного тракта, органов и тканей рыб. Эти методы эффективны за счет высокого разрешения и возможности идентификации широкого спектра видов (Harms-Tuohy et al., 2016; Jakubavičiūtė et al., 2017; Yoon et al., 2017). Несмотря на ряд недостатков, таких как неточная идентификация видов из-за отсутствия их генетических данных в общедоступных базах (Siddall et al., 2012; Kvist, 2013) и детекция ДНК организмов из пищеварительных трактов кормовых объектов (Sakaguchi et al., 2017), метабаркодирование может дополнять традиционные методы исследования фауны паразитов рыб (Ogedengbe et al., 2011; Villsen et al., 2022; Деникина и др., 2023а; b).

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 родов *Cryptosporidium*, *Plasmodium*, *Toxoplasma* и *Babesia* являются возбудителями заболеваний человека и животных. Кокцидии (Conoidasida: Eimeriidae) наносят значительный урон сельскохозяйственному производству. 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 их классификации (Ogedengbe et al., 2018; Xavier et al., 2018). При этом представители семейства Eimeriidae у водных животных изу-

*Автор для переписки.

Адрес e-mail: jsap@mail.ru (Ю.П. Сапожникова)

Поступила: 19 июня 2024; Принята: 04 сентября 2024;
Опубликована online: 31 октября 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



чены 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; Деникина и др., 2023b). В настоящее время в базе NCBI зарегистрированы последовательности гена *cox1* мтДНК Eimeriidae из следующих видов рыб: красногубая морская собачка *Ophioblennius macclurei* (Silvester, 1915), белый американский лаврак *Morone americana* (Gmelin, 1789) и обыкновенная верховка *Leucaspius delineatus* (Heckel, 1843).

Широколобка Годлевского *Abyssocottus (Limnocottus) godlewskii* (Dybowski, 1874) – эндемичный вид озерных широколобок, обитающий на глубинах от 100 до 900 м (Богданов, 2023). Сложности в исследованиях экологии и фауны паразитов глубоководных видов вызваны малым количеством выборок рыб в связи с трудоемким процессом отлова. В результате исследования пищевого спектра широколобки Годлевского с использованием методов секвенирования нового поколения были получены последовательности кокцидий. Целью работы являлось определение филогенетического положения представителя сем. Eimeriidae из пищеварительного тракта широколобки Годлевского.

2. Материалы и методы

Сбор проб осуществляли с борта научно-исследовательского судна «Г.Ю. Верещагин» в сентябре 2019 г. в районе створа Чивыркуйского залива озера Байкал (53°59.674'N, 109°09.086'E) с глубин от 790 до 820 м. Видовую принадлежность рыб идентифицировали в соответствии с последними ревизиями (Богданов, 2017; 2023). Для анализа использовали пять особей широколобки Годлевского массой от 8,7 до 28,5 г, общей длиной от 95 до 149 мм.

В лабораторных условиях содержимое всего пищеварительного тракта (250-700 мкл) от каждого отдельно взятого экземпляра разводили равным объемом воды *mQ*, измельчали и тщательно перемешивали. Суммарную ДНК выделяли с помощью набора для экстракции «АмплиСенс ДНК-сорб-АМ» (Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Фрагмент гена *cox1* длиной приблизительно 350 пар оснований амплифицировали для каждой пробы 30 циклов с понижением температуры отжига на 0.3°C от начальных 55°C с праймерами MiSeq: COIintF 5'tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagGGWACWGGWTGAACWGTWTAAYCCYCC и dgHCO2198 5'gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagTAIACYTCIGGRTGICRAARAAYCA (Leray et al., 2013). Все ампликоны из пищеварительного тракта объединяли и использовали для подготовки пробы к секвенированию.

Библиотеку из очищенного пула ампликонов сконструировали с использованием набора Nextera XT (Illumina, Хейворд, Калифорния, США), нуклеотидные последовательности определяли с помощью Illumina NextSeq. Регистрационный номер полученных данных в международной базе NCBI: PRJNA1086215.

