

doi: 10.7541/2021.2021.087

葡萄碘泡虫、似葡萄碘泡虫和茄形碘泡虫的鉴别及系统发育

谭禄奇¹ 周 杨¹ 王苗苗¹ 杨承忠^{1,2*} 赵元君^{1*}

(1. 重庆师范大学生命科学学院, 重庆市动物生物学重点实验室, 重庆 401331; 2. 铜仁学院, 贵州省梵净山地区生物多样性保护与利用重点实验室, 铜仁 554300)

摘要: 葡萄碘泡虫 *Myxobolus acinosus* Nie & Li, 1973、似葡萄碘泡虫 *Myxobolus pseudoacinosus* Guo, et al., 2018 和茄形碘泡虫 *Myxobolus toyamai* Kudo, 1917 形态非常相似, 有着共同的宿主和相同的寄生部位, 是病原鉴定中容易混淆的种。文章基于形态学和 18S rRNA 基因信息对三者进行了鉴别和分子系统学研究。成熟孢子形态特征的比较分析显示, 三者形态存在显著差异。葡萄碘泡虫与似葡萄碘泡虫 18S rDNA 序列相似度为 98.4—98.8%, 遗传距离为 0.013—0.020; 葡萄碘泡虫与茄形碘泡虫 18S rDNA 序列相似度为 96.1—97.2%, 遗传距离为 0.038—0.042; 似葡萄碘泡虫与茄形碘泡虫 18S rDNA 序列相似度为 96.4—97.6%, 遗传距离为 0.033—0.040。18S rDNA 序列比对显示, 葡萄碘泡虫含有 15 个关键变异位点, 可将该虫与似葡萄碘泡虫和茄形碘泡虫区分; 似葡萄碘泡虫含有 5 个关键变异位点, 可将该虫与葡萄碘泡虫和茄形碘泡虫区分; 茄形碘泡虫含有 33 个关键变异位点可将该虫与葡萄碘泡虫和似葡萄碘泡虫区分。18S rRNA 二级结构 V4 区的 E23-2 构型可将葡萄碘泡虫与似葡萄碘泡虫和茄形碘泡虫区分, 而 V7 区的 H43 构型可将茄形碘泡虫与葡萄碘泡虫和似葡萄碘泡虫区分。以上表明, 三者无论在形态上还是在遗传上均具有独立物种的特征。系统发育分析显示, 葡萄碘泡虫、似葡萄碘泡虫和茄形碘泡虫为系统树中分化较晚的一支。

关键词: 葡萄碘泡虫; 似葡萄碘泡虫; 茄形碘泡虫; 形态学; 18S rRNA 基因

中图分类号: Q959.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2022)04-0379-10

黏孢子虫是一类物种丰富、分布广泛的后生动物寄生虫, 主要寄生于鱼类, 迄今已报道的种类约有 2600 种^[1]。早期对于黏孢子虫的分类主要依据成熟孢子的形态特征, 但因黏孢子虫个体微小、形态简单、可用于分类的形态学特征较少, 许多分类学问题无法得到解决, 形态相似种的鉴别尤其困难。近几十年来, 分子生物学的应用, 极大程度地促进了黏孢子虫分类学的发展, 解决了诸多经典分类学的遗留问题^[2-6]。目前, 综合利用形态学、分子生物学和生态学等信息进行黏孢子虫分类学的研究已成为该领域学者们的共识。

葡萄碘泡虫 *Myxobolus acinosus* Nie & Li, 1973、似葡萄碘泡虫 *Myxobolus pseudoacinosus* Guo, et al., 2018 和茄形碘泡虫 *Myxobolus toyamai* Kudo, 1917 均寄生于鲤科鱼类的鳃丝部, 且形态非常相似, 在病原鉴定中容易混淆。葡萄碘泡虫由倪达书和李连祥于 1973 年在采自湖北省黄石市花马湖的鲤 *Cyprinus carpio* 的鳃丝上检获并命名^[7], 后来又有学者分别在采自湖北省孝感市的鲤、湖北省武昌市的镜鲤、浙江省灵江市的鲤及武陵山地区(湖南省吉首市、贵州省铜仁市)的鲫 *Carassius auratus auratus* 的鳃丝上获得该种^[8]。似葡萄碘泡

收稿日期: 2021-04-26; 修订日期: 2021-11-14

基金项目: 国家自然科学基金(31970409); 重庆市自然科学基金(cstc2018jcyjAX0738); 重庆市留学人员回国创业创新支持计划(cx2018108); 重庆市教委科学技术研究项目(KJQN201900505); 贵州省梵净山地区生物多样性保护与利用重点实验室开放课题(黔科合平台人才[2020]2003)资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31970409); Chongqing Natural Science Foundation (cstc2018jcyjAX0738); Venture & Innovation Support Program for Chongqing Overseas Returnees (cx2018108); Science and Technology Research Program of Chongqing Municipal Education Commission (KJQN201900505); Open Research Fund of Guizhou Provincial Key Laboratory for Biodiversity Conservation and Utilization in the Fanjing Mountain Region ([2020]2003)]

作者简介: 谭禄奇(1994—), 女, 硕士研究生; 研究方向为动物系统学与分子进化。E-mail: 1261856593@qq.com

通信作者: 杨承忠, 男, 教授, 博士; E-mail: drczyang@126.com 赵元君, 女, 教授, 博士; E-mail: zhaoyuanjuncn@126.com

*共同通信作者

虫由Guo等^[9]于2018年在采自湖北省武汉市的鲤的鳃丝上检获并命名。茄形碘泡虫由Kudo于1917年在鲤的鳃上检获并命名。据原始描述,该种含有一个极囊及位于该极囊前端的一个长条状原生质团^[10]。1933年,Kudo建立了单极虫属*Thelohanellus* Kudo, 1933,并将茄形碘泡虫置于该属中^[11]。然而,多年来,该物种孢子中的长条状原生质团是否为极囊一直备受争议,因此茄形碘泡虫*M. toyamai*和茄形单极虫*T. toyamai*这两个物种名的有效性受到质疑^[12-14]。2015年,Yokoyama等^[15]发现上述长条状原生质团其实是一个小型极囊,据此重新确认了物种名茄形碘泡虫*M. toyamai*的有效性。茄形碘泡虫分布广泛,在苏联、美国、越南北部、欧洲、日本和中国等均有发现^[8, 14-16]。本实验在我国境内再次获得了葡萄碘泡虫、似葡萄碘泡虫和茄形碘泡虫,基于形态学和18S rRNA基因信息对三者进行鉴别和分子系统学研究,以期更深入地了解这三个物种间的进化关系,为鱼类病原的鉴定提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 标本采集与物种鉴定

宿主鲤分别于2019年7月、2019年9月和2020年8月采自重庆市沙坪坝区和大足区及贵州省铜仁市碧江区。在被感染的宿主鳃丝部可以观察到乳白色的圆形和椭圆形孢囊,参考赵元荪等^[17]的方法进行后续样品的处理及基于形态学的物种鉴定。

1.2 主成分分析方法

基于成熟孢子的孢子长、孢子宽、大极囊长、大极囊宽、小极囊长和小极囊宽的测量值,利用PAST3进行主成分分析(PCA),以分析葡萄碘泡虫、似葡萄碘泡虫和茄形碘泡虫不同株系及不同物种间的形态差异。使用变量协变矩阵生成具有95.0%置信的散点图。

