

象山港养殖大黄鱼寄生新贝尼登虫成虫 形态学和 28S rDNA, ITS1 分子鉴定

苗亮¹, 李明云^{1*}, 蒋进¹, 丁文超¹, 陈炯¹, 史雨红¹

(1. 宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 贝尼登类单殖吸虫是象山港海水养殖鱼类中一类危害严重的寄生虫。应用 PCR 扩增及 DNA 序列分析的分子生物学手段, 并结合对成虫的形态学分析, 对象山港养殖大黄鱼体表寄生的贝尼登类单殖吸虫(记作 XSp)进行了种类鉴定, 结果表明 XSp 从形态特征上属于新贝尼登虫属, 与梅氏新贝尼登虫高度相似。扩增得到 XSp 的 28S rDNA 和 ITS1 序列长度分别为 393 和 427 bp, 与梅氏新贝尼登虫和鮨新贝尼登虫的 5 个 28S rDNA 序列、2 个 ITS1 序列的比对分析显示相似性除 1 个为 97.4% 外其余均大于 99%, 提示 XSp 与这几个鮨新贝尼登虫和梅氏新贝尼登虫为种内关系, 而 XSp 与贝尼登虫的 3 个 28S rDNA 和 1 个 ITS1 序列相似性分别为 84.3% ~ 89.5% 和 60.2%。系统进化树显示该吸虫与梅氏新贝尼登虫和鮨新贝尼登虫形成一个紧密的簇, 而与贝尼登虫亲缘关系较远。根据普通生物学和序列特征分析, 将 XSp 定种为梅氏新贝尼登虫, 并且支持 Whittington 和 Horton (1996) 提出的梅氏新贝尼登虫和鮨新贝尼登虫为同种异名的分类观点。

关键词: 分室科; 梅氏新贝尼登虫; 形态特征; 28S rDNA; ITS1; 分类

中图分类号: S963.21⁺4

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2012)02-0122-07

1 引言

贝尼登类单殖吸虫隶属于扁形动物门(Platyhelminthes)吸虫纲(Trematoda)单殖吸虫目(Monogenea)分室科(Capsalidae Barid, 1853)贝尼登亚科(Benedeniinae Johnston, 1931), 近年来已成为我国东南沿海养殖鱼类的主要病原之一, 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)、石斑鱼(*Epinephelus* sp.)、鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)、真鲷(*Pagrosomus major*)等养殖品种均受侵染^[1]。虫体以吸盘及锚钩吸附于寄主体表、眼睛和鳍条等部位, 造成创伤, 进而引起继发性细菌和纤毛虫感染, 导致病鱼大量死亡。2007 至 2009 年浙江象山港海水养殖区贝

尼登虫病均有不同程度的暴发, 主要养殖鱼类大黄鱼、鲢鱼(*Miichthys miuuy*)、鲈鱼、黑鲷(*Sparus macrocephalus*)均被侵染, 尤以大黄鱼最为严重, 经济损失十分巨大。为了科学、有效地防治该病, 有必要先确定侵染象山港海域养殖鱼类的贝尼登类单殖吸虫的种类。

以前对单殖吸虫的分类主要是通过肉眼和光学显微镜观察来描述虫体及其主要器官形态、大小和位置, 但由于这种传统形态学分类方法的局限性, 目前国际上对贝尼登类单殖吸虫的定种仍存在分歧^[2-5]。如 Yamaguti^[3] 认为梅氏新贝尼登虫属包括 10 个种, 而 Whittington 和 Horton^[2] 则认为这 10 个种之间存在同种异名, 应合并为 6 个种。为避

收稿日期: 2011-03-30; 修订日期: 2011-06-11。

基金项目: 国家高技术研究发展计划(“八六三”)项目(2006AA10A405); 长江学者和创新团队发展计划项目(IRT0734); 宁波市科技局重大招标项目(2008C10022)。

