

香鱼(*Plecoglossus altivelis*)养殖群体遗传多样性的 AFLP 分析及性别特异性分子标记筛选*

闫松松 苗亮 李明云 范慧慧 胡谋 陈炯 史雨红

(宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室 宁波 315211)

摘要 采用扩增片段长度多态性(AFLP)技术分析了香鱼(*Plecoglossus altivelis*)养殖群体的遗传多样性,并筛选性别特异性分子标记。结果表明,15对选扩引物组合共扩增到889个位点,其中多态性位点380个,多态率为42.74%;群体 Nei 氏遗传多样性指数为0.1454, Shannon 氏指数 I 为0.2174。香鱼养殖群体的遗传多样性较丰富,处于中等偏上水平。仅引物组合 E-ATG/M-CTG 扩增到1条雄性特异性条带,长度为139bp。以该雄性特异性 AFLP 条带的 DNA 序列为模板,设计1对特异的 PCR 引物并在10尾已知性别的香鱼(雌雄各5尾)中扩增检验,结果显示5尾雄鱼均可扩增到目的条带而5尾雌鱼均无扩增。表明该序列是雄性特异性分子标记,可用于鉴别香鱼的遗传性别,并为香鱼的性别决定机制和性别控制研究奠定基础。

关键词 香鱼; 扩增片段长度多态性(AFLP); 养殖群体; 遗传多样性; 性别特异性标记

中图分类号 Q346 **doi:** 10.11693/hyhz20140100006

香鱼(*Plecoglossus altivelis*)属胡瓜鱼目(Osmeriformes)、香鱼科(Plecoglossidae)、香鱼属(*Plecoglossus*),是一种小型名贵经济鱼类,有“淡水鱼之王”的美称。目前中国大陆的野生香鱼资源已濒临枯竭,自20世纪80年代末、90年代初实现全人工育苗和养殖以来,香鱼养殖业获得了很大的发展(李明云等,1999)。国内研究人员已对香鱼的繁殖生物学、育苗与养殖技术以及病害与免疫等方面进行了较多研究(李明云等,2000,2012; Shimizu *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2011; 范慧慧等,2012),但在群体遗传多样性方面仅有少数对野生群体的研究报道:同工酶分析显示宁波鳊溪野生香鱼的遗传多样性较丰富(黄福勇等,2004);线粒体 Cyt *b* 基因和 D-loop 区的多态性分析则显示浙江瑞安、福建宁德和福建东张水库3个香鱼野生群体的遗传多样性水平都不高,特别是东张水库群体的遗传多样性非常贫乏(李娜等,2008; 鲁延付等,2009)。而香鱼养殖群体受有效繁殖群体较小、近亲交配等影响,也

面临种质退化的危险。因此有必要了解养殖香鱼群体的遗传多样性,以便采取措施保护香鱼资源。另外,香鱼雌鱼比雄鱼的经济价值更高,如果能够实现全雌养殖,可大幅提高经济效益。虽然已对香鱼进行了雌核发育诱导研究(Taniguchi *et al.*, 1988, 1990),但目前尚没有可以鉴定香鱼遗传性别的方法。

AFLP(Amplified fragment length polymorphism)即扩增片段长度多态性,是由 Zabeau 和 Vos(1993)发明的一种检测 DNA 多态性的方法,具有无需知道 DNA 序列信息、扩增条带多、灵敏度高、重复性好、多态性丰富等优点,已被广泛用于遗传结构分析、遗传图谱构建、性别特异性标记筛选、种质资源鉴定等诸多领域(Nakamura *et al.*, 2001; 王伟继等,2005; 张滔等,2013)。特别是使用 AFLP 技术已经在三刺鱼(Griffiths *et al.*, 2000)、半滑舌鲷(Chen *et al.*, 2007)、罗非鱼(杨东等,2007)、鲤鱼(Chen *et al.*, 2010)等多种鱼类中筛选到了性别特异性分子标记。