1.3 DNA提取与PCR扩增

将获得的葡萄碘泡虫孢囊戳破后立即挑取部分孢子镜检,显微拍照,剩下的孢子用无水乙醇浸泡在离心管中保存。从装有样品的离心管底部吸取10 μ L含有黏孢子虫的液体,经超纯水清洗2—3次以除去杂质,再用Dneasy Tissue Kit (QIAGEN, Germany)试剂盒按照厂家提供的说明书进行基因组DNA的提取。提取得到的40 μ L基因组DNA溶液置于-20 $^{\circ}$ C冰箱保存备用。用于扩增18S rDNA基因的引物为18e(5'-CTGGTTGATCCTGC CAGT-3')^[18]和18R(5'-CTACGGAAACCTTGTT ACG-3')^[19]。25 μ L的PCR反应体系:超纯水6.5 μ L,模板DNA 4 μ L, Mix 12.5 μ L, 10 μ mol/L引物各1 μ L。

反应条件为:95 $^{\circ}$ C预变性5min;95 $^{\circ}$ C变性90s,58 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸2min,35个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸5min。PCR产物于1.5%琼脂糖凝胶电泳分离,用DNA凝胶回收试剂盒(Gel Extraction Kit)进行纯化回收,将回收产物插入pMD18-T载体(TaKaRa,日本),导入大肠杆菌进行单克隆培养,每株系送两个克隆子至英潍捷基(上海)生物公司测序,得到每株系测序返回的两个克隆子18S rDNA序列相同。

1.4 序列分析和系统发育

序列相似度的计算用在线序列双重比对工具(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa>)完成。所选序列两两之间的遗传距离利用MEGA 6.0^[20]选择K2P模型计算完成。变异位点分析借助Bioedit和MEGA 6.0完成。将本实验获得的4条葡萄碘泡虫18S rDNA序列、1条似葡萄碘泡虫18S rDNA序列和2条茄形碘泡虫18S rDNA序列分别在GenBank数据库中通过BLAST进行序列同源比对。根据比对结果,选取与这7条序列同源性较高的67条序列,加上本实验得到的7条序列,另选取鲑两极虫*Myxidium truttae* AF201374、金色楚克拉虫*Zschokkella auratis* KC84942作为外群构建系统发育树。利用MrBayes 3.1.2软件^[21]构建BI树,序列最佳进化模型为GTR+I+G,共执行10000000代,每200代抽样1次,在舍弃25%的老化样本后,根据剩余样本构建一致树。利用在线软件CIPRES Science Gateway V. 3.1(http://www.phylo.org/sub_sections/portal)构建ML树,选用模式为RAxML-HP2 XSEDE(8.2.12)。然后用FigTree v 1.3.1和Photoshop CS3完成系统树的绘制。

1.5 18S rRNA二级结构预测

二级结构模型从欧洲核糖体RNA数据库(<http://bioinformatics.Psb.ugent.Be/webtools/rRNA/scemodel/index.html>)^[22]获得。利用MEGA 6.0对所选18S rRNA基因进行比对以获得可变序列区域,基于18S rRNA二级结构对进化趋势进行比较研究。用软件RNA Structure 5.3采用自由能最小化模型^[22, 23]对二级结构进行预测,所有参数均设置为默认值。获得的二级结构与已知的真核生物18S rRNA二级结构模型进行比较,并使用RNAViz 2.0手动调整^[24, 25]。

2 结果

2.1 葡萄碘泡虫、似葡萄碘泡虫和茄形碘泡虫的形态学描述

本实验共获得葡萄碘泡虫4个株系,均寄生于鲤的鳃丝部,其中株系1(S1)采自重庆沙坪坝区,另3株系采自贵州铜仁碧江区(S2、S3和S4;表1)。4株系孢囊均呈乳白色,圆形,直径为0.1—0.3 mm

(图 1A)。成熟孢子壳面观呈长葡萄形, 前端稍窄略弯, 后端圆钝(图 2A和2B), 孢子长($10.8\pm0.4\ \mu\text{m}$ ($9.3\text{—}11.9\ \mu\text{m}$; $n=120$), 孢子宽($6.2\pm0.4\ \mu\text{m}$ ($5.0\text{—}7.1\ \mu\text{m}$; $n=120$)). 两极囊位于孢子前端, 形态和大小差异较大, 大极囊呈梨形, 长($4.6\pm0.5\ \mu\text{m}$ ($3.1\text{—}5.4\ \mu\text{m}$; $n=120$), 宽($2.6\pm0.3\ \mu\text{m}$ ($1.8\text{—}3.2\ \mu\text{m}$; $n=120$), 极丝缠绕5—6圈; 小极囊呈球棒形, 长($2.3\pm0.3\ \mu\text{m}$ ($1.7\text{—}2.9\ \mu\text{m}$; $n=120$), 宽($0.9\pm0.1\ \mu\text{m}$ ($0.7\text{—}1.3\ \mu\text{m}$; $n=120$), 极丝缠绕2—3圈。缝面观呈透镜形, 缝脊较粗(图 2C和2D)。4株系形态与《中国动物志》^[8]报道株系(S5)及原始报道株系(S6)一致(表 1)。主成分分析显示, 本实验获得的葡萄碘泡虫4株系间

形态学量度无显著差异(图 3)。

本实验获得似葡萄碘泡虫1个株系, 采自重庆大足区, 寄生于鲤的鳃丝部, 孢囊呈乳白色, 椭圆形。似葡萄碘泡虫成熟孢子壳面观呈茄形, 前端狭窄且弯曲, 后端圆钝, 孢子长($15.9\pm0.5\ \mu\text{m}$ ($15.1\text{—}17.0\ \mu\text{m}$; $n=30$), 宽($5.5\pm0.5\ \mu\text{m}$ ($5.0\text{—}6.3\ \mu\text{m}$; $n=30$)). 两极囊位于孢子前端, 形态和大小差异较大, 大极囊呈梨形, 长($7.7\pm0.5\ \mu\text{m}$ ($6.7\text{—}8.7\ \mu\text{m}$; $n=30$), 宽($3.5\pm0.3\ \mu\text{m}$ ($3.0\text{—}4.1\ \mu\text{m}$; $n=30$), 极丝缠绕7—8圈, 小极囊呈球棒形, 长($3.2\pm0.2\ \mu\text{m}$ ($2.5\text{—}3.5\ \mu\text{m}$; $n=30$), 宽($0.9\pm0.1\ \mu\text{m}$ ($0.7\text{—}1.0\ \mu\text{m}$; $n=30$), 极丝缠绕2—3圈(图 2E和F)。未观察到缝面观。本

表 1 葡萄碘泡虫各株系形态比较

Tab. 1 The morphological comparison among different strains of *Myxobolus acinosus*

指标Index	株系1 Strain 1	株系2 Strain 2	株系3 Strain 3	株系4 Strain 4	株系5 Strain 5	株系6 Strain 6
孢子长SL (μm)	10.4±0.4 (9.4—11.0)	11.0±0.3 (10.1—11.8)	11.0±0.3 (10.3—11.9)	10.8±0.4 (9.3—11.4)	12.6 (10.8—13.2)	10.0 (9.6—10.8)
孢子宽SW (μm)	6.5±0.3 (6.0—7.1)	5.9±0.4 (5.2—7.0)	6.6±0.2 (6.0—7.1)	6.0±0.3 (5.0—6.6)	6.4 (5.6—7.2)	5.6 (5.4—6.0)
孢子厚ST (μm)	—	4.3±0.5 (3.6—5.0)	4.9±0.2 (4.6—5.1)	—	5.3 (4.8—6.0)	4.8
大极囊长LPCL (μm)	4.8±0.3 (4.2—5.4)	4.7±0.3 (3.8—5.2)	4.7±0.2 (4.3—5.2)	4.1±0.4 (3.1—5.0)	5.3 (4.8—6.0)	4.6 (3.8—4.9)
大极囊宽LPCW (μm)	2.6±0.3 (2.4—3.2)	2.7±0.2 (2.4—3.0)	2.7±0.2 (2.1—3.1)	2.3±0.3 (1.8—3.0)	2.8 (2.4—3.4)	2.4
小极囊长SPCL (μm)	2.3±0.2 (1.9—2.7)	2.4±0.2 (1.9—2.9)	2.5±0.2 (2.1—2.8)	2.1±0.2 (1.7—2.5)	2.6 (2.4—3.0)	—
小极囊宽SPCW (μm)	0.8±0.1 (0.7—1.0)	0.9±0.1 (0.7—1.3)	1.0±0.1 (0.8—1.2)	0.9±0.1 (0.7—1.2)	1.2 (1.0—1.4)	—
极丝圈数PF number	5—6 (大极囊) 2—3 (小极囊)	5—6 (大极囊) 2—3 (小极囊)	5—6 (大极囊) 2—3 (小极囊)	5—6 (大极囊) 2—3 (小极囊)	5—6 (大极囊) —(小极囊)	6 (大极囊) —(小极囊)
寄主Host	鲤	鲤	鲤	鲤	镜鲤, 鲤, 鲫	鲤
感染部位Infection site	鳃丝	鳃丝	鳃丝	鳃丝	鳃	鳃丝
采集地点Location	重庆沙坪坝区	贵州铜仁碧江区	贵州铜仁碧江区	贵州铜仁碧江区	湖北, 浙江, 武陵山地区	湖北孝感
资料来源Data resource	本研究	本研究	本研究	本研究	陈启鏊&马成伦, 1998 ^[8]	倪达书&李连祥, 1973 ^[7]