作者简介: 苗亮(1980—), 男, 山东省淄博市人, 博士研究生, 主要从事水产增殖与遗传育种研究。E-mail: boneheadmiao@126.com

* 通信作者: 李明云(1942—), 男, 教授, 从事水产增殖、遗传育种、渔业资源等的教学和研究。E-mail: limingyun@nbu.edu.cn

免生存环境和样品处理引起虫体形态改变以及肉眼观察带来的人为误差,有必要对贝尼登类单殖吸虫进行分子分类学研究^[4-5]。核糖体基因(rDNA)和内转录间隔区(the first internal transcribed spacer, ITS)序列是目前种和种下水平分析常用的分子指标,已被广泛用于多种寄生虫的分子分类研究^[6-11]。

本研究记述了象山港网箱养殖大黄鱼体表寄生的贝尼登类单殖吸虫的形态学特征,并通过 28S rDNA 和 ITS1 基因序列的扩展和分析对其进行分类鉴定,以确定危害象山港海域养殖鱼类的贝尼登类单殖吸虫种类,并为该病的防治提供依据。

2 材料和方法

2.1 标本采集

2009 年 8 月于象山港海域养殖网箱采集感染贝尼登类单殖吸虫的大黄鱼,带回实验室暂养于水族箱中,从病鱼体表采集贝尼登类单殖吸虫活体成虫(记为 XSp)。所采集虫体经过滤海水清洗后分为两份:一份经轻度压片后用 10% 中性甲醛固定,经染色等处理后用于形态学研究;另一份用液氮速冻后在 -80 °C 保存,用于 DNA 提取。

2.2 形态特征观测

在光学显微镜下对所采虫体进行形态观察,并显微测量体长、体宽、前吸器横轴长和纵轴长、口咽部横轴长和纵轴长、后吸盘横轴长和纵轴长、前钩长、后钩长及附甲片长等。共测量 20 个活体样本和 20 张封片标本,文中量度单位为微米,括号内为平均值。

2.3 基因组 DNA 提取和 PCR 扩增

采用 BioSpin 基因组 DNA 提取试剂盒(TIAN-GEN 公司),按说明进行基因组 DNA 的抽提与纯化。

参照 Hassouna 等^[12]的方法合成用于扩增 28S rDNA 序列的引物,序列分别为

C1: 5'-ACCCGCTGAATTTAAGCAT-3' 位于 5' 端 25 位;

C3: 5'-CTCTTCAGAGTACTTTTCAAC-3' 位于 5' 端 390 位。

参照 Li 等^[13]的方法合成用于扩增 ITS1 的引物,引物 IT1 和 E5.8S 分别位于 18S 和 5.8SrDNA 的保守区,其引物序列分别为

IT1: 5'-GTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3';

E5.8S: 5'-GCTGACTCTTCATCGACGCRG-3'。

上述引物均由上海生工生物工程服务有限公司(Sangon)合成。

28S rDNA 和 ITS1 基因的 PCR 扩增反应体系(25 μ L)各成分含量为模板 50 ng, 10 mmol/dm³ Tris-HCl(pH 8.3), 50 mmol/dm³ KCl, 1.5 mmol/dm³ MgCl₂, 0.2 mmol/dm³ dNTP, 上下游引物各 0.2 μ mol/dm³, 0.25U rTaq 酶(Takara); PCR 扩增条件: 95 °C 5 min \rightarrow (95 °C 40 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s) \times 30 循环 \rightarrow 72 °C 10 min。

2.4 PCR 产物的克隆、序列测定与分析

PCR 扩增产物经 1% (W/V) 琼脂糖凝胶电泳分离后,用 QIAquick Gel Extraction 试剂盒(QIA-GEN)纯化。纯化产物连接至 pMD19-T-Simple 载体(Sigama),转化 *E. coli* TG1 感受态细胞,通过氨苄抗性及蓝白斑筛选阳性克隆,抽提质粒经 PCR 初步鉴定后,由上海生工生物工程服务有限公司(Sangon)进行测序。用 ClustalW 程序(<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>)进行多重序列比对,用 MEGA 4.0 软件^[14]作系统进化树分析。

