

ISSR 标记在河蟹种质检测中的应用

郑芳, 吕秀玲, 孙红英, 周开亚, 赵强, 高伟, 徐信荣

(南京师范大学 生命科学院 江苏省资源生物技术重点实验室, 江苏 南京 210097)

摘要:将 ISSR 分子标记技术应用于天然水域河蟹(*Eriocheir japonica*)的遗传检测, 结合来自母系的线粒体 DNA 分子标记鉴别, 并通过部分样本的细胞色素 *b* 基因变异位点测定, 对 ISSR 标记检测结果做进一步分析和评价。对 PCR/RFLP 检测发现的 2 个携带中华亚种单元型的湛江青年河样本与来自鸭绿江、长江、闽江和南流江样本的 ISSR 检测与聚类分析表明: 1) 来自 4 个水系的河蟹聚为 2 大支, 与中国大陆绒螯蟹的 2 个亚种分支相对应, 即 *E. japonica sinensis* 和 *E. japonica hepuensis*; 2) 来自南方水系湛江青年河的 2 个携带中华亚种单元型个体聚在北方的中华亚种(*E. j. sinensis*)分支中。进一步对这 2 个样本的细胞色素 *b* 基因全序列测定分析表明, 它们分别来源于中华亚种的 ES2 和 ES15 支系。提示 ISSR 标记可以提供天然水域河蟹种质混杂状况的核 DNA 方面的证据。同时表明, ISSR 标记可以为河蟹种质资源的遗传研究提供有用的信息。[中国水产科学, 2007, 14(1): 46—51]

关键词:ISSR; 河蟹; 分子标记

中图分类号: Q959.223

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2007)01-0046-06

河蟹是中国重要的名优水产品之一, 分子系统研究表明, 分布在中国大陆的河蟹是日本绒螯蟹(*Eriocheir japonica*)的 2 个亚种, 即中华绒螯蟹(*E. japonica sinensis*)与合浦绒螯蟹(*E. japonicus hepuensis*)^[1-2]。前者分布于中国东部和北部各水系, 后者则分布于闽江以南各水系。20 世纪 70 年代, 长江口蟹苗曾经被投放到广东珠江流域, 但第 2 年即蜕变成个体小、早熟的“珠江毛蟹”^[3-4]。20 世纪 80 年代以来, 由于市场对蟹苗需求量的急剧增大, 造成辽河、瓯江蟹苗大量涌入长江中下游地区, 加速了各水系绒螯蟹的混杂^[5-6]。关于长江水系河蟹的种质混杂, 已有用线粒体 DNA 标记检测的报道^[7-8]。但是, 对于南方水系河蟹种质资源的混杂状况, 尚缺少分子遗传学方面的证据。

简单重复序列间扩增(Inter-simple sequence repeat, ISSR)多态性标记是近年来在微卫星技术上发展起来的一种新的分子标记技术。该技术利用锚定引物扩增微卫星位点之间的区域, 与 RAPD(random amplified polymorphic DNA)相比, 其每条引物可产生更多的多态性条带。而且, ISSR 标记, 包括条带

的有无, 都是共显性的标记^[9]。对基因组 DNA 多态性具有快速、高效、灵敏的检测特性, 而且可重复性好, 操作简便、成本较低, 适用于大样本的遗传鉴别检测^[10-12]。近年来, ISSR 标记技术在动物遗传多样性与遗传变异分析、亲缘关系判定, 以及水产动物如卤虫等品系的分析、鉴定等方面已有广泛的应用^[13-19]。本研究应用 ISSR 分子标记技术, 结合线粒体 DNA 的鉴别结果, 对南、北方水系河蟹的部分样本进行遗传检测。并通过测定个别样本的细胞色素 *b* 基因全序列, 对 ISSR 标记的检测结果进行验证, 从核 DNA 水平对天然水域河蟹的种质混杂情况做初步分析, 以为河蟹种质资源的研究与保护提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料与总基因组 DNA 制备