注: SL. 孢子长; SW. 孢子宽; ST. 孢子厚; LPCL. 大极囊长; LPCW. 大极囊宽; SPCL. 小极囊长; SPCW. 小极囊宽; PF. 极丝; —. 无数据, 下同

Note: SL. spore length; SW. spore width; ST. spore thickness; LPCL. large polar capsule length; LPCW. large polar capsule width; SPCL. small polar capsule length; SPCW. small polar capsule width; PF. polar filament; —. no data. The same applies below

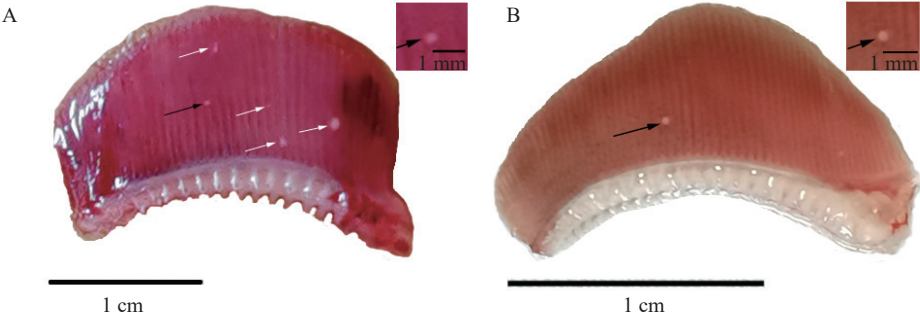


图 1 葡萄碘泡虫孢囊(A)和茄形碘泡虫孢囊(B)

Fig. 1 Cysts of *M. acinosus* (A) and *M. toyamai* (B)

A. 黑色箭头所指为葡萄碘泡虫孢囊, 白色箭头所指为其他黏孢子虫孢囊; B. 黑色箭头所指为茄形碘泡虫孢囊。似葡萄碘泡虫孢囊图缺失

A. the black arrows refer to cysts of *M. acinosus* and the white arrows refer to cysts of other myxosporeans; B. the black arrows refer to cysts of *M. toyamai*. The cyst photo of *M. pseudoacinosus* is scarce

实验所得似葡萄碘泡虫株系(S1)形态与原始报道的宽型株系(S3)一致(表 2)。

本实验获得茄形碘泡虫2个株系(S1和S2), 均采自贵州铜仁碧江区, 寄生于鲤的鳃丝部, 孢囊呈乳白色, 圆形, 直径为0.2—0.5 mm(图 1B), 成熟孢子壳面观呈茄形, 前端狭窄稍弯, 后端圆钝, 孢子长 $(15.3\pm0.6)\mu\text{m}$ ($14.3\text{—}16.6\mu\text{m}$; $n=60$), 宽 $(6.2\pm0.4)\mu\text{m}$ ($5.0\text{—}7.0\mu\text{m}$; $n=60$)。两极囊位于孢子前端, 形态和大小差异较大, 大极囊呈梨形, 长 $(5.6\pm0.4)\mu\text{m}$ ($4.6\text{—}6.4\mu\text{m}$; $n=60$), 宽 $(2.9\pm0.2)\mu\text{m}$ ($2.4\text{—}3.4\mu\text{m}$;

$n=60$), 极丝缠绕6—8圈。小极囊呈球棒形, 长 $(3.0\pm0.3)\mu\text{m}$ ($2.2\text{—}3.7\mu\text{m}$; $n=60$), 宽 $(0.9\pm0.1)\mu\text{m}$ ($0.6\text{—}1.2\mu\text{m}$; $n=60$), 极丝缠绕2—3圈(图 2G和 2H)。孢子缝面观似梨形, 前端狭窄弯曲, 后端圆钝(图 2I和2J)。本研究所得茄形碘泡虫形态与原始报道株系一致(表 2)。主成分分析显示, 本实验获得的茄形碘泡虫2株系间形态量度无显著差异(图 3)。

2.2 葡萄碘泡虫、似葡萄碘泡虫和茄形碘泡虫 18S rRNA基因分析

获得葡萄碘泡虫S1—S4株系18S rDNA序列长

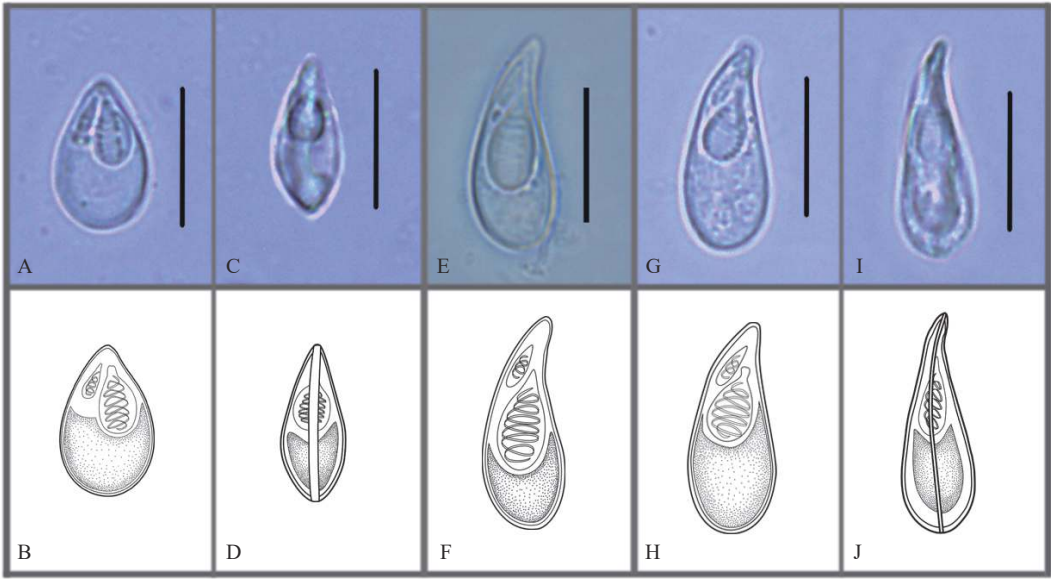


图 2 葡萄碘泡虫、似葡萄碘泡虫和茄形碘泡虫成熟孢子形态图

Fig. 2 Mature spores of *M. acinosus*, *M. pseudoacinosus* and *M. toyamai*

A. 葡萄碘泡虫壳面观照片; B. 葡萄碘泡虫壳面观线条图; C. 葡萄碘泡虫缝面观照片; D. 葡萄碘泡虫缝面观线条图; E. 似葡萄碘泡虫壳面观照片; F. 似葡萄碘泡虫壳面观线条图; G. 茄形碘泡虫壳面观照片; H. 茄形碘泡虫壳面观线条图; I. 茄形碘泡虫缝面观照片; J. 茄形碘泡虫缝面观线条图。比例尺=10 μm