3 结果

3.1 形态学特征

XSp 虫体呈长椭圆形,体长 2 352~4 325 μ m (3 513 μ m)(包括后吸盘),体宽 1 121~2 671 μ m (1 922 μ m)(见图 1a)。前端具一对并列的前吸器,大小为 [335~431 μ m (410 μ m)] \times [308~441 μ m (347 μ m)]; 两前吸器之间的中后下方有两对呈“八”字形排列的黑色眼点,前小后大(见图 1b)。边缘膜宽 14~38 μ m,虫体前端通常稍微宽于后端。咽大小为 [140~525 μ m (351 μ m)] \times [168~477 μ m (291 μ m)],分 6 瓣。肠管向后伸展到虫体的末端,终止于盲端;肠叉部分向中央和侧边缘各发出 2 到 3 级分支;后藤腺部分可见(见图 1b)。后吸器呈盘状,大小为 [889~1 256 μ m (993 μ m)] \times [994~1 243 μ m (1 089 μ m)],不分瓣,无隔膜;附甲片长 96~257 μ m (184 μ m),坚硬,末端分支且不等长,内侧支长 30~51 μ m (47 μ m),外侧支长 20~30 μ m (24 μ m);前钩长 127~404 μ m (352 μ m),前端锋利,内弯坚固;后钩长 50~162 μ m (106 μ m),未硬化且有细长内弯;后吸盘 7 对边缘小钩呈辐射状排列(见图 1c)。

辜丸 [226~396 μ m (331 μ m)] \times [228~427 μ m (329 μ m)],位于虫体中部,紧贴卵巢,并列一起,部分样品有缺刻,里面有带孔的管道;细小的输精管在

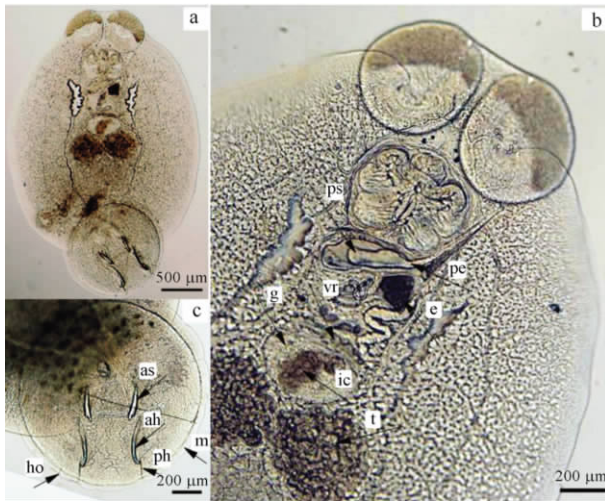


图 1 象山港梅氏新贝尼登虫成虫

- a. 整体, b. 前端, c. 后吸盘, as. 附甲片, ah. 前钩, ph. 后钩, ho. 边缘小钩, m. 边缘膜, t. 睾丸, ps. 阴茎囊, pe. 阴茎, g. 卵巢, ic. 受精囊, pe. 阴茎, vr. 卵黄囊, e. 卵

卵巢后面发出,输精管向左绕到卵巢和卵黄囊,继续几个环绕后从储精囊进入到阴茎囊中;雄性交接器呈棒状,位于咽后缘,由副腺储蓄泡和储精囊组成,两者终止于阴茎囊,阴茎前端细长短小;卵巢长 $[236 \sim 411 \mu\text{m} (362 \mu\text{m})] \times$ 宽 $[246 \sim 405 \mu\text{m} (343 \mu\text{m})]$,位于中部,内含受精囊,缺少阴道;卵黄

囊发达,横卧于卵巢之前,子宫粗短;卵长 $[110 \sim 123 \mu\text{m} (114 \mu\text{m})] \times$ 宽 $[97 \sim 109 \mu\text{m} (105 \mu\text{m})]$,四面体形,有 2 个触角和 1 条细长丝状物(图 1b)。