Все исходные данные триммировали по качеству в программе Trimmomatic V 0.39 (Bolger et al., 2014) с опциями: среднее качество прочтения 20, минимальная длина прочтения 140. Сборку исходных прочтений в контиги, соответствующие полно-размерным продуктам амплификации, проводили в программе metaSPAdes (Nurk et al., 2017) длинами *k-mer* 21, 33, 55, 77, 99 и 121. Выбранные длины *k-mer* позволили привести агрегацию в единые контиги только прочтений, специфичных первоначальным фрагментам *cox1* смеси ДНК различных видов метагеномного образца.

В качестве референсной базы данных для таксономического анализа использовали полный набор последовательностей маркера *cox1* из International Barcode of Life Database (iBOL) (<https://ibol.org/>). Последовательности ДНК сборки ампликонов сопоставляли с референсной базой данных с помощью приложения local BLASTn (Altschul et al., 1990). Результаты BLAST анализа преобразовывали в таблицу представленности таксонов в ДНК содержимого пищевого тракта хозяина. Первичную обработку полученных нуклеотидных последовательностей представителей семейства Eimeriidae и соответствующих данных, представленных в базе NCBI (Таблица 1), проводили в редакторе BioEdit, выравнивали с помощью программы ClustalW. Последовательность зарегистрирована в NCBI № PP552829. Филогенетический анализ, включая выбор моделей для оценки эволюционной дивергенции и реконструкции эволюционной истории, проводили с использованием программы MEGA7 (Kumar et al., 2016). Эволюционную дивергенцию между группами последовательностей оценивали методом максимального правдоподобия по модели Тамуры-Нея (TN DNA evolutionary model) (Tamura and Nei, 1993). Филогенетическую реконструкцию эволюционной истории, основанной на аминокислотных последовательностях, проводили методом максимального правдоподобия по модели Ли-Гаскуэля с гамма коррекцией различий в скоростях накопления замен в различных сайтах (LG + G protein evolutionary model) (Nei and Kumar, 2000; Le and Gascuel, 2008). Тестирование достоверности топологии филогенетических деревьев проводилось непараметрическим бустером (1000 реплик).

3. Результаты и обсуждение

В результате анализа данных метагеномного секвенирования ДНК содержимого пищеварительных трактов широколобки Годлевского были детектированы последовательности представителей сем. Eimeriidae с относительной представленностью < 0,01%. Полученные последовательности принадлежали единственному гаплотипу, достоверно отличающемуся от всех известных последовательностей гена *cox1* кокцидий, включая *G. bayaе* и Eimeriidae из обыкновенной верховки, и продемонстрировавшему наибольшую степень гомологии (86,71%) с нуклеотидными последовательностями *Cyclospora cayetanensis* Ortega, Gilman & Sterling, 1994.

Кокцидии рыб сравнительно малоизучены и нуклеотидные данные для них крайне скудны. Кроме последовательностей гена *cox1* мтДНК из обыкновенной верховки, полученных нами ранее в аналогичном эксперименте (Деникина и др., 2023b), в базе NCBI представлены только две последовательности представителей сем. Eimeriidae из рыб: *G. bayae* из желчного пузыря *M. americana* (Matsche et al., 2019) и последовательность из крови *O. macclurei*. Однако последняя, заявленная как *Coccidia* sp. (NCBI: OR822199.1), в действительности принадлежит представителю клады новой широко распространенной группы паразитов рыб типа Apicomplexa, сестринской отряду Corallicolida и названная авторами «ichthyocolids» (Bonacolta et al., 2024). Исходя из вышесказанного, эти данные в филогенетическом анализе не рассматривали. При построении филогенетического дерева использованы данные представителей сем. Eimeriidae позвоночных животных, в качестве аут-группы представлена последовательность гена *cox1* мтДНК *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1908) (Таблица 1, Рис. 1).