A. *M. acinosus* in frontal view; B. Line drawing of *M. acinosus* in frontal view; C. *M. acinosus* in sutural view. D. Line drawing of *M. acinosus* in sutural view; E. *M. pseudoacinosus* in frontal view; F. Line drawing of *M. pseudoacinosus* in front view; G. *M. toyamai* in frontal view; H. Line drawing of *M. toyamai* in front view; I. *M. toyamai* in sutural view; J. Line drawing of *M. toyamai* in sutural view. Scale bars=10 μm

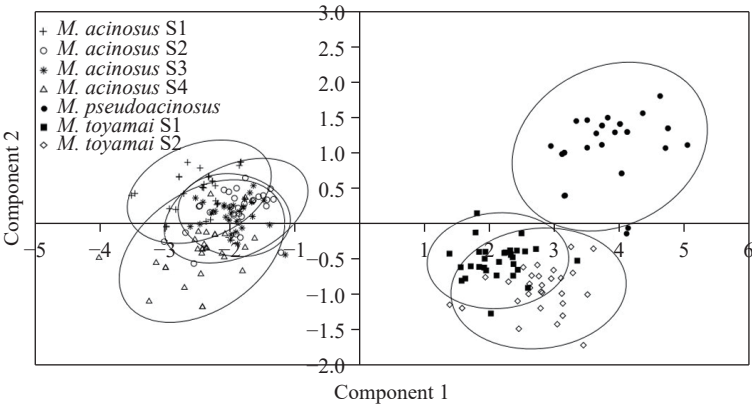


图 3 基于葡萄碘泡虫、似葡萄碘泡虫和茄形碘泡虫的形态学数据的主成分分析图

Fig. 3 Principal component analysis based on morphological data of *M. acinosus*, *M. pseudoacinosus* and *M. toyamai*

度分别为1986 nt(GenBank登录号: MW821466)、1899 nt(GenBank登录号: MW821467)、1896 nt(GenBank登录号: MW821468)和1903 nt(GenBank登录号: MW821469)。4株系间序列相似度为100%, 遗传距离为0.000—0.001, 变异位点有0—1个。4株系18S rDNA序列与GenBank数据库中的葡萄碘泡虫(KX810022、KX810021)的相似度最高(99.9%—100%)。6条序列之间相似度为99.9%—100%, 遗传距离为0.000—0.002, 变异位点有0—2个(图4)。

获得似葡萄碘泡虫18S rDNA序列1条, 序列长度1897 nt(GenBank登录号: MW821470), 与GenBank数据库中的似葡萄碘泡虫(KX586684和KX810019)相似度最高(99.8%), 三条序列的相似度为99.6%—99.8%, 遗传距离为0.002—0.007, 变异位点有4—8个(图4)。

获得茄形碘泡虫S1和S2株系18S rDNA序列长度分别为1641 nt(GenBank登录号: MW821471)和1758 nt(GenBank登录号: MW821472), 两株系序列相似度为100%, 遗传距离为0.000, 变异位点0个。两株系与GenBank数据库中的茄形碘泡虫(LC010116、C010115、FJ710802和HQ338729)相似度最高(99.5%—100%), 6条序列之间相似度为99.5%—100%, 遗传距离为0.000—0.003, 变异位点有0—3个(图4)。

葡萄碘泡虫与似葡萄碘泡虫之间的18S rDNA相似度为98.4—98.8%, 遗传距离为0.013—0.020, 变异位点有23—26个; 葡萄碘泡虫与茄形碘泡虫

18S rDNA序列相似度为96.1—97.2%, 遗传距离为0.038—0.042, 变异位点有55—58个; 似葡萄碘泡虫和茄形碘泡虫18S rDNA序列相似度为96.4—97.6%, 遗传距离为0.033—0.040, 变异位点有46—63个(图4)。

本文对葡萄碘泡虫、似葡萄碘泡虫和茄形碘泡虫的18S rRNA二级结构中的V1、V2、V3、V4、V5、V6、V7、V8和V9等9个可变区进行了分析, 结果显示V4区的E23-2构型可将葡萄碘泡虫与似葡萄碘泡虫和茄形碘泡虫有效地区分开: 与似葡萄碘泡虫和茄形碘泡虫相比较, 葡萄碘泡虫E23-2的发卡环更大(8碱基 vs. 11碱基), 且在发卡环旁边少一个单碱基(A碱基)侧凸(图5)。同时, V7区的H43构型可以将茄形碘泡虫分别与葡萄碘泡虫和似葡萄碘泡虫有效区分: 与葡萄碘泡虫和似葡萄碘泡虫相比较, 茄形碘泡虫H43的内部环更大(9碱基 vs. 10碱基), 而发夹环更小(7碱基 vs. 6碱基)。

2.3 系统发育树

基于18S rDNA构建的BI和ML树呈现相似的拓扑结构(图6)。系统发育树首先分为两大进化支(Clade A和Clade B, 图6), 葡萄碘泡虫、似葡萄碘泡虫和茄形碘泡虫为A进化支中分化较晚的一支。虽然葡萄碘泡虫和茄形碘泡虫有些种内株系间的系统关系在ML树和BI树中不一致, 但两系统树均支持葡萄碘泡虫各株系聚为一支, 似葡萄碘泡虫各株系聚为一支, 茄形碘泡虫各株系聚为一支。在亚

表2 似葡萄碘泡虫和茄形碘泡虫株系形态比较

Tab. 2 The morphological comparison among different strains of *Myxobolus pseudoacinosus* and *Myxobolus toyamai*

指标Index	<i>M. pseudoacinosus</i> 株系1 Strain 1	<i>M. pseudoacinosus</i> 株系2(窄型) Strain 2 (Narrow type)	<i>M. pseudoacinosus</i> 株系3(宽型) Strain 3 (Wide type)	<i>M. toyamai</i> 株系1 Strain 1	<i>M. toyamai</i> 株系2 Strain 2	<i>M. toyamai</i> 株系3 Strain 3
孢子长 SL (μm)	15.9±0.5 (15.1—17.0)	15.0±0.5 (14.3—15.9)	14.1±0.5 (12.9—15.6)	14.0 (13.2—15.6)	14.9±0.4 (14.3—16.1)	15.6±0.5 (14.4—16.6)
孢子宽 SW (μm)	5.5±0.5 (5.0—6.3)	5.5±0.5 (4.3—6.6)	6.5±0.3 (6.0—7.3)	5.5 (4.8—6.0)	6.5±0.3 (6.0—7.1)	5.9±0.3 (5.0—6.3)
孢子厚 ST (μm)	—	5.0±0.3 (4.4—6.2)	5.2—5.8	4.4—5.4	—	3.9—5.5
大极囊长 LPCL (μm)	7.7±0.5 (6.7—8.7)	6.6±0.5 (5.7—7.8)	6.5±0.3 (6.0—7.3)	5.7 (4.8—7.2)	5.7±0.3 (4.9—6.2)	5.5±0.4 (4.6—6.4)
大极囊宽 LPCW (μm)	3.5±0.3 (3.0—4.1)	2.9±0.4 (2.2—3.9)	3.7±0.2 (3.2—4.2)	2.8 (2.4—3.6)	3.1±0.2 (2.6—3.3)	2.7±0.2 (2.4—3.4)
小极囊长 SPCL (μm)	3.2±0.2 (2.5—3.5)	3.6±0.3 (3.0—4.3)	3.2±0.3 (2.8—3.8)	3.2 (2.4—3.6)	3.0±0.3 (2.2—3.5)	3.1±0.3 (2.5—3.7)
小极囊宽 SPCW (μm)	0.9±0.1 (0.7—1.0)	1.0±0.2 (0.6—1.6)	1.2±0.1 (0.9—1.4)	0.8 (0.6—1.0)	0.9±0.1 (0.6—1.2)	0.9±0.1 (0.7—1.2)
极丝圈数 PF number	7—8 (大极囊) 2—3 (小极囊)	7—8 (大极囊) 2—3 (小极囊)	5—6 (大极囊) 2—3 (小极囊)	7—8 (大极囊) —(小极囊)	6—8 (大极囊) 2—3 (小极囊)	6—8 (大极囊) 2—3 (小极囊)
寄主Host	鲤	鲤	鲤	鲤, 镜鲤, 鲫	鲤	鲤
感染部位 Infection site	鳃丝	鳃	鳃	鳃, 肾	鳃丝	鳃丝
采集地点 Location	重庆大足区	湖北武汉	湖北武汉	中国, 苏联, 美国, 日本	贵州铜仁碧江区	贵州铜仁碧江区
资料来源 Data resouces	本研究	Guo, et al., 2018 ^[9]	Guo et al., 2018 ^[9]	陈启鏊&马成伦, 1998 ^[8]	本研究	本研究