3.2 28S rDNA 序列测定与系统发育分析

经测序,扩增得到 XSp 的 28S rDNA 5'端序列片段长度为 393 bp。与 GenBank 中 2 种新贝尼登虫和 3 种贝尼登虫 (FJ972004: *N. girellae*; FJ972005: *N. melleni*; AY033939: *B. lutjani*; FJ971969: *B. rohdei*; AY033941: *B. seriolae*) 以及福建 3 种新贝尼登虫 (XGM: *N. melleni*; PDM: *N. melleni*; XGJ: *N. girellae*)^[15] 的 28S rDNA 多序列比对显示, XSp 与 FJ972004: *N. girellae* 相似性为 100%;与 XGJ: *N. girellae* 相似性为 99.4%;与 XGM: *N. melleni* 和 PDM: *N. melleni* 相似性均为 99.1%;与 FJ972005: *N. melleni* 相似性分别为 97.4%;与 3 种贝尼登虫属的相似性为 84.3%~89.5%(见表 1,图 2a)。

基于 28S rDNA 序列的系统进化树(图 2b)显示,外群指环虫(EF100538: *Dactylogyrus* sp. YY) 与贝尼登亚科的 9 种吸虫被分成 2 大类, XSp 与新贝尼登虫属成员形成一个紧密的簇,再与贝尼登虫属成员相聚。

表 1 9 种贝尼登虫 28S rDNA 的相似度(%)和遗传距离

	XSp	FJ97 2004	XGJ	XGM	PDM	FJ97 2005	FJ97 1969	AY03 3939	AY03 3941
XSp		100	99.4	99.1	99.1	97.4	89.5	88.7	84.3
FJ972004	0.000		99.4	99.1	99.1	97.4	89.5	88.7	84.3
XGJ	0.006	0.006		99.7	99.7	99.4	88.7	87.8	83.3
XGM	0.009	0.009	0.003		99.4	99.1	88.4	87.5	83.0
PDM	0.009	0.009	0.003	0.006		99.1	88.4	87.5	83.0
FJ972005	0.026	0.026	0.006	0.009	0.009		89.5	88.7	85.2
FJ971969	0.105	0.105	0.113	0.116	0.116	0.105		98	87.5
AY033939	0.113	0.113	0.122	0.125	0.125	0.113	0.002		87.5
AY033941	0.157	0.157	0.167	0.170	0.170	0.148	0.125	0.125	

注:对角线上方为相似度百分比,对角线下方为遗传距离。

3.3 ITS1 序列测定与系统发育分析

经测序,扩增得到 XSp 的 ITS1 序列片段长度为 427 bp。与 GenBank 中 2 种新贝尼登虫和 1 种贝尼登虫 (AY551323: *N. melleni*; AY551326: *N. girellae*; AY551324: *B. sargocentron*) 的 ITS1 多序列比对结果显示, XSp 与 AY551323: *N. melleni* 和

AY551326: *N. girellae* 的相似性均为 99.7%,与 AY551324: *B. sargocentron* 的相似性为 60.2%(见图 3a,表 2)。基于 ITS1 序列的系统进化树(见图 3b)显示,外群内吸虫(AY551325: *E. corona*)与贝尼登亚科的 4 种吸虫被分成 2 大类, XSp 与新贝尼登虫属成员形成一个紧密的簇,再与贝尼登虫属成员相聚。