Следует отметить, что для всех имеющихся в настоящее время последовательностей сем. Eimeriidae из рыб, ближайшими гомологами являются последовательности паразитов из теплокровных животных и птиц: *G. bayae* гомологична *Choleoecimeria taggarti* (Amery-Gale et al., 2018) Kruth, Michel, Amery-Gale & Barta, 2020 (79,33%, NCBI: MK813349) из желтоногой сумчатой мыши *Antechinus flavipes flavipes* Waterhouse, 1838. Представители сем. Eimeriidae из обыкновенной верховки наиболее близки к *Eimeria praecox* (Johnson, 1938) (82,95%, NCBI: KX094945) из банкивской джунглевой курицы *Gallus gallus* (Linnaeus, 1758); *Isospora serini* (Aragao, 1933) (84,62%, NCBI: ON584773) и *Isospora serinuse* (Yang, Brice, Elliot & Ryan 2015) (82,37%; NCBI: KX276860) из канарского канареющего вьюрка *Serinus canaria* (Linnaeus, 1758). Анализ эволюционной дивергенции между группами нуклеотидных последовательностей выявил близость представителей Eimeriidae из широколобкой Годлевского к паразитам сумчатых животных (Таблица 2).

Таблица 1. Номера нуклеотидных последовательностей гена *cox1* из базы данных NCBI, использованные в анализе.

Хозяин	№№ NCBI; вид
Mammalia: Placentalia	MN260359; MN260361; MN260362; MN260363; MN260364; MN316534; MN316535; <i>Cyclospora cayetanensis</i> Ortega, Gilman & Sterling, 1994 KP025693; <i>Eimeria flavescens</i> Marotel & Guilhon, 1941 KT203398; <i>Eimeria mephitidis</i> Andrews 1928 JQ993698; <i>Eimeria piriformis</i> Kotlan & Pospesch, 1934 HM771687; KX495130; OL770312; <i>Eimeria zuernii</i> (Rivolta, 1878) Martin, 1909 MN077082; <i>Toxoplasma gondii</i> (Nicolle & Manceaux, 1908)
Mammalia: Marsupialia	MK202809; <i>Eimeria gaimardi</i> Barker, O'Callaghan, and Beveridge, 1988 MK202808; <i>Eimeria mundayi</i> Barker, O'Callaghan, and Beveridge, 1988 MK202807; <i>Eimeria potoroii</i> Barker, O'Callaghan, and Beveridge, 1988 JN192136; <i>Eimeria trichosuri</i> O'Callaghan & O'Donoghue, 2001 MK202806; <i>Eimeria woyliei</i> Northover et al., 2019
Reptilia	KF859856; <i>Caryospora bigenetica</i> Wacha and Christiensen, 1982 KR108297; MW720599; <i>Isospora amphiboluri</i> Cannon, 1967 MW720599; <i>Isospora lunulatae</i> Yang, Brice, Berto & Zahedid, 2021
Aves	EF158855; <i>Eimeria acervulina</i> Tyzzer, 1929 MH758793; <i>Eimeria anseris</i> (Kotlan, 1932) HM771675; <i>Eimeria brunetti</i> Levine, 1942 JQ659301; KX094945; <i>Eimeria praecox</i> Johnson, 1930 MF497440; <i>Eimeria tenella</i> (Railliet & Lucet, 1891) Fantham, 1909 KC346355; <i>Isospora gryphoni</i> Olson, Gissing, Barta & Middleton, 1998 KT224377; <i>Isospora manorinae</i> Yang, Brice, Jian & Ryan 2016 NC_065382; <i>Isospora picoflavae</i> Rejman, Hak-Kovacs & Barta, 2021 ON584773; <i>Isospora serini</i> (Aragao, 1933) KX276860; <i>Isospora serinuse</i> Yang, Brice, Elliot & Ryan 2015
Amphibia	KT184381; <i>Lankesterella minima</i> (Chaussat, 1850) Nöller, 1912
Actinopteri	PP590353; PP590354; PP590355; PP590356; Eimeriidae MH792860; <i>Goussia bayae</i> Matsche, Adams & Blazer, 2019