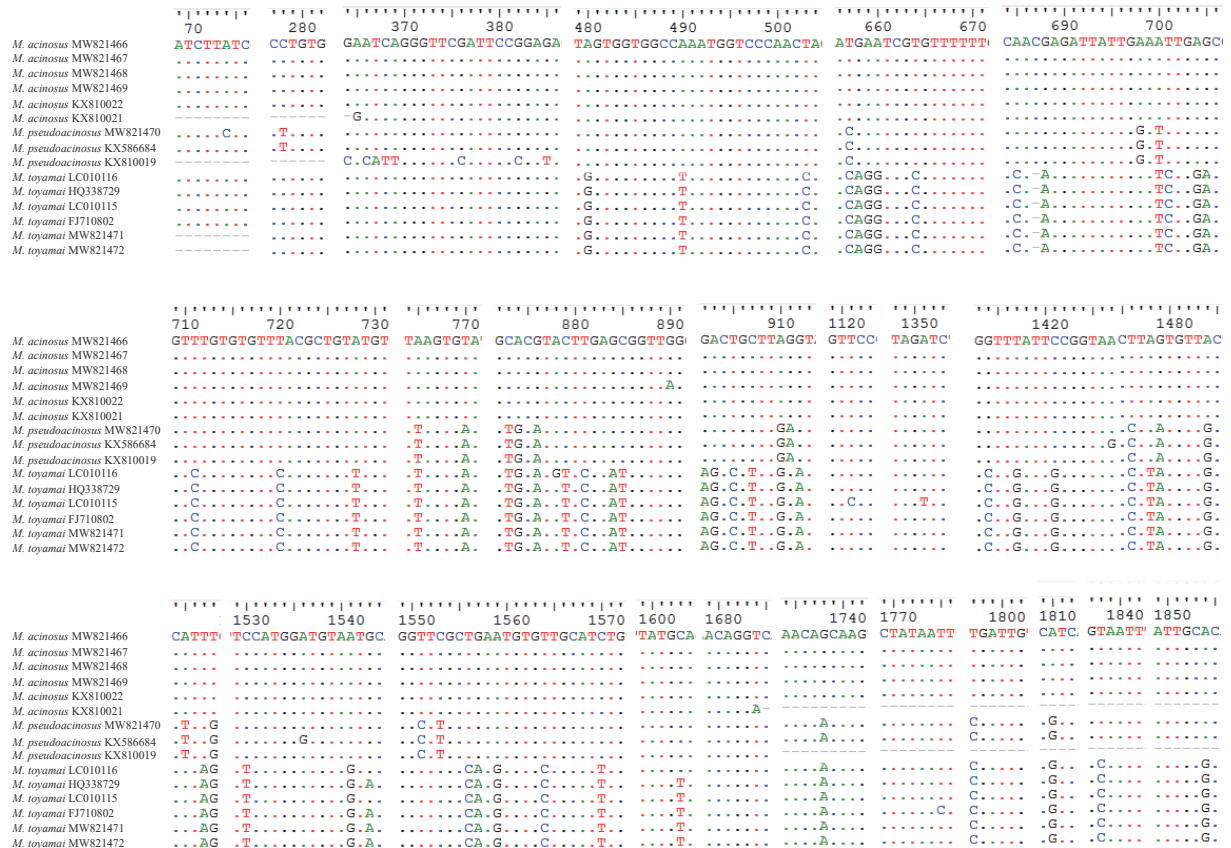


图4 葡萄碘泡虫、似葡萄碘泡虫和茄形碘泡虫18S rDNA的变异位点

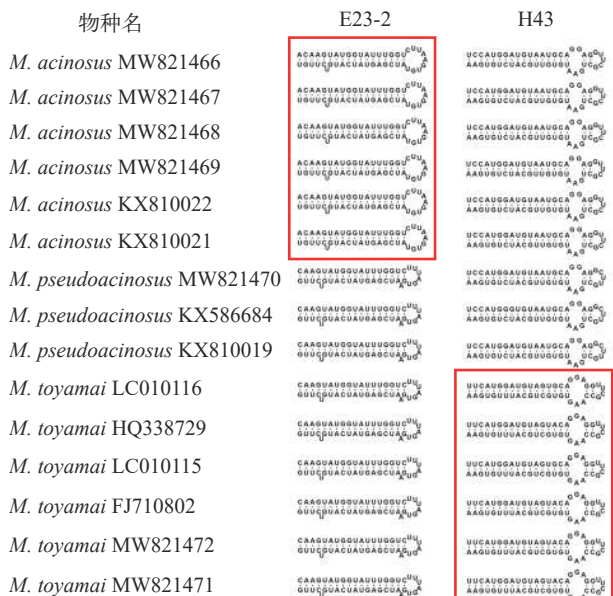
Fig. 4 The variable sites of 18S rDNA among *M. acinosus*, *M. pseudoacinosus* and *M. toyamai*

图5 葡萄碘泡虫、似葡萄碘泡虫和茄形碘泡虫的18S rRNA二级结构的E23-2和H43构型

Fig. 5 The model of E23-2 and H43 of secondary structure of 18S rRNA among *M. acinosus*, *M. pseudoacinosus* and *M. toyamai*

支 I 中(Subclade I, 图 6), 似葡萄碘泡虫位于基部位置, 葡萄碘泡虫与长孢碘泡虫形成姐妹群关系, 茄

形碘泡虫与拟茄形碘泡虫(GenBank登录号: LC228237)形成姐妹群关系。

3 讨论

葡萄碘泡虫、似葡萄碘泡虫和茄形碘泡虫有着共同的宿主(鲤)和寄生部位(鳃), 成熟孢子均前端较尖后端圆钝, 均具一大一小极囊, 在鉴定中容易混淆, 但三者形态仍有细微差别: 葡萄碘泡虫孢子为长葡萄形, 可与孢子呈茄形的似葡萄碘泡虫和茄形碘泡虫区分; 与茄形碘泡虫相比, 似葡萄碘泡虫孢子更细长且其大极囊在孢子腔内的占比更大(图 2)。另外, 主成分分析显示, 三者形态量度存在显著差异(图 3)。虽然学者们普遍认为物种鉴定的遗传学阈值并不存在, 但基于18S rDNA, 有学者认为大多数黏孢子虫的种内相似度范围应为99.0%—100%^[26], 冉佼等^[27]认为种内遗传距离范围大多数集中在0.000—0.007, Zhao等^[28]认为种内变异位点应少于10个。葡萄碘泡虫与似葡萄碘泡虫的18S rDNA相似度为98.4—98.8%, 遗传距离为0.013—0.020, 变异位点有23—26个, 超出上述种内范围, 两者应为种间水平。类似的, 葡萄碘泡虫与茄形碘泡虫及似葡萄碘泡虫与茄形碘泡虫也应属于种间水