采自中国大陆 4 个水系(鸭绿江、长江、闽江和南流江), 包括湛江青年河在内的天然河蟹 104 只(表 1)。取腹肢肌肉约 0.05 g, 用常规的 SDS/蛋白酶 K 裂解, 酚/氯仿法提取总 DNA。

收稿日期: 2006-03-02; 修订日期: 2006-06-30。

基金项目: 国家自然科学基金项目(30271023); 江苏省水产三项工程项目(PJ2003-33)。

作者简介: 郑芳(1980—), 女, 硕士, 主要从事甲壳动物分子生物学的学习与研究。E-mail: zhengfang1102@126.com

通讯作者: 孙红英。E-mail: sunhongying@njnu.edu.cn

表 1 样本数量及采集地
Tab. 1 Sample size and collecting localities

水系 River system	样本数量 Sample size			采集地点 Collecting locality
	Id*	ISSR**	SEQ***	
鸭绿江 Yalu River	7	2	0	辽宁丹东 Dandong, Liaoning
长江 Yangtze River	21	2	0	上海崇明长江口 Yangtze Estuary, Chongming, Shanghai
长江 Yangtze River	15	1	0	江苏镇江 Zhenjiang, Jiangsu
长江 Yangtze River	8	3	0	安徽铜陵 Tongling, Anhui
闽江 Minjiang River	3	1	0	福建永田 Yongtian, Fujian
青年河 Young River	24	2	2	广东湛江青年河 Young River, Zhanjiang, Guangdong
南流江 Nanliu River	26	5	0	广西合浦 Hepu, Guangxi
合 计 Total	104	16	2	

注: * Id 单元型鉴别—用 PCR/RFLP 标记鉴别中华亚种单元型与合浦亚种单元型。
** ISSR—用于 ISSR 标记的遗传检测。
*** SEQ—测定细胞色素 *b* 基因的全序列。
Note: * Id—Identification of *sinensis* haplotype and *hepensis* haplotype using 16S rDNA PCR/RFLP diagnostic marker.
** ISSR—Analyzing genetic background using ISSR.
*** SEQ—Sequencing the complete mitochondrial cytochrome *b* gene.

1.2 16S rDNA PCR/RFLP 分子鉴别

用 IHX01-L 和 IHX01-H 引物(中国发明专利号:ZL 01 1 27215. 5.)扩增 16S rDNA 片段,用限制性内切酶 *Dra* I 对 PCR 产物进行酶切,以鉴别中华亚种与合浦亚种单元型^[7]。

1.3 ISSR 分子标记检测

结合来自母系的 mtDNA PCR/RFLP 鉴别检测结果,对包括采自南方水系的携带中华亚种单元型个体在内的 4 个水系 16 个样本进行核 DNA 多态性分析。

依据加拿大哥伦比亚大学(UBC)公布的第 9 套 ISSR 引物序列([http://www. Michaelsmith. Ubc. Ca/services/NAPS/Primer-Sets/Primers](http://www.Michaelsmith.Ubc.Ca/services/NAPS/Primer-Sets/Primers)),并参照 Kostia 等^[20]、Abbot^[18]、Kumar 等^[19]和 Nagaraju^[21]的研究结果,选择其中的 30 条引物,均由上海生工公司合成。随机抽取 4 个样本的 DNA 模板,从 30 条 ISSR 引物中筛选出 9 条扩增产物稳定、条带清晰、重复性好的引物(表 2)。

表 2 ISSR 引物序列及退火温度
Tab. 2 ISSR primer sequence and annealing temperature

引物代码 Primer code	序列(5'—3') Sequence(5'—3')	退火温度 A/℃ Annealing Temp. A	退火温度 B/℃ Annealing Temp. B
808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	60	58
817	CAC ACA CAC ACA CAC AA	56	54
825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	58	58
826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	58	56
835	AGA GAG AGA GAG AGA	56	54
836	AGA GAG AGA GAG AGA	58	56
842	GAG AGA GAG AGA GAG	57	57
846	GAG ACA CAC ACA CAC	56	54
848	AGC ACA CAC ACA CAC	56	54
	ARG		