Проведенный анализ филогенетических отношений на основании нуклеотидных последовательностей *cox1* мтДНК оказался малоинформативным: древо оказалось неразрешенным с низкими поддержками. Однако представители сем. Eimeriidae из рыб сформировали базальные ветви. В полученной филогенетической реконструкции на основании транслированных аминокислотных последовательностей (Рис. 1) представители сем. Eimeriidae из рыб достоверно располагаются в основании древа. Таким образом, ранее сформулированная 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; Matsche et al., 2019; Деникина и др., 2023b), нашла свое косвенное подтверждение.

Ранее было высказано предположение, что фрагмент гена *cox1* имеет достаточный филогенетический потенциал, чтобы помочь в разрешении очевидных парафилий внутри кокцидий (Ogedengbe et al., 2011). Полученные результаты не позволяют однозначно подтвердить эту гипотезу, поскольку пока данных о последовательностях *cox1* мтДНК представителей родов *Eimeria*, *Calyptospora* и *Goussia* из рыб явно недостаточно. По той же причине преждевременно утверждать, к какому роду относятся детектированный нами представитель сем. Eimeriidae.

Метагеномные исследования (метабаркодирование) эукариот морских и наземных экосистем продемонстрировали высокое разнообразие и доминирование представителей Apicomplexa (Mahé et al., 2017; Lentendu et al., 2018), которые являются паразитами беспозвоночных и позвоночных животных, и имеют сложные жизненные циклы, значительно различающиеся между группами (Votýpka et al., 2016; Rueckert et al., 2019). Семейство Eimeriidae – наиболее разнообразный таксон простейших, основной особенностью представителей которого является образование экологически устойчивых ооцист, которые выделяются с фекалиями хозяина. Общая морфология ооцист, а также количество спороцист и спорозоитов широко используются для определения отдельных родов. Однако, результаты последних филогенетических исследований плохо коррелируют с текущей таксономией. Они также показали, что несколько диагностических признаков, считавшихся до сих пор уникальными, на самом деле присутствуют у представителей

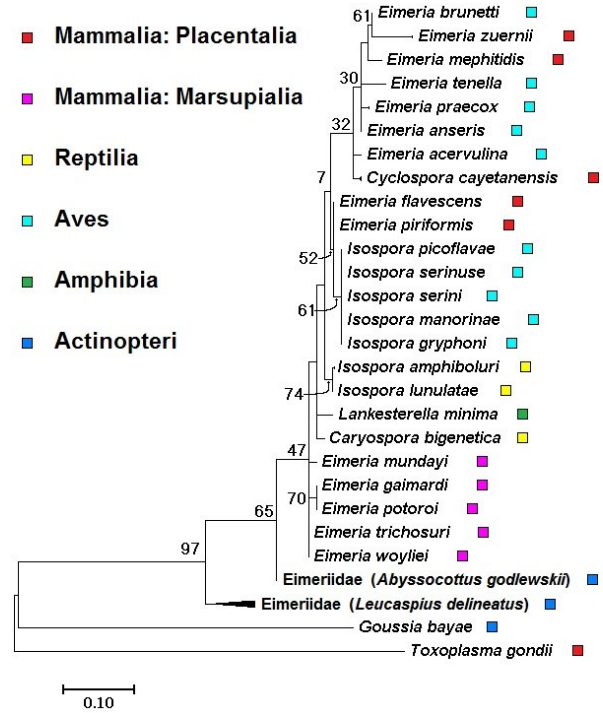


Рис.1. Филогенетическое древо представителей семейства Eimeriidae, построенное методом максимального правдоподобия на основании транслированных аминокислотных последовательностей фрагментов гена *cox1* мтДНК. В качестве аут-группы – *T. gondii*

нескольких генетически далеких родов (Votýpka et al., 2016). В настоящее время известно, что у различных видов морских и пресноводных рыб наиболее распространены представители родов *Eimeria*, *Goussia* и *Calyptospora* (Xavier et al., 2018).