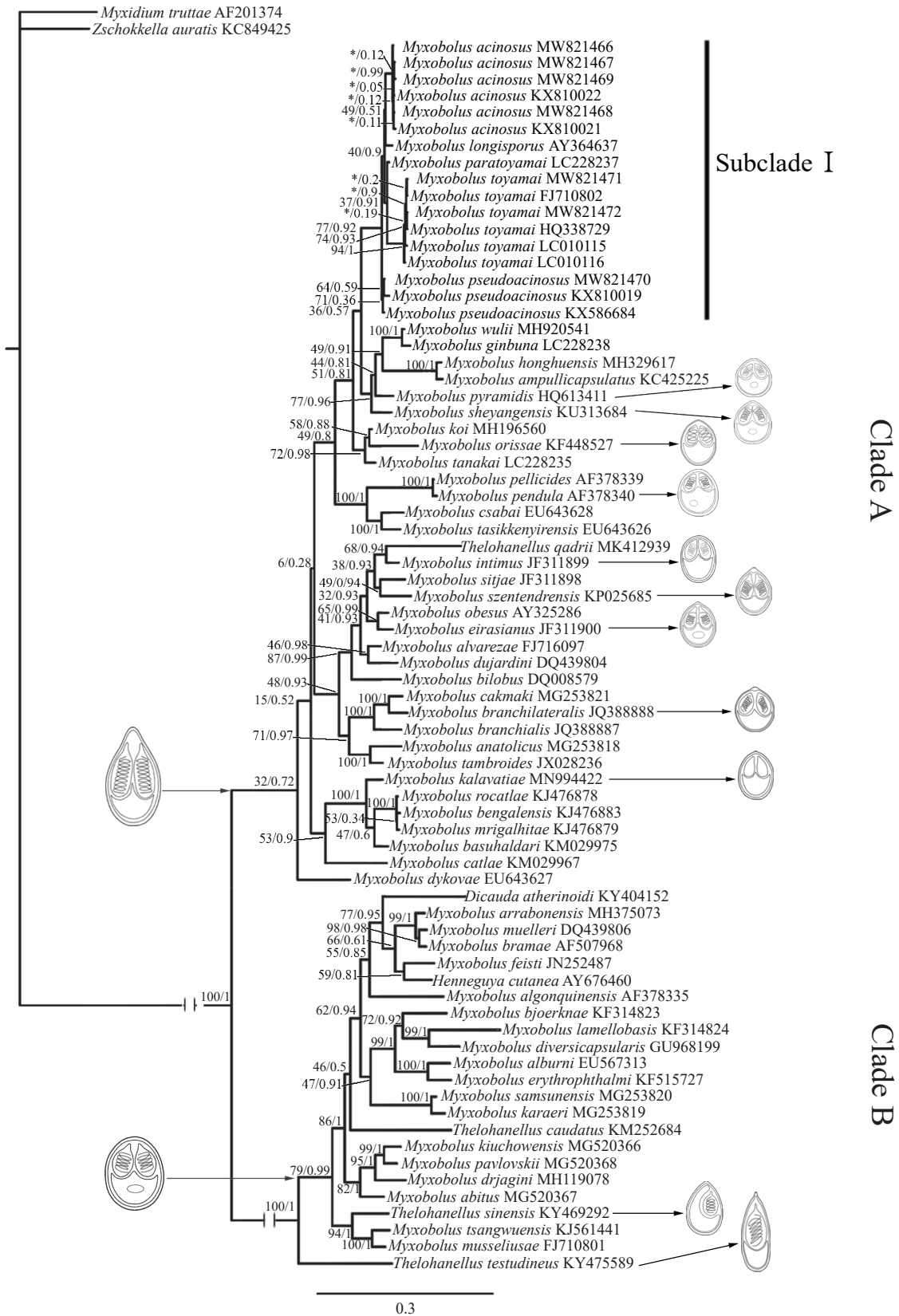


图 6 基于18S rDNA序列构建的ML/BI树

Fig. 6 Phylogenetic trees generated by ML/BI methods based on 18S rDNA sequences

图中截短的枝长为原长25%; 节点数值分别表示ML/BI树靴攀值; 物种名后为GenBank登录号; *表示ML/BI树不一致之处

The length of the truncated branch is 25% of the original length; numbers at the nodes are bootstrap confidence values of ML/BI; the numbers after the species name are the GenBank accession numbers; * indicate the inconsistent nodes of ML/BI

平。另外, 18S rRNA二级结构V4区的E23-2构型可将葡萄碘泡虫分别与似葡萄碘泡虫和茄形碘泡虫区分, 而V7区的H43构型可将该虫与葡萄碘泡虫和似葡萄碘泡虫区分(图5)。同时, 通过18S rDNA序列比对发现, 葡萄碘泡虫含有15个关键变异位点可将该虫与似葡萄碘泡虫和茄形碘泡虫区分; 似葡萄碘泡虫含有5个关键变异位点可将该虫与葡萄碘泡虫和茄形碘泡虫区分; 茄形碘泡虫含有33个关键变异位点可将该虫与葡萄碘泡虫和似葡萄碘泡虫区分(图4)。综上表明三者无论在形态上还是遗传上均具有独立物种的特征。

系统发育分析显示, 黏孢子虫成熟孢子的形态与系统发育关系密切, 如A进化支(Clade A)中大部分物种孢子形态为梨形, 前端稍尖, 后端圆钝; 进化支B(Clade B)中大多数物种孢子形态为圆形或椭圆形, 前端和后端都较圆钝(图6)。但仍有一些黏孢子虫的形态并不完全符合该规律, 如A支中圣安德烈碘泡虫*Myxobolus szentendrensis* Cech, et al., 2015, 鳃侧碘泡虫*Myxobolus branchilateralis* Molnár, et al., 2012, 肥满碘泡虫*Myxobolus obesus* Gurley, 1893, 埃拉斯碘泡虫*Myxobolus eirasianus* Cech, et al., 2012, 射阳碘泡虫*Myxobolus sheyangensis* Liu, et al., 2016, 塔形碘泡虫*Myxobolus pyramidis* Chen, 1958, 坠形碘泡虫*Myxobolus pendula* Guilford, 1967, 卡拉瓦提碘泡虫*Myxobolus kalavattiae* Székely, et al., 2015 和内膜碘泡虫*Myxobolus intimus* Zaika, 1965的孢子形态更接近B支中圆形或椭圆形孢子形态(图6)。在B支中, 中华单极虫*Thelohanellus sinensis* Chen & Hsieh, 1960和龟鳖单极虫*Thelohanellus testudineus* Liu, et al, 2014的孢子形态更接近A支中的梨形孢子形态(图6)。

以往的研究和本文都表明, 黏孢子虫的系统发育与宿主类群关系密切: 相同分类阶元(如目、科)的宿主寄生的黏孢子虫之间有着较近的系统发育关系^[29-32], 如本文系统发育树中的黏孢子虫均寄生于鲤形目鲤科鱼类。在寄生虫与宿主的关系中, 宿主转移是人们普遍关注的问题之一, 一些寄生虫通过探索新的宿主来促进自身对环境的适应。宿主转移可能导致寄生虫宿主范围的扩大或者放弃原来的宿主, 这是在系统发育树中处在同一支系且亲缘关系较近的寄生虫对应的宿主亲缘关系却较远的首要原因^[33]。如本文系统发育树中的穆勒碘泡虫*Myxobolus muelleri* Bütschli, 1882除了感染鲤形目鲤科鱼类, 还能感染鲈形目杜父鱼科鱼类和鲇形目鲇科鱼类。另外, 中华单极虫除了感染鲤形目鲤科鱼类, 还能感染鲈形目鲇科鱼类、鲈形目虾虎