PCR 反应体积为 25 μL,含 *Taq* DNA 聚合酶 1.0 U (Promega), dNTP 0.2 mmol/L, MgCl₂ 1.5 mmol/L,10×Buffer 2.5 μL,引物 0.8 μmol/L,DNA 模板约 10 ng。PCR 反应条件为:95 ℃预变性4 min,前 15 个循环包括 94 ℃变性 40 s、温度 A 退火 40 s、68 ℃延伸 1.5 min,后 22 个循环包括

94 ℃ 变性 20 s、温度 B 退火 40 s、68 ℃延伸 35 s,最后68 ℃ 补齐 14 min。反应在 PTC-200 型热循环仪(MJ Research)上进行。每条引物的 PCR 反应退火温度见表 2。扩增产物在含有溴化乙锭的 2%琼脂糖凝胶中电泳 3~4 h,电压不超过 5 V/cm。电泳结束后直接在凝胶成像系统上扫描记录。

根据电泳结果对 ISSR 条带进行统计与聚类分析。扩增出条带计为“1”，无条带计为“0”，较弱的条带忽略。依据 Nei 和 Li 的公式^[22]： $S=2N_{xy}/(N_x+N_y)$ ，通过 Popgen 1.32 软件^[23]计算个体间的相似系数(Similarity index, S)。公式中 N_{xy} 是 X, Y 两个个体共享的 ISSR 条带数, N_x 、 N_y 分别为 X 和 Y 个体独有的 ISSR 条带数。并在此基础上用 NTSYSpc version 2.10e^[24]中的 SANH 程序进行非加权配对算术平均法(UPGMA)聚类,分析个体间的关系。

1.4 线粒体细胞色素 b 基因全序列测定与单元型鉴别

为进一步鉴别中华绒螯蟹与合浦绒螯蟹的单元型类型,用 ES-J-2694 和 ES-N-3991 引物^[8]扩增和

测定来自湛江青年河的 2 个样本的 Cyt b 基因全序列。用 CLUSTAL X(1.8)软件^[25]对 Cyt b 全序列进行比对,依据孙红英等^[8]基于 Cyt b 全序列定义的单元型,鉴别样本的单元型类型。

2 结果与分析

2.1 中华单元型与合浦单元型的鉴别

用 16S rDNA PCR/RFLP 鉴别标记对包括湛江青年河在内的 4 个水系、104 个样本的分子鉴别结果显示,长江水系样本中有 2 个携带合浦亚种单元型的个体,而在来自湛江青年河的样本中,则检测出 2 个携带中华亚种单元型的个体(表 3)。

表 3 16S rDNA PCR/RFLP 鉴别结果

Tab. 3 Diagnostic analysis using 16S rDNA PCR/RFLP marker

单元型 Haplotype	鸭绿江 Yalu River	长江 Yangtze River	闽江 Minjiang River	南流江 Nanliu River	湛江青年河 Young River, Zhanjiang
中华亚种单元型 <i>sinensis</i> haplotype	7(7)	42(44)	0(3)	0(26)	2(24)
合浦亚种单元型 <i>hepuensis</i> haplotype	0(7)	2(44)	3(3)	26(26)	22(24)

注:括号内、外的数字分别表示各水系用于 16S rDNA PCR/RFLP 鉴别的样本总数与鉴别出的各单元型样本数。

Notes: The numbers in the brackets donate the size of identified sample using 16S rDNA PCR/RELP diagnostic marker. The numbers outside the brackets donate the number of *sinensis* haplotype or *hepuensis* haplotype identified.