Ранее у рыб из оз. Байкал было отмечено пять видов кокцидий (Шульман и Заика, 1964; Заика, 1965; Пронина, 1990), из которых только один у представителей семейства Cottidae:

1. *Goussia carpelli* (Leger et Stankovitch, 1921) (Syn.: *Eimeria carpelli* (Leger et Stankovitch, 1921); *E. cyprini* (Plehn, 1924); *Goussia carpelli* sensu (Dykova et Lom, 1983). Паразит локализован в стенках кишечника и желчного пузыря большоголовой широколобки *Batrachocottus baicalensis* (Dybowski, 1874), песчаной широколобки *Leocottus kesslerii* (Dybowski, 1874), ширококрылой широколобки *Abyssocottus (Cypnocottus) eurystomus* (Taliev, 1955) и сибирского речного гольяна *Phoxinus rivularis* (Pallas, 1773).

Таблица 2. Оценка эволюционной дивергенции между группами последовательностей. Стандартные погрешности показаны над диагональю

	1	2	3	4	5	6	7
1. Eimeriidae (<i>Abyssocottus godlewskii</i>)		0,029	0,062	0,019	0,020	0,022	0,076
2. Eimeriidae (<i>Leucaspis delineatus</i>)	0,119		0,047	0,026	0,024	0,021	0,069
3. <i>Goussia bayae</i>	0,385	0,271		0,053	0,049	0,050	0,065
4. Mammalia: Marsupialia	0,061	0,105	0,315		0,010	0,012	0,077
5. Reptilia + Amphibia	0,070	0,102	0,293	0,020		0,004	0,068
6. Mammalia: Placentalia + Aves	0,087	0,089	0,303	0,034	0,010		0,069
7. <i>Toxoplasma gondii</i>	0,486	0,450	0,423	0,487	0,433	0,443	

2. *Goussia leucisci* (Schulman et Zaika, 1964) Lom, Desser, Dykova, 1989 (Syn.: *Eimeria leucisci* (Schulman et Zaika, 1964); *E. freemani* (Molnar et Fernando, 1974); *Goussia freemani* (Molnar et Fernando, 1974)). Паразит локализован в почках и в стенках желчного пузыря сибирского ельца *Leuciscus baicalensis* (Dybowski, 1874).

3. *Eimeria esoci* Schulman et Zaika, 1964. Паразит локализован в стенках кишечника и желчного пузыря обыкновенной щуки *Esox lucius* Linnaeus, 1758.

4. *Eimeria percae* (Riviere, 1914) (Syn.: *Coccidium percae* Riviere, 1914; *Eimeria percae* Reichenow, 1921; *E. rivieri* Yakimoff, 1929). Паразит локализован в стенках кишечника и почках обыкновенного окуня *Perca fluviatilis* (Linnaeus, 1758).

5. *Eimeria* sp. Паразит локализован в стенках кишечника байкальского омуля *Coregonus migratorius* (Georgi, 1775).

У представителей семейства Cottidae: прибрежных видов большоголовой широколобки и песчаной широколобки, а также у глубоководного вида – ширококрылой широколобки ранее был отмечен один вид – *G. carpelli*.