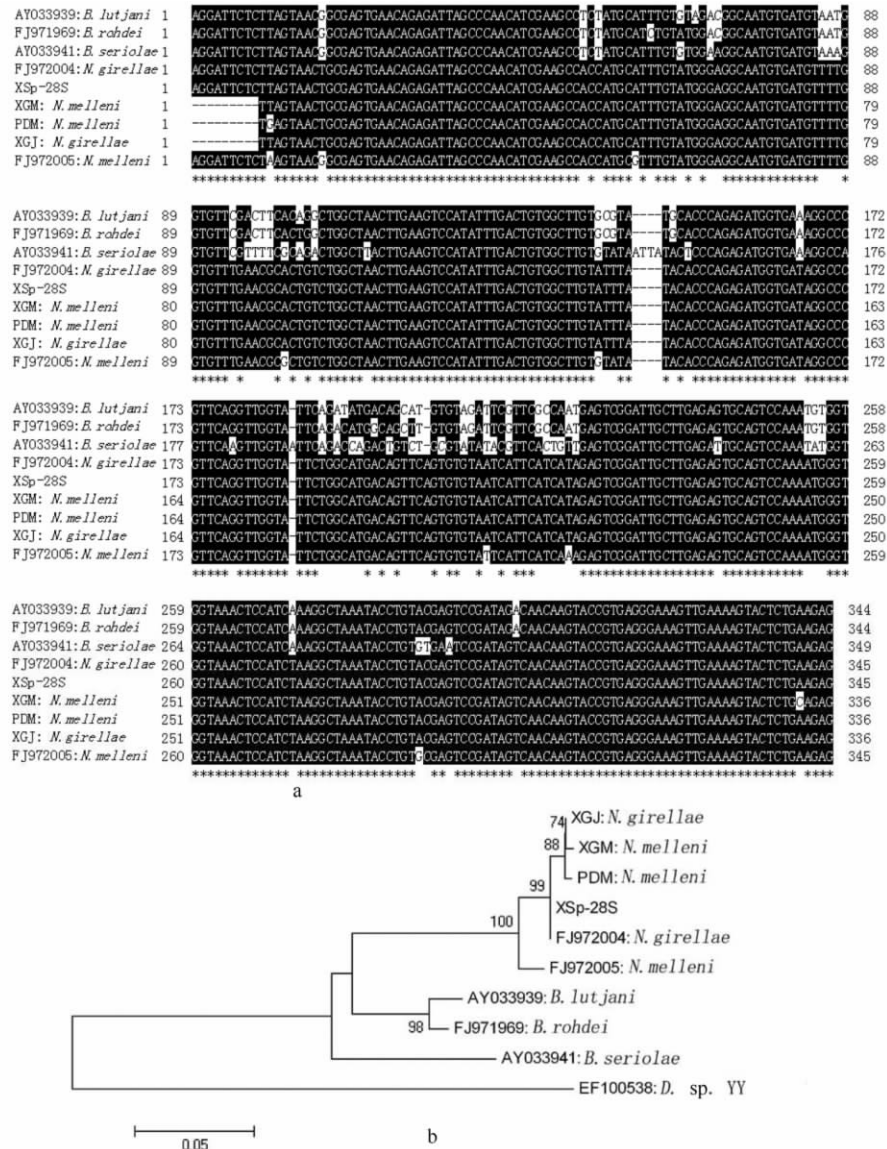


图 2 9 种贝尼登虫 28S rDNA 部分序列比较 (a) 和系统树 (b)
b 中分支上的数值为 Bootstrap 1 000 次循环的自举检验值 (<60% 的不显示)

表 2 4 种贝尼登虫 ITS1 部分序列的相似度 (%) 和遗传距离

	XSp	AY551323	AY551326	AY551324
XSp		99.7	99.7	60.5
AY551323	0.003		99.4	60.2
AY551326	0.003	0.006		60.2
AY551324	0.395	0.398	0.398	

注: 对角线上方为相似度百分比, 对角线下方为遗传距离。

4 讨论

长期以来, 单殖吸虫的分类主要依赖传统的形

态学分类方法, 通过肉眼和光学显微镜观察、依靠描述虫体及器官的形态、大小和位置进行分类鉴定。本研究对象山港海域养殖大黄鱼体表贝尼登类单殖吸虫的形态学研究显示, 其虫体后吸盘不分隔且具有 3 对中央大钩和 7 对边缘小钩, 缺少阴道, 副腺位于阴茎囊内。根据 Yamaguti^[3] 与 Whittington 和 Horton^[2] 的分类方法该虫均属于新贝尼登虫属, 其形态特征虽与杨文川等^[1] 记述的侵染厦门海域养殖鱼类的梅氏新贝尼登虫高度相似, 但仍不能确定具体种。