2.2 用 ISSR 标记对部分样本的遗传检测

对来自南流江、闽江、长江和鸭绿江 4 个水系以及湛江青年河在内共 16 个样本的 ISSR 检测结果显示,各条引物检测到的位点数从 7 到 11 不等,平均每条引物检测到 8.88 个位点,共获得 80 条清晰稳定的条带,其中有 53 条多态性条带,多态率为 66.25%(图 1)。

基于遗传距离建立的 16 个样本的 UPGMA 树(图 2)显示,来自闽江和南流江的样本与来自湛江青年河、长江和鸭绿江的样本分别聚成 A、B 2 个分支。在 A 分支内,所有来自南流江的样本首先相聚,再与来自闽江的样本聚为一支。在 B 分支内,来自湛江青年河的 7 号和 8 号样本首先与来自长江的 9 号样本相聚(B1 支),再与由来自长江的其他样本和来自鸭绿江的样本聚成的 B2 支相聚。

16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 M bp

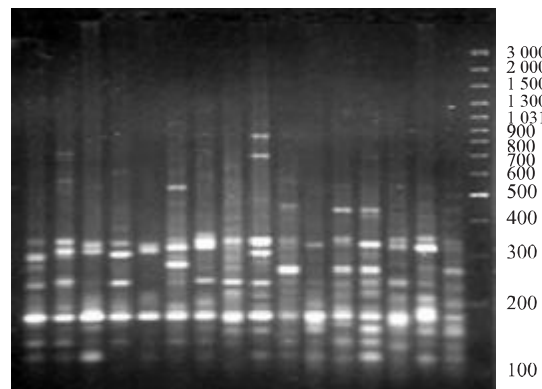


图 1 引物 835 对绒螯蟹 16 个个体的扩增结果
1~6 号为 6 个合浦单元型个体,7~16 号为 10 个中华单元型个体,M 表示 marker。

Fig. 1 Amplification results of primer 835 for 16 crabs
Numbers 1—6 are *hepuensis* haplotype; numbers 7—16 are *sinensis* haplotype; M donates marker.

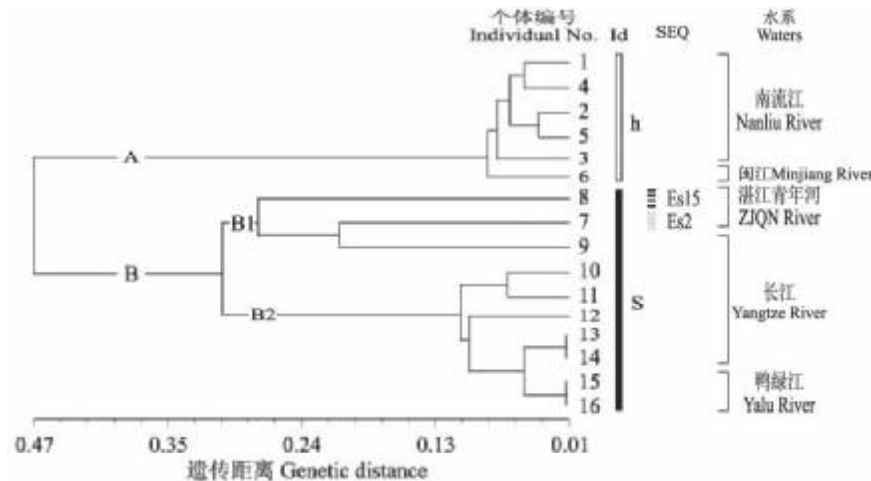


图 2 基于 ISSR 图谱构建的河蟹 UPGMA 聚类分析图

Id:16S rDNA 的 PCR/RFLP 鉴别结果,h 表示合浦单元型,s 表示中华单元型;SEQ:Cyt b 的全序列分析结果,Es2、Es15 表示 2 种不同的中华单元型。

Fig. 2 UPGMA dendrogram for the mitten crab based on inter-simple sequence repeat patterns

Id:Diagnostic results using 16S rDNA PCR/RFLP marker,h denotes *hepuensis* haplotype,s denotes *sinensis* haplotype;SEQ:result of the complete mitochondrial cytochrome b gene sequencing analysis,Es2 and Es15 denotes two different *sinensis* haplotypes.