Для паразитических простейших Apicomplexa, использующих орально-фекальный путь передачи и распространения, большое значение имеет устойчивость ооцист к действию факторов окружающей среды (Clopton et al., 2016). Эти особенности позволяют детектировать их в различных образцах окружающей среды, включая палеонтологические (Rueckert et al., 2011; Côté and Le Bailly, 2018; Le Bailly et al., 2019; Singer et al., 2020; Beltrame et al., 2022). Ооцисты, в том числе и представителей родов *Eimeria* и *Goussia*, могут присутствовать во внешней среде, в том числе и в донных осадках (Siński and Behnke, 2004). У кокцидий водных животных молодые ооцисты обычно выделяются с фекалиями неспорулированными и неинфекционными, так как их развитие прекращается лишь во внешней среде, где происходит образование спороцист со спорозитами (Votýrka et al., 2016). В жизненном цикле кокцидий рыб зарегистрировано два типа передачи: прямой с фекальным загрязнением и непрямой, который включает в себя беспозвоночных животных (Steinhagen and Korting, 1988; Davis and Ball, 1993). Соответственно, можно предположить, что ДНК представителя сем. Eimeriidae с равной долей вероятности могла поступить в пищеварительный тракт широколобки Годлевского двумя путями: прямым из внешней среды и/или непрямым из ее кормовых объектов.

Последовательности представителей Eimeriidae составляли <0,01% от всех данных метагеномного секвенирования ДНК содержимого пищеварительных трактов рыб. Однако, в настоящее время мы не можем утверждать, является ли детектированный нами паразит специфичным для широколобки Годлевского. *G. carpelli*, зарегистрированная у представителей семейства Cottidae, считается специфичным паразитом карпа *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758 (Molnár et al., 2005), а у других видов рыб из 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 *G. carpelli* из различных систематических групп рыб.

4. Заключение

Впервые в результате анализа данных метагеномного секвенирования ДНК содержимого пищеварительных трактов широколобки Годлевского были детектированы последовательности представителей сем. Eimeriidae с относительной представленностью <0,01%. Полученные последовательности принадлежали единственному гаплотипу, достоверно отличающемуся от всех ранее известных. В отличие от анализа нуклеотидных последовательностей *cox1* мтДНК, филогенетическая реконструкция на основании транслированных аминокислотных последовательностей достоверно продемонстрировала базальное расположение ветвей представителей сем. Eimeriidae из рыб. Вопрос о родовой принадлежности детектированного организма остается открытым из-за недостаточного количества нуклеотидных данных представителей родов *Eimeria*, *Calyptospora* и *Goussia* из рыб. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости проведения целенаправленных комплексных (включая молекулярно-генетические) исследований фауны паразитических простейших рыб.

Источники финансирования и благодарности

Авторы выражают благодарность команде НИС “Г.Ю. Верещагин” за помощь в сборе материала, а также Кирильчику С.В. за помощь в подготовке рукописи. Работа выполнена в рамках тем государственного задания № 121032300224-8 и 121032300196-8.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Altschul S.F., Gish W., Miller W. et al. 1990. Basic local alignment searchtool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410. DOI: [10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- 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)
- Beltrame M.O., Tietze E., Cañal V. et al. 2022. Paleogenetic and microscopic studies of *Eimeria* spp. (Apicomplexa: Eimeriidae) as a tool to reveal the zoological origin of coprolites: The case of study of artiodactyl coprolites from an archeological site from Patagonia, Argentina. *The Holocene* 32(11): 1144-1150. DOI: [10.1177/09596836221114287](https://doi.org/10.1177/09596836221114287)
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30: 2114-2120. DOI: [10.1093/bioinformatics/btu170](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170)