由于对虫体、附甲片的形态、大小等是种的标志

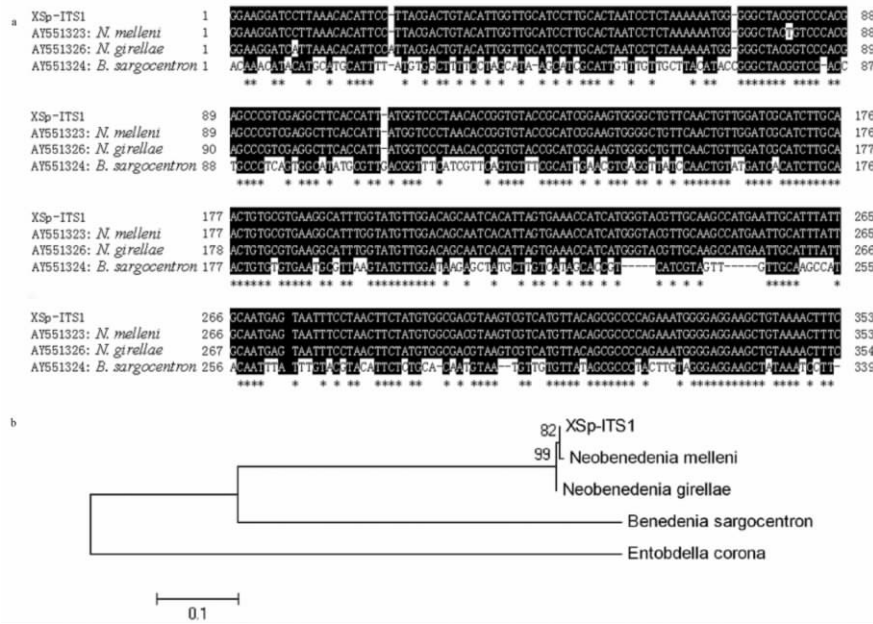


图 3 4 种贝尼登虫 ITS1 部分序列比较(a)和系统树(b)

b 中分支上的数值为 Bootstrap 1 000 次循环的自举检验值(<60%的不显示)

还是种内分化特征等问题存在争议,另外环境温度、寄生虫年龄、样本采集处理方法等可能导致虫体形态的改变,特别是有些新贝尼登虫寄主种类非常多,如梅氏新贝尼登虫已被报道寄生于 100 多种海水鱼类,寄主种类的不同也会引起虫体某些特征出现变异^[2],这都使新贝尼登虫的准确分类变得困难,目前国际上对新贝尼登虫属的定种仍存争议:Yamaguti^[3]将梅氏新贝尼登虫(*N. melleni*)和鲃新贝尼登虫(*N. girellae*)分别列为独立种,Bondadreantaso 等^[16]和 Yoshinaga 等^[17]赞同此观点,而 Whittington 和 Horton^[2]则认为 *N. girellae* 和 *N. paragueraensis* 均为 *N. melleni* 的同种异名,Deveney 等^[18]赞同此观点。

利用以 PCR 和序列分析为基础的分子分类学方法,从分子水平对贝尼登类单殖吸虫进行亲缘关系探讨和系统进化分析,可有效避免虫体形态改变和肉眼观察带来的误差,对研究贝尼登类单殖吸虫的准确定种、遗传变异等是非常必要的^[4-5]。28S rDNA,ITS1 序列分析和 SSCP 技术已被用于贝尼登类单殖吸虫的研究^[13,15,19-20];张纹等^[15]测定分析了福建海区的梅氏新贝尼登虫和鲃新贝尼登虫的 28S rDNA 序列,发现两者遗传相似度高达 99.7%,甚至高于不同海区、不同宿主梅氏新贝尼登虫间的相似度(99.41%);Li 等^[13]对贝尼登类单殖吸虫进行的 PCR-SSCP 分析结果显示 *N. melleni* 和 *N.*

girellae 具有相同的 ITS1 序列特征带,这两个研究结果都提示梅氏新贝尼登虫和鲃新贝尼登虫为同一种。另外,杨文川等^[21]研究发现梅氏新贝尼登虫和鲃新贝尼登虫在从虫卵、钩毛蚴到童虫各个发育阶段的形态特征均高度相似,揭示两者应为同种异名。