2.3 Cyt b 全序列分析结果

获得的 10 条绒螯蟹 Cyt b 基因全序列在 Gen-Bank 中的检索号为: DQ114203, DQ114207, DQ114169, DQ114197, DQ114174, DQ114155, DQ114144, DQ114150, DQ114154 和 DQ114142(对应的个体编号分别为 1, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15)。对来自长江和鸭绿江的 6 个携带中华亚种单元型样本的 Cyt b 序列比对结果显示,它们分别属于不同的 Es1 和 Es4 单元型类型(图 2);对 2 个来自闽江、南流江的携带合浦亚种单元型样本的 Cyt b 序列比对结果则表明,二者同属于 1 种单元型(Eh1,图 2)。对来自湛江青年河的 2 个携带中华亚种单元型样本的 Cyt b 序列比对发现,二者分别为中华单元型 Es2 和 Es15(图 2)。

3 讨论

基于 16S rDNA PCR/RFLP 的分子检测结果表明,长江水系样本中有 2 个具有合浦亚种单元型的个体,而来自湛江青年河的 7~8 号个体则为中华亚种单元型。对于分布在北方水系的携带合浦亚种单元型河蟹的遗传背景及其形成,孙红英等^[8]基于 Cyt b 全序列变异做了初步分析。对于在南方水系

中检测到的携带中华亚种单元型河蟹的遗传背景,本研究基于 ISSR 分子标记以及 Cyt b 全序列测定进行了分析。

根据 Cyt b 全序列遗传变异分析,2 个来自湛江青年河的携带中华亚种单元型的河蟹分别属于中华单元型 Es2 和 Es15,说明它们来源于 2 个不同的 mtDNA 支系(lineage)。ISSR 标记的检测结果显示,来自 4 个水系的 16 个个体聚成 A、B 两支。A 分支由来自南方水系的个体组成,称之为合浦亚种分支;B 分支由多数来自北方水系的个体组成,称之为中华亚种分支。值得注意的是,来自湛江青年河的 2 个个体也聚在 B 分支中,且与来自长江铜陵的个体关系更近,3 者聚为单独的一支(B1 支)。据此认为,南方水系中湛江青年河的河蟹存在种质的混杂。本研究应用线粒体和核 DNA 标记,在闽江以南的水系中检测到了河蟹的混杂现象。对南方水系中检测出的这 2 个携带中华亚种遗传特性的个体的形成,推测可能是由于地区间频繁引种、盲目放流等人类活动,或自然原因导致的中华亚种的 2 个 mtDNA 支系(Es2、Es15)流入南方水系的结果。尽管线粒体基因标记在检测遗传漂流时比核基因标记更为灵敏^[26],但是作为单系的遗传标记,其母系遗传特

点又限制了它对种群遗传关系的全面检测^[27-30],借助核基因组 DNA 标记的遗传检测有助于弥补这种缺陷。本研究将 ISSR 技术初步应用于南方已混杂的河蟹遗传背景的检测,从核 DNA 水平提供了南方水系河蟹中混杂有中华绒螯蟹的分子证据。同时表明,ISSR 标记可以为河蟹种质资源的遗传检测研究提供参考。

致谢:安徽省铜陵淡水豚自然保护区于道平高级工程师、江苏省水产局钱林峰同志协助采集部分样本;南京师范大学生命科学院硕士研究生王光跃、张代臻、杨小军采集样本。王光跃完成部分样本的线粒体 DNA 分子鉴别与细胞色素 b 基因全序列测定,谨表示衷心感谢。