- Bonacolta A.M., Krause J., Smit N. et al. 2024. A new and widespread group of fish apicomplexan parasites. *Current Biology*: 1-28. DOI: [10.2139/ssrn.4698405](https://doi.org/10.2139/ssrn.4698405)
- Clopton R.E., Steele S.M., Clopton D.T. 2016. Environmental persistence and infectivity of oocysts of two species of gregarines, *Blabericola migrator* and *Blabericola cubensis* (Apicomplexa: Eugregarinida: Blabericolidae), parasitizing Blaberid Cockroaches (Dictyoptera: Blaberidae). *Journal of Parasitology* 102(2): 169-173. DOI: [10.1645/15-934](https://doi.org/10.1645/15-934)
- Côté N.M.-L., Le Bailly M. 2018. Palaeoparasitology and palaeogenetics: review and perspectives for the study of ancient human parasites. *Parasitology* 145(5): 656-664. DOI: [10.1017/S003118201700141X](https://doi.org/10.1017/S003118201700141X)
- Davis A.J., Ball S.J. 1993. The biology of fish Coccidia. *Advances in Parasitology* 32: 293-366.
- Harms-Tuohy C.A., Schizas N.V., Appeldoorn R.S. 2016. Use of DNA metabarcoding for stomach content analysis in the invasive lionfish *Pterois volitans* in Puerto Rico. *Marine Ecology-Progress Series* 558: 181-191. DOI: [10.3354/meps11738](https://doi.org/10.3354/meps11738)
- Jakubavičiūtė E., Bergström U., Eklöf J.S. et al. 2017. DNA metabarcoding reveals diverse diet of the three-spined stickleback in a coastal ecosystem. *PLoS One* 12(10): e0186929. DOI: [10.1371/journal.pone.0186929](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186929)
- 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)
- 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)
- Kvist S. 2013. Barcoding in the dark? A critical view of the sufficiency of zoological DNA barcoding databases and a plea for broader integration of taxonomic knowledge. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69(1): 39-45. DOI: [10.1016/j.ympev.2013.05.012](https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.05.012)
- Le Bailly M., Goepfert N., Prieto G. et al. 2019. Camelid gastrointestinal parasites from the archaeological site of Huanchaquito (Peru): first results. *Environmental Archaeology* 25(3): 325-332. DOI: [10.1080/14614103.2018.1558804](https://doi.org/10.1080/14614103.2018.1558804)
- 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)
- Lentendu G., Mahé F., Bass D. et al. 2018. Consistent patterns of high alpha and low beta diversity in tropical parasitic and free-living protists. *Molecular Ecology* 27: 2846-2857. DOI: [10.1111/mec.14731](https://doi.org/10.1111/mec.14731)
- 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): 1-13. DOI: [10.1186/1742-9994-10-34](https://doi.org/10.1186/1742-9994-10-34)
- Mahé F., de Vargas C., Bass D. et al. 2017. Parasites dominate hyperdiverse soil protist communities in Neotropical rainforests. *Nature Ecology & Evolution* 1(0091): 1-8. DOI: [10.1038/s41559-017-0091](https://doi.org/10.1038/s41559-017-0091)
- Matsche M.A., Adams C.R., Blazer V.S. 2019. Newly described coccidia *Goussia bayae* from White Perch *Morone americana*: morphology and phylogenetics support emerging taxonomy of *Goussia* within piscine hosts. *Journal of Parasitology* 105(1): 1-10. DOI: [10.1645/18-67](https://doi.org/10.1645/18-67)
- 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.
- 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*. New York: Oxford University Press.
- Nurk S., Meleshko D., Korobeynikov A. et al. 2017. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome research* 27(5): 824-834. DOI: [10.1101/gr.213959.116](https://doi.org/10.1101/gr.213959.116)
- Ogedengbe J.D., Hanner R.H., Barta J.R. 2011. DNA barcoding identifies *Eimeria* species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata). *International Journal for Parasitology* 41(8): 843-850. DOI: [10.1016/j.ijpara.2011.03.007](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.03.007)
- 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-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)
- Rueckert S., Betts E.L., Tsaousis A.D. 2019. The Symbiotic spectrum: where do the Gregarines fit? *Trends in Parasitology* 35(9): 687-694. DOI: [10.1016/j.pt.2019.06.013](https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.06.013)
- Rueckert S., Simdyanov T.G., Aleoshin V.V. et al. 2011. Identification of a divergent environmental DNA sequence clade using the phylogeny of gregarine parasites (Apicomplexa) from crustacean hosts. *PLoS ONE* 6(3): e18163. DOI: [10.1371/journal.pone.0018163](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018163)
- Sakaguchi S.O., Shimamura S., Shimizu Y. et al. 2017. Comparison of morphological and DNA-based techniques for stomach content analyses in juvenile chum salmon *Oncorhynchus keta*: A case study on diet richness of juvenile fishes. *Fisheries Science* 83: 47-56. DOI: [10.1007/s12562-016-1040-6](https://doi.org/10.1007/s12562-016-1040-6)
- Siddall M.E., Kvist S., Phillips A. et al. 2012. DNA Barcoding of Parasitic Nematodes: Is it Kosher? *Journal of Parasitology* 98(3): 692-694. DOI: [10.1645/GE-2994.1](https://doi.org/10.1645/GE-2994.1)
- Singer D., Duckert C., Heděnc P. et al. 2020. High-throughput sequencing of litter and moss eDNA reveals a positive correlation between the diversity of Apicomplexa and their invertebrate hosts across alpine habitats. *Soil Biology and Biochemistry* 147: 107837. DOI: [10.1016/j.soilbio.2020.107837](https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107837)
- Siński E., Behnke J.M. 2004. Apicomplexan parasites: environmental contamination and transmission. *Polish Journal of Microbiology* 53: 67-73.
- Steinhagen D., Korting W. 1988. Experimental transmission of *Goussia carpelli* (Leger; Stankovitch, 1921, Protista: Apicomplexa) to common carp, *Cyprinus carpio* L. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 8: 112-112.
- 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)
- Villsen K., Corse E., Archambaud-Suard G. et al. 2022. Diet metabarcoding reveals extensive dietary overlap between two benthic stream fishes (*Zingel asper* and *Cottus gobio*) and provides insights into their coexistence. *Diversity* 14(5): 412. DOI: [10.3390/d14050412](https://doi.org/10.3390/d14050412)
- Votýpka J., Modrý D., Oborník M. et al. 2016. Apicomplexa. *Handbook of the Protists*, 1-58. DOI: [10.1007/978-3-319-32669-6_20-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-32669-6_20-1)
- 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)