*浙江省科技厅重大科技专项,2009C12077号;国家“973”计划前期研究专项,2008CB117015号;长江学者和创新团队发展计划项目,IRT0734号。闫松松,硕士研究生, E-mail: yansongyiss@126.com

通讯作者:李明云,教授,博士生导师, E-mail: limingyun@nbu.edu.cn

收稿日期:2012-05-17,收修改稿日期:2012-07-31

本文用 AFLP 技术分析香鱼养殖群体的遗传多样性,同时筛选与性别相关的分子标记,以期对香鱼养殖群体的遗传改良和性别调控研究提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用鱼均为采自浙江省宁海县凫溪香鱼养殖场的性成熟香鱼(体重 70—120g),共 2 批,其中 2010 年 9 月随机采集雌性香鱼 15 尾,雄性香鱼 15 尾,共 30 尾用于 AFLP 分析,2011 年 9 月随机采集雌性香鱼 5 尾,雄性香鱼 5 尾,共 10 尾用于性别特异性标记验证。所取香鱼均解剖鉴定生理性别后取背部肌肉,液氮速冻后 -80°C 保存,使用常规酚氯仿法提取香鱼肌肉基因组 DNA。

1.2 AFLP 分析

AFLP 实验方法按照试剂盒(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司)说明书进行。基因组 DNA 经 *EcoRI*/*MseI* 双酶切后与接头相连接,先进行预扩增,用 15 对引物组合进行选择扩增(引物组合见表 1,其中 E 代表 GACTGCGTACCAATTC, M 代表 GATGAGTCCTGAGTAA)。选扩产物进行 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,硝酸银染色显示条带,凝胶成像后用 Quantity One 4.62 (Bio-Rad 公司)统计、分析条带。用 POPGEN 1.31 计算多态性比例 P 、基因多样性指数 H 、Shannon

氏指数 I 等遗传多样性参数(刘翠等, 2011)。根据个体之间的遗传相似系数,采用 NTSYS 软件以 UPGMA 法对 30 个个体做聚类分析,绘制亲缘关系树。

1.3 性别特异性条带筛选

对经解剖确定性别的香鱼,进行雌、雄两性间 AFLP 扩增条带对比,性别特异性条带用聚丙烯酰胺胶回收试剂盒(OMEGA 公司)回收后克隆至 pMD19-T 载体(Takara 公司)中进行测序。用 DNAMAN 4.0 进行序列比对,并在 GenBank 中进行 BLAST 检测。

1.4 性别特异性引物设计与 PCR 验证

根据测序结果,设计 1 对 PCR 引物(上游 5' CAATTCATGTCCCATCATCAC 3'; 下游 5' GAGTAACTGCATTTTTCTGCC 3'),以香鱼基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,程序为: 94°C 预变性 1min; 94°C 变性 30s, 56°C 退火 30s, 72°C 延伸 1min, 循环 30 次; 72°C 延伸 5min; 6°C 保存。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 养殖群体的遗传多样性

用 15 对选扩引物组合对 30 尾养殖香鱼进行 AFLP 扩增,条带分析结果见表 1。各对引物组合的扩增条带数为 41—72 个,其中多态性条带数为 15—46

表 1 香鱼养殖群体的 AFLP 遗传多样性
Tab.1 AFLP genetic diversity of cultured *P. altivelis*

引物组合	多态性位点	总位点数	多态率(%)	Nei 氏基因多样性指数 H	Shannon 氏指数 I
E-ACT/M-CAC	17	51	33.33	0.1192	0.1759
E-AGA/M-CAC	19	55	34.55	0.1295	0.1930
E-AGT/M-CAC	19	70	27.14	0.0868	0.1324
E-ATC/M-CAC	31	70	44.29	0.1770	0.2591
E-AAT/M-CCA	19	55	34.55	0.1078	0.1665
E-ATC/M-CCA	21	63	33.33	0.1274	0.1848
E-ATG/M-CCA	15	67	22.39	0.0727	0.1111
E-AAC/M-CCT	18	56	32.14	0.1039	0.1572
E-AAG/M-CCT	21	50	42.00	0.1234	0.1877
E-AAT/M-CCT	20	63	31.75	0.1058	0.1598
E-AGT/M-CCT	44	65	67.69	0.2724	0.3971
E-ATG/M-CGA	28	41	68.29	0.2306	0.3449
E-ATG/M-CTG	16	46	34.78	0.1458	0.2095
E-AGT/M-CTT	46	65	70.77	0.1884	0.2913
E-ATC/M-CTT	46	72	63.89	0.1904	0.2904
总数	380	889	—	2.1811	3.2607
平均值	25.33	59.27	42.74%	0.1454	0.2174