科鱼类及鳗形目鳗科鱼类。通过黏孢子虫的系统发育与宿主类群关系的分析推测, 穆勒碘泡虫和中华单极虫的原始宿主应为鲤科鱼类, 其他类群应是这两种黏孢子虫通过宿主转移方式获得的新宿主类群, 从而扩大了寄生虫的宿主范围。

参考文献:

- [1] Okamura B, Hartigan A, Naldoni J. Extensive uncharted biodiversity: the parasite dimension [J]. *Integrative and Comparative Biology*, 2018, **58**(6): 1132-1145.
- [2] Smothers J F, von Dohlen C D, Smith Jr L H, et al. Molecular evidence that the myxozoan protists are metazoans [J]. *Science*, 1994, **265**(5179): 1719-1721.
- [3] Kent M L, Andree K B, Bartholomew J L, et al. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa [J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2001, **48**(4): 395-413.
- [4] Eszterbauer E, Székely C. Molecular phylogeny of the kidney-parasitic *Sphaerospora renicola* from common carp (*Cyprinus carpio*) and *Sphaerospora* sp. from goldfish (*Carassius auratus auratus*) [J]. *Acta Veterinaria Hungarica*, 2004, **52**(4): 469-478.
- [5] Fiala I. The phylogeny of Myxosporea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis [J]. *International Journal for Parasitology*, 2006, **36**(14): 1521-1534.
- [6] Burger M A A, Cribb T H, Adlard R D. Patterns of relatedness in the Kudoidea with descriptions of *Kudoa chaetodonti* n. sp. and *K. lethrini* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida) [J]. *Parasitology*, 2007, **134**(5): 669-681.
- [7] Ni D S, Li L X. Flora of Fish Diseases in Hubei Province [M]. Beijing: Science Press, 1973: 74-75. [倪达书, 李连祥. 湖北省鱼病病原区系图志 [M]. 北京: 科学出版社, 1973: 74-75.]
- [8] Chen Q L, Ma C L. Fauna Sinica Myxozoa: Myxosporea [M]. Beijing: Science Press, 1998: 413-414. [陈启鏊, 马成伦. 中国动物志: 黏体动物门, 粘孢子虫纲 [M]. 北京: 科学出版社, 1998: 413-414.]
- [9] Guo Q X, Huang M J, Liu Y, et al. Morphological plasticity in *Myxobolus* Bütschli, 1882: a taxonomic dilemma case and renaming of a parasite species of the common carp [J]. *Parasites & Vectors*, 2018, **11**(1): 399-410.
- [10] Kudo R. Contributions to the study of parasitic Protozoa. II. *Myxobolus toyamai* nov. spec., a new myxosporidian parasite in *Cyprinus carpio* L [J]. *Journal of Parasitology*, 1917, **3**(4): 163-170.
- [11] Kudo R. A taxonomic consideration of Myxosporidia [J]. *Transactions of the American Microscopical Society*, 1933, **52**(3): 195-216.
- [12] Shulman S S. Myxosporidia of the USSR [M]. Russia: Nauka Publishers, Moscow-Leningrad, 1966: 631.
- [13] Lom J, Dykova I. Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species [J]. *Folia Parasitologica*, 2006, **53**(1): 1-36.

- [14] Griffin M J, Goodwin A E. *Thelohanellus toyamai* (Syn. *Myxobolus toyamai*) infecting the gills of koi *Cyprinus carpio* in the eastern United States [J]. *Journal of Parasitology*, 2011, **97**(3): 493-502.
- [15] Yokoyama H, Ogawa K. The resurrection of *Myxobolus toyamai* with a validation of a stunted polar capsule based on morphological evidence [J]. *Parasitology International*, 2015, **64**(4): 43-47.
- [16] Hoffman G L. Parasites of North American Freshwater Fishes [M]. 2nd edition. Cornell University Press, Ithaca and London, 1999: 539.
- [17] Zhao Y J, Ma C L, Song W B. Illustrated guide to the identification of pathogenetic Protozoa in mariculture- II. Diagnostic methods for the Myxosporean [J]. *Ocean University Qingdao*, 2001, **31**(5): 681-688. [赵元著, 马成伦, 宋微波. 海水养殖中原生动物病原虫的鉴定: II. 粘孢子虫的研究及鉴定方法 [J]. 青岛海洋大学学报, 2001, **31**(5): 681-688.]
- [18] Hillis D M, Dixon M T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference [J]. *Quarterly Review of Biology*, 1991, **66**(4): 411-453.
- [19] Whipps C M, Adlard R D, Bryant M S, *et al.* First report of three *Kudoa* species from eastern Australia: *Kudoa thyrsites* from Mahi mahi (*Coryphaena hippurus*), *Kudoa amamiensis* and *Kudoa minithyrsites* n. sp. from Sweeper (*Pempheris ypsilychnus*) [J]. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2003, **50**(3): 215-219.
- [20] Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, **3**(12): 2725-2729.
- [21] Ronquist F, Huelsenbeck J P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. *Bioinformatics*, 2003, **19**(12): 1572-1574.
- [22] Gonzalez P, Labarère J. Phylogenetic relationships of *Pleurotus* species according to the sequence and secondary structure of the Mitochondrial small-subunit rRNA V4, V6 and V9 domains [J]. *Microbiology*, 2000, **146**(1): 209-221.
- [23] Hong S G, Jung H S. Phylogenetic analysis of *Ganoderma* based on nearly complete mitochondrial small-subunit ribosomal DNA sequences [J]. *Mycologia*, 2004, **96**(4): 742-755.
- [24] Wang P, Gao F, Huang J, *et al.* A case study to estimate the applicability of secondary structures of SSU-rRNA gene in taxonomy and phylogenetic analyses of ciliates [J]. *Zoologica Scripta*, 2015, **44**(5): 574-585.
- [25] De Rijk P, Wuyts J, De Wachter R. RnaViz 2: an improved representation of RNA secondary structure [J]. *Bioinformatics*, 2003, **19**(2): 299-300.
- [26] Molnár K, Eszterbauer E, Marton S, *et al.* Comparison of the *Myxobolus* fauna of common barbel from Hungary and Iberian barbel from Portugal [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2012, **100**(3): 231-248.
- [27] Ran J, Yang C Z, Zhao Y J. Taxonomic research of the Myxosporidia based on genetic distance [J]. *Journal of Chongqing Normal University (Natural Science)*, 2014, **31**(3): 31-34. [冉佼, 杨承忠, 赵元著. 基于遗传距离的粘孢子虫分类研究 [J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2014, **31**(3): 31-34.]
- [28] Zhao Y J, Li N N, Tang F H, *et al.* Remarks on the validity of *Myxobolus ampullicapsulatus* and *Myxobolus honghuensis* (Myxozoa: Myxosporaea) based on SSU rDNA sequences [J]. *Parasitology Research*, 2013, **112**(11): 3817-3823.
- [29] Gao L, Zhao Y J, Yang S H, *et al.* A new record of *Ceratomyxa diamanti* from China and comparison of its different geographic strains [J]. *Journal of Chongqing Normal University (Natural Science)*, 2020, **37**(3): 21-26. [高磊, 赵元著, 杨生华, 等. 戴曼特角形虫中国新纪录及不同地理株系的比较 [J]. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2020, **37**(3): 21-26.]
- [30] Huang Y M, Zhao Y J, Zhou Y, *et al.* First molecular evidence of *Ceratomyxa epinephela* (Myxozoa: Ceratomyxidae) and its genetic variation from different host species [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, **44**(6): 1263-1269. [黄艳梅, 赵元著, 周杨, 等. 石斑角形虫(黏体门, 角形虫科)的分子证据及其在不同宿主中的遗传变异 [J]. 水生生物学报, 2020, **44**(6): 1263-1269.]
- [31] Zatti S A, Atkinson S D, Maia A A M, *et al.* Novel *Henneguya* spp. (Cnidaria: Myxozoa) from cichlid fish in the Amazon basin cluster by geographic origin [J]. *Parasitology Research*, 2018, **117**(3): 849-859.
- [32] Carrierio M M, Adriano E A, Silva M R M, *et al.* Molecular phylogeny of the *Myxobolus* and *Henneguya* genera with several new South American species [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(9): e73713.
- [33] McCoy K D, Boulonier T, Tirard C, *et al.* Host specificity of a generalist parasite: genetic evidence of sympatric host races in the seabird tick *Ixodes uriae* [J]. *Journal of Evolutionary Biology*, 2001, **14**(3): 395-405.