参考文献:

- [1] Tang B P, Zhou K Y, Song D X, et al. Molecular systematics of the Asian mitten crabs, genus *Eriocheir* (Crustacea: Brachyura) [J]. *Molecul Phylogen Evolut*, 2003, 29 (2): 309—316.
- [2] 孙红英,周开亚,杨小军. 从线粒体 16S rDNA 序列探讨绒螯蟹类的系统发生关系[J]. *动物学报*, 2003, 49(5): 592—599.
- [3] 赵乃刚. 我国的河蟹业及其发展前景[J]. *科学养鱼*, 2000, 6: 5—6.
- [4] 彭武汉. 中华绒螯蟹种群在珠江流域变异问题的初步探讨[J]. *水产科技情报*, 1986, 13(2): 19—22.
- [5] 赵乃刚. 长江河蟹种质资源混杂对养蟹业的影响[J]. *内陆水产*, 1998, 5: 2—4.
- [6] 李思发,邹曙明. 中国大陆沿海六水系绒螯蟹(中华绒螯蟹和日本绒螯蟹)群体亲缘关系: RAPD 指纹标记[J]. *水产学报*, 1999, 23(4): 315—330.
- [7] 孙红英,周开亚,陆健健,等. 中国大陆绒螯蟹 16S rDNA 序列变异与分子鉴定标记[J]. *自然科学进展*, 2002, 12: 485—489.
- [8] 孙红英,王光跃,张代臻,等. 中华绒螯蟹与合浦绒螯蟹两地理亚种的线粒体 DNA 序列变异[J]. *动物学报*, 2005, 51(5): 862—866.
- [9] Wolfe A D, Xiang Q Y, Kephart S R. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable inter simple sequence repeat markers [J]. *Molecul Ecol*, 1998, 7: 1107—1125.
- [10] Zietkiewicz E, Rafalske A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genome*, 1994, 20: 178—183.
- [11] Charters Y M, Robertson A, Wilkinson M J, et al. PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) using 5'-anchored simple sequence repeat (SSR) primers[J]. *Theor Appl Genet*, 1996, 92: 442—447.
- [12] Nagaoka T, Ogihara Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers[J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 597—602.
- [13] Ostberg C O, Rodriguez R J. Novel molecular markers differentiate *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout and steelhead) and the *O. clarki* (cutthroat trout) subspecies[J]. *Molecul Ecol Not*, 2002, 2: 197—202.
- [14] Reddy K D, Nagaraju J, Abraham E G. Genetic characterization of the silkworm *Bombyx mori* by simple sequence repeat (SSR)-anchored PCR[J]. *Heredity*, 1999, 83: 681—687.
- [15] Caldeira R L, Vidigal THDA, Simpson AJG, et al. Genetic variability in Brazilian populations of *Biomphalaria straminea* complex detected by simple sequence repeat anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Mem Ins Oswaldo Cruz*, 2001, 96(4): 535—544.
- [16] 侯林,曲若竹,邹向阳,等. 中国 4 个两性生殖昆虫品系的 ISSR 指纹分析[J]. *辽宁师范大学学报*, 2003, 26(2): 174—177.
- [17] 李东明,林刚,郑劲松,等. 两个不同江豚群体 ISSR 遗传多样性初步分析[J]. *南昌大学学报*, 2005, 26(6): 546—550.
- [18] Abbot P. Individual and population variation in invertebrates revealed by inter-simple sequence repeats (ISSRs) [J]. *Insect Science*, 2001, 1(8): 1—3.
- [19] Kumar L S, Sawant A S, Gupta V S, et al. Comparative analysis of genetic diversity among Indian populations of *Scirpophaga incertulas* by ISSR-PCR and RAPD-PCR [J]. *Biochem Genet*, 2001, 39: 297—309.
- [20] Kostia S, Ruohonen-Lehto M, Varvio S L. Phylogenetic information in inter-SINE and inter-SSR fingerprints of the *Artiodactyla* and evolution of the Bov-tA SINE [J]. *Heredity*, 2000, 84: 37—45.
- [21] Nagaraju J. Comparison of multilocus RFLPs and PCR-based marker systems for genetic analysis of the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Heredity*, 2001, 86: 588—597.
- [22] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease [J]. *Proc Nall Acad Sci USA*, 1979, 76(10): 5269—5273.
- [23] Yeh F C, Yang R C, Boyle T B J, et al. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis [D]. Edmonton: University of Alberta, 1997.
- [24] Rohlf F J. NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2. 1 [CP]. New York: Exeter Software, Setauket, 2000.
- [25] Thompson J, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucl Acids Res*, 1997, 24: 4876—4882.
- [26] Birky C W, Fuerst P, Maruyama T. Organelle gene diversity under migration, mutation, and drift equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes [J]. *Genetics*, 1989, 121: 613—627.
- [27] Barrowclough G F, Groth J G, Mertz L A, et al. Genetic structure, introgression, and a narrow hybrid zone between northern and California spotted owls (*Strix occidentalis*) [J]. *Mol*