个, 各位点的多态率为 22.39%—70.77%; 共扩增到 889 个位点(平均每对引物 59.27 个), 其中多态性位点共 380 个(平均每对引物 25.33 个), 占总位点数的 42.74%; 被测群体的 Nei 氏遗传多样性指数为 0.0727—0.2724(平均 0.1454), Shannon 氏指数为 0.1111—0.3971(平均 0.2174)。群体内个体间的遗传相似性最高为 0.9393, 最低为 0.7975, 平均遗传相似性为 0.8575; 遗传距离在 0.0607—0.2025 之间(平均

0.1425)。

2.2 性别特异性标记的筛选与验证

由图 1 可见, 在 15 对选扩引物组合中, 仅引物组合 E-ATG/M-CTG 扩增到一条雄性特异性条带。切胶回收后测序显示该片段含有 139 个碱基, 序列见图 2, 15 尾雄性个体中该片段的碱基序列一致。经 BLAST 检索, 在 GenBank 中未找到任何与该片段同源的序列。

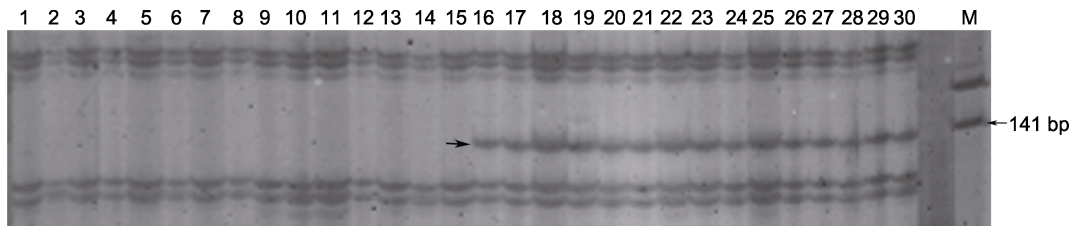


图 1 香鱼雄性特异性 AFLP 条带(引物组合: E-ATG/M-CTG)

Fig.1 The male-special AFLP band of *P. altivelis* (primer pairs: E-ATG/M-CTG)

M: 标准分子量; 1—15: 雌鱼; 16—30: 雄鱼; 箭头示雄性特异性 AFLP 条带

```

1   gactgcggtaccaattcatgTCCCATCATCACACTGGTTCAATAGCAAAGCGTTCAAATACTGAG 64
65  ACTATGGGTTATGTTTCATTTGCATAA CACTGATGCAGCTGATTTGGCAGAAAAATGcagttact 128
129 caggactcatc                                                                139
  
```

图 2 香鱼雄性特异性 AFLP 条带的碱基序列(小写字母示引物序列)

Fig.2 DNA sequence of male-special AFLP marker in *P. altivelis* (lowercase letters show the primers)

根据雄性特异性条带的测序结果设计 1 对 PCR 引物, 对经解剖检查性腺确定性别 10 尾香鱼(雌、雄各 5 尾)的基因组 DNA 进行扩增, 电泳结果显示 5 尾雄性个体中均能扩增到一条特异的、大小为 120bp 的 DNA 条带, 而 5 尾雌性个体中均无此目标条带(图 3)。表明该 DNA 标记是雄性特异性的, 并可通过普通 PCR 扩增检测香鱼个体的遗传性别鉴定。