本研究对象山港海域养殖大黄鱼体表贝尼登类单殖吸虫的 28S rDNA 和 ITS1 基因进行了扩增和测序,并与已发布的多个新贝尼登虫和贝尼登虫 28S rDNA 和 ITS1 序列进行比对分析和系统进化树构建。基于 28S rDNA 序列和 ITS1 序列的系统进化树均显示 XSp 与新贝尼登虫形成一个紧密的单系簇,与贝尼登虫亲缘关系较远,这与 Whittington 等^[20]的研究结果相一致。序列比对显示,除与登录号为 FJ972005 的 *N. melleni* 28S rDNA 序列相似性为 97.4%外,XSp 的 28S rDNA 和 ITS1 与几个 *N. melleni* 和 *N. girellae* 的序列相似性均大于 99%,而与几种贝尼登虫序列相似性均小于 90%,提示 XSp,*N. melleni* 和 *N. girellae* 应为种内关系。

根据上述分析,象山港养殖大黄鱼体表寄生的贝尼登类单殖吸虫可定种为梅氏新贝尼登虫(*N. melleni*),基于 28S rDNA 和 ITS1 的分子分类结果支持 Whittington 和 Horton^[2]提出的梅氏新贝尼登虫(*N. melleni*)和鲃新贝尼登虫(*N. girellae*)为同种异名的分类观点。

参考文献:

- [1] 杨文川, 李立伟, 石磊, 等. 福建海水养殖鱼类寄生贝尼登虫病原学研究[J]. 台湾海峡, 2001, 20(2): 205—209.
- [2] WHITTINGTON I D, HORTON M A. A revision of *Neobenedenia* Yamaguti, 1963 (Monogenea: Capsalidae) including a redescription of *N. melleni* (MacCallum, 1927) Yamaguti, 1963[J]. Journal of Natural History, 1996, 30: 1113—1156.
- [3] YAMAGUTI S. System Helminthum: Vol. IV. Monogenea and Aspidocotylea[M]. New York: John Wiley and Sons Interscience Publishers, 1963.
- [4] PERKINS E M, DONNELLAN S C, BERTOZZI T, et al. Looks can deceive; molecular phylogeny of a family of flatworm ectoparasites (Monogenea: Capsalidae) does not reflect current morphological classification[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2009, 52: 705—714.
- [5] PERKINS E. Family ties; molecular phylogenetics, evolution and radiation of flatworm parasites (Monogenea: Capsalidae)[D]. South Australia: The University of Adelaide, 2010.
- [6] MOLLARET I, JAMIESON B G M, ADLARD R D, et al. Phylogenetic analysis of the Monogenea and their relationships with Digenea and Eucestoda inferred from 28S rDNA sequences[J]. Molecular and Biochemical Parasitology, 1997, 90(2): 433—438.
- [7] LITTLEWOOD T J, JOHNSTON D A. Molecular phylogenetics of the four schistosoma species groups determined with partial 28S ribosomal RNA gene sequences[J]. Parasitology, 1995, 111(02): 167—175.
- [8] MORGAN J A T, BLAIR D. Nuclear rDNA ITS sequence variation in the trematode genus *Echinostoma*: an aid to establishing relationships within the 37-collar-spine group[J]. Parasitology, 1995, 111(05): 609—615.
- [9] VAN HERWERDEN L, BLAIR D, AGATSUMA T. Intra- and inter-specific variation in nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 of the *Schistosoma japonicum* species complex[J]. Parasitology, 1998, 116(04): 311—317.
- [10] HOSTE H, CHILTON N B, BEVERIDGE I, et al. A comparison of the first internal transcribed spacer of ribosomal DNA in seven species of *Trichostrongylus* (Nematoda: Trichostrongylidae)[J]. International Journal for Parasitology, 1998, 28(8): 1251—1260.
- [11] OLSON P D, LITTLEWOOD D T J. Phylogenetics of the Monogenea—evidence from a medley of molecules[J]. International Journal for Parasitology, 2002, 32(3): 233—244.
- [12] HASSOUNA N, MICHOT B, BACHELLERIE J P. The complete nucleotide sequence of mouse 28S rRNA gene: implication for the process of size increase of the large subunit rRNA in higher eukaryotes[J]. Nucleic Acids Res, 1984, 12: 3563—3583.
- [13] LI A X, WU X Y, DING X J, et al. PCR-SSCP as a molecular tool for the identification of *Benedeniinae* (Monogenea: Capsalidae) from marine fish[J]. Molecular and Cellular Probes, 2005, 19(1): 35—39.
- [14] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Mol Bio Evol, 2007, 24(8): 1596—1599.
- [15] 张纹, 王军, 苏永全, 等. 两种新贝尼登虫 28S rRNA 序列分析及其亲缘关系探讨[J]. 海洋学报, 2004, 26(5): 116—122.
- [16] BONDADREANTASO M G, OGAWA K, FUKUDOME M. Reproduction and growth of *Neobenedenia girellae* (Monogenea, Capsalidae): a skin parasite of cultured marine fishes of Japan[J]. Fish Pathology, 1995, 30(3): 227—231.
- [17] YOSHINAGE T, NAGAKURA T, OGAWA K, et al. Attachment-inducing capacities of fish tissue extracts on oncomiracidia of *Neobenedenia girellae* (Monogenea, Capsalidae)[J]. Journal of Parasitology, 2000, 86(2): 214—219.
- [18] DEVENNEY M R, CHISHOLM L A, WHITTINGTON I D. First published record of the pathogenic monogenean parasite *Neobenedenia melleni* (Capsalidae) from Australia[J]. Dis Aquat Org, 2001, 46: 79—82.
- [19] 丁雪娟, 李安兴, 张剑英, 等. 海水鱼类寄生本贝尼登虫的 ITS1 序列[J]. 华南师范大学学报: 自然科学版, 2003, 2: 85—90.
- [20] WHITTINGTON I D, DEVENNEY M R, MORGAN J A T, et al. A preliminary phylogenetic analysis of the *Capsalidae* (Platyhelminthes: Monogenea: Monopisthocotylea) inferred from large subunit rDNA sequences[J]. Parasitology, 2004, 128(5): 511—519.
- [21] 杨文川, 李立伟, 石磊, 等. 新贝尼登虫(单殖目: 多室科)的发育[J]. 动物学报, 2002, 48(1): 75—79.