- Evol,2005,14,1:109—1120.
- [28] Anne Reilly, Nicholas G, Elliott, et al. Genetic differentiation between Tasmanian cultured Atlantic salmon *Salmo salar* L. and their ancestral Canadian population; comparison of microsatellite DNA and allozyme and mitochondrial DNA variation [J]. Aquaculture, 1999, 173: 459—469.
- [29] Chow S, Kishino H. Phylogenetic relationships between tuna species of the genus *Thunnus* (Scombridae, Teleostei); inconsistent implications from morphology, nuclear and mitochondrial genomes [J]. Mol Evol, 1995, 41: 741—748.
- [30] Nilsson J. mtDNA and microsatellite variation in Baltic Atlantic salmon [J]. J Mar Sci, 1997, 54, 1: 173—176.

Application of ISSR markers in germplasm analyzing of mitten crab

ZHENG Fang, LU Xiu-ling, SUN Hong-ying, ZHOU Kai-ya, ZHAO Qiang, GAO Wei, XU Xin-rong
(Jiangsu Key Laboratory for Bioresource Technology, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing Jiangsu 210097, China)

Abstract: The genetic admixture occurred in the mitten crabs has been inferred from populations distributed in the northern river systems of China using mitochondrial DNA markers, but the information of those ranging in the southern rivers is poorly understood. Recently, a PCR-based DNA marker, ISSR (Inter-simple sequence repeats) was widely used to investigate genetic diversification at inter- and intraspecific level. This study focused on the application of ISSR molecular marker on the genetic diagnostic analysis of the mitten crab populations. The maternal mitochondrial DNA diagnostic marker and sequencing techniques were also used in the researches to evaluate the effectiveness of ISSR analysis. The cluster analysis based on ISSR for the samples from the Yalu River, the Yangtze River, the Minjiang River and the Nanliu River, including two individuals that were *sinensis* haplotype determined by using 16S rDNA PCR/RFLP diagnostic marker from 24 individuals collected from Zhanjiang Young River, showed that, 1) the mitten crabs from the four river systems could be divided into two clusters, corresponding to the two subspecies clades, *sinensis* and *hepuensis*; 2) the two individuals from Zhanjiang Young River clustered together into the *sinensis* clade. The sequencing analysis of the complete cytochrome *b* gene for the two individuals presents that they belong to two different *sinensis* haplotypes ES2 and ES15. It suggests that the evidence of genetic mixture of the mitten crab in the river system could be found by using ISSR analysis. ISSR could provide useful information for the researches of mitten crab germplasm resources. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(1): 46—51]

Key words: ISSR; mitten crab; molecular marker

Corresponding author: SUN Hong-ying. E-mail: sunhongying@njnu.edu.cn