IDENTIFICATION AND PHYLOGENETIC ANALYSIS ON *MYXOBOLUS ACINOSUNIE* & LI, 1973, *MYXOBOLUS PSEUDOACINOSUS* GUO, ET AL., 2018 AND *MYXOBOLUS TOYAMAI* KUDO, 1917

TAN Lu-Qi¹, ZHOU Yang¹, WANG Miao-Miao¹, YANG Cheng-Zhong^{1,2} and ZHAO Yuan-Jun¹

(1. Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China; 2. Guizhou Provincial Key Laboratory for Biodiversity Conservation and Utilization in the Fanjing Mountain Region, Tongren University, Tongren 554300, China)

Abstract: *Myxobolus acinosus* Nie & Li, 1973, *Myxobolus pseudoacinosus* Guo, et al., 2018 and *Myxobolus toyamai* Kudo, 1917 presenting high similar morphology, same host species and parasitic site, are difficult to be distinguished. In the present study, we conducted species identification and phylogenetic analysis on these three myxobolids. The myxospores of *M. acinosus* were long grape-shaped with slightly narrow and curved anterior and blunt posterior in valvular view. They were lens-shaped in sutural view. The spores were $(10.8 \pm 0.4) \mu\text{m}$ $[(9.3—11.9) \mu\text{m}]$ in length and $(6.2 \pm 0.4) \mu\text{m}$ $[(5.0—7.1) \mu\text{m}]$ in width. Two polar capsules were unequal. The larger polar capsules were pyriform with $(4.6 \pm 0.5) \mu\text{m}$ $[(3.1—5.4) \mu\text{m}]$ long and $(2.6 \pm 0.3) \mu\text{m}$ $[(1.8—3.2) \mu\text{m}]$ wide and 5—6 turns of polar filaments; the smaller ones were clavate with $(2.3 \pm 0.3) \mu\text{m}$ $[(1.7—2.9) \mu\text{m}]$ long and $(0.9 \pm 0.1) \mu\text{m}$ $[(0.7—1.3) \mu\text{m}]$ wide and 2—3 turns of polar filaments. The myxospores of *M. pseudoacinosus* were eggplant-shaped with narrow and curved anterior and blunt posterior. The spores were $(15.9 \pm 0.5) \mu\text{m}$ $[(15.1—17.0) \mu\text{m}]$ in length and $(5.5 \pm 0.5) \mu\text{m}$ $[(5.0—6.3) \mu\text{m}]$ in width. Two polar capsules were unequal. The larger polar capsules were pyriform with $(7.7 \pm 0.5) \mu\text{m}$ $[(6.7—8.7) \mu\text{m}]$ long and $(3.5 \pm 0.3) \mu\text{m}$ $[(3.0—4.1) \mu\text{m}]$ wide and 7—8 turns of polar filaments, the smaller ones were clavate with $(3.2 \pm 0.2) \mu\text{m}$ $[(2.5—3.5) \mu\text{m}]$ long and $(0.9 \pm 0.1) \mu\text{m}$ $[(0.7—1.0) \mu\text{m}]$ wide and 2—3 turns of polar filaments. The myxospores of *M. toyamai* were eggplant-shaped with slightly narrow and curved anterior and broad and blunt posterior in valvular view. They were pyriform-shaped in sutural view. The spores were $(15.3 \pm 0.6) \mu\text{m}$ $[(14.3—16.6) \mu\text{m}]$ in length and $(6.2 \pm 0.4) \mu\text{m}$ $[(5.0—7.0) \mu\text{m}]$ in width. Two polar capsules were unequal. The larger polar capsules were pyriform with $(5.6 \pm 0.4) \mu\text{m}$ $[(4.6—6.4) \mu\text{m}]$ long and $(2.9 \pm 0.2) \mu\text{m}$ $[(2.4—3.4) \mu\text{m}]$ wide and 6—8 turns of polar filaments, the smaller ones were clavate with $(3.0 \pm 0.3) \mu\text{m}$ $[(2.2—3.7) \mu\text{m}]$ long and $(0.9 \pm 0.1) \mu\text{m}$ $[(0.7—1.2) \mu\text{m}]$ wide and 2—3 turns of polar filaments. The morphological comparison of the three species showed that there were significant morphological differences among them. The 18S rDNA sequence similarity, genetic distance and variable site of the 4 strains of *M. acinosus* were 100%, 0—0.001 and 0—1, respectively; and the 18S rDNA sequences of the 4 strains had the highest similarity (99.9%—100%), smallest genetic distance (0—0.002) and least variable sites (0—2) with *M. acinosus* (KX810022, KX810021) from GenBank. The 18S rDNA sequence of the strain of *M. pseudoacinosus* had the highest similarity (99.8%) with *M. pseudoacinosus* (KX586684, KX810019) from GenBank, and genetic distance and variable site of the three sequences were 0.002—0.007 and 4—8, respectively. The 18S rDNA sequences of the 2 strains of *M. toyamai* were identical and they had the highest similarity (99.5%—100%) with *M. toyamai* (LC010116, C010115, FJ710802, HQ338729) from GenBank. The genetic distance and variable site among the six sequences were 0.000—0.002 and 0—2, respectively. The 18S rDNA sequence similarity, genetic distance and variable site between *M. acinosus* and *M. pseudoacinosus* were 98.4%—98.8%, 0.013—0.020 and 23—26, respectively, and that of *M. acinosus* and *M. toyamai* were 96.1%—97.2%, 0.038—0.042 and 55—58, respectively, and that of *M. pseudoacinosus* and *M. toyamai* were 96.4%—97.6%, 0.033—0.040 and 46—63, respectively. The analysis of 18S rDNA sequences showed that *M. acinosus* had 15 key variable sites which could distinguish the species from *M. pseudoacinosus* and *M. toyamai*; *M. pseudoacinosus* had 5 key variable sites which could distinguish the species from *M. acinosus* and *M. toyamai*; *M. toyamai* had 33 key variable sites which could distinguish the species from *M. acinosus* and *M. pseudoacinosus*. The model E23-2 of V4 region in 18S rRNA secondary structure could distinguish *M. acinosus* from *M. pseudoacinosus* and *M. toyamai*, and the model H43 of V7 region could distinguish *M. toyamai* from *M. acinosus* and *M. pseudoacinosus*. All evidences above implied that each of the three myxobolids had the independent species characteristics both in morphology and genetics. The phylogenetic analysis showed that *M. acinosus*, *M. pseudoacinosus* and *M. toyamai* clustered into a recent-diverged clade indicating the close relationship.

Key words: *Myxobolus acinosus*; *Myxobolus pseudoacinosus*; *Myxobolus toyamai*; Morphology; 18S rRNA gene