Yoon T.-H., Kang H.-E., Lee S.R. et al. 2017. Metabarcoding analysis of the stomach contents of the Antarctic Toothfish (*Dissostichus mawsoni*) collected in the Antarctic Ocean. *PeerJ* 5: e3977. DOI: [10.7717/peerj.3977](https://doi.org/10.7717/peerj.3977)

Богданов Б.Э. 2017. Обзор широколобок рода *Limnocottus* (Pisces; Cottidae): номенклатура, фенетические отношения и диагностические признаки. *Байкальский Зоологический Журнал* 2(21): 46-55.

Богданов Б.Э. 2023. Коттоидные рыбы (Perciformes: Cottidae) Байкала и Байкальского региона: обновлённый аннотированный список с описанием новых таксонов. *Limnology and Freshwater Biology* 6(3): 63-95. DOI: [10.31951/2658-3518-2023-A-3-63](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2023-A-3-63)

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* 6(1): 6-10. DOI: [10.31951/2658-3518-2023-A-1-1](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2023-A-1-1)

Деникина Н.Н., Кулакова Н.В., Букин Ю.С. и др. 2023. Филогенетический анализ кокцидий (Apicomplexa: Eimeriina) у обыкновенной верховки *Leucaspius delineatus* (Heckel, 1843). *Limnology and Freshwater Biology* 6(4): 104-118. DOI: [10.31951/2658-3518-2023-A-4-104](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2023-A-4-104)

Заика В.Е. 1965. Паразитофауна рыб озера Байкал. Москва: Наука.

Пронина С.В. 1990. Первые сведения о кокцидии *Eimeria* sp. у байкальского омуля *Coregonus autumnalis migratorius*. В: IX Всесоюз. совещ. по паразитам и болезням рыб. Ленинград, С. 104-105.

Соколов С.Г., Мошу А.А. 2014. *Goussia obstinata* sp. n. (Sporozoa: Eimeriidae) – новый вид кокцидий из кишечника ротана *Percottus 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.