28S rDNA, ITS1 and adults morphological identification of *Neobenedenia* in cultured *Pseudosciaena crocea* at Xiangshan Harbor

MIAO Liang¹, LI Mingyun¹, JIANG Jin¹, DING Wenchao¹, CHEN Jiong¹, SHI Yuhong¹

(1. Key Laboratory of Ministry of Education for Applied Marine Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: In recent years, *Neobenedenia* has caused serious damage on cage-cultured fish at Xiangshan Harbor, Zhejiang Province, China. The *Neobenedenia* adults (denoted by XSp) were collected from cultured *Pseudosciaena crocea*. The XSp sequences of 28S coding region of rRNA gene (28S rDNA) and the first internal transcribed spacer (ITS1) as well as morphology were studied for identification. The morphological characteristics showed that XSp belongs to *Neobenedenia* which was morphologically similar to *Neobenedenia melleni*. In XSp, the length of 28S rDNA was 393 bp and ITS1 was 427 bp. In phylogenetic analysis, *Neobenedenia* and *Benedenia* were split into two clades, and the XSp was in clade *Neobenedenia*. The sequences identities of 28S rDNA and ITS1 were 84.3%~89.5% and 60.2% among XSp and *Benedenia*, respectively. With one exception of 97.4%, the sequences identities of 28S rDNA and ITS1 among XSp, *N. melleni* and *N. girellae* were above 99%, which indicated that they are the same species. The results of two identification methods showed that the *Neobenedenia* at Xiangshan Harbor was *N. melleni*, and supported the opinion in which Whittington & Horton (1996) proposed that *N. melleni* and *N. girellae* were synonymy.

Key words: Capsalidae; *Neobenedenia melleni*; morphological characteristics; 28S rDNA; ITS1; taxonomy