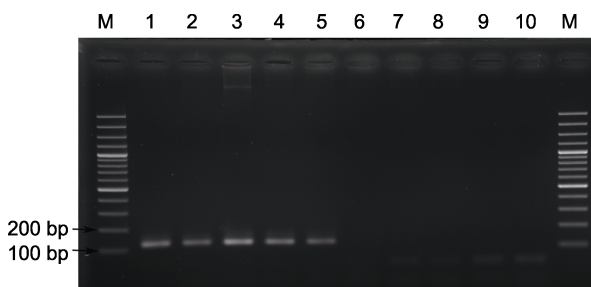


图 3 香鱼雄性特异性标记的 PCR 验证

Fig.3 PCR identification of the male-special marker in *P. altivelis*

M: 标准分子量; 1—5: 雄鱼; 6—10: 雌鱼

3 讨论

3.1 遗传多样性水平

生物群体的遗传多样性是评价生物资源状况的

一个重要依据, 它是物种适应多变的环境、维持长期生存和进化的遗传基础。自 20 世纪 80、90 年代以来, 我国香鱼自然资源锐减, 多处地方的野生香鱼濒临灭绝, 有的甚至已经绝迹(李明月等, 1999)。香鱼已被列入中国濒危动物红皮书, 浙江、福建、河北、辽宁等地将其列为省级重点保护动物, 并进行了人工养殖、增殖放流和野生资源调查与保护等方面的工作。研究香鱼的群体遗传结构和多样性对于保护香鱼资源、避免种质退化、指导增殖放流等都有重要意义。

黄福勇等(2004)对宁波甬溪野生香鱼的同工酶生化遗传分析结果显示该群体的遗传多样性较丰富。而对浙江瑞安、福建宁德和福建东张水库 3 个香鱼野生地理群体的线粒体 Cyt *b* 基因、D-loop 序列和 ND4-tRNA^{Ser} 基因的遗传分析显示这 3 个群体的遗传多样性水平均较低, 特别是东张水库群体的遗传多样性非常贫乏(李娜等, 2008; 鲁延付等, 2009)。香鱼不同群体间的遗传多样性相差较大, 这可能与各个群体间的基因交流较少有关。香鱼为一年生洄游型鱼类, 成鱼秋季在河口处产卵后死亡, 仔鱼移至海中越冬后于次年春季返回淡水生活, 仔稚鱼受游动力限制, 活动范围和迁移距离有限, 限制了不同地理

群体间的基因交流,特别是有些群体还因洄游通道被阻断而成为终生在封闭淡水水体中生活的陆封型香鱼群体(如福建东张水库)。另外,有些濒危群体受有限繁殖群体数量的限制,其遗传多样性水平往往较低,如 Seki 等(1999)的 AFLP 分析结果显示日本奄美大岛川内河中濒临灭绝香鱼群体的多态位点比例仅有 13.5%,而其它 2 个野生香鱼群体的多态位点比例则分别为 55.0%和 52.1%。

本研究所用浙江宁海香鱼养殖群体已经过近 10 年的连续人工繁育,其 AFLP 多态性位点比例(42.74%)虽低于 Seki 等(1999)研究的日本野生香鱼群体,但与大黄鱼(黎中宝等,2009)、半滑舌鲷(韩志强等,2007)、西伯利亚鲟(刘翠等,2011)、牙鲆(张全启等,2004)、鲤鱼(钟立强等,2010)、卵形鲳鲹(彭敏等,2011)等养殖鱼类相比,其遗传多样性仍较丰富,处于中等偏上水平。这一方面是因为其原始亲本群体——野生鳧溪香鱼遗传多样性水平较高,另一方面也可能与每年的香鱼人工育苗中均使用较大数量亲本有关。但现在鳧溪香鱼野生群体已基本绝迹,因此在人工育苗和养殖中一方面要避免外来群体的混杂,另一方面要采用合理的育种方法避免种质退化和遗传多样性下降。

3.2 香鱼性别特异性标记

鱼类遗传性别的鉴定在水产养殖和遗传育种领域有着重要的理论研究和应用价值,但鱼类的性别决定机制特别复杂,绝大多数鱼类并未进化出性染色体或性染色体没有异型分化,并且常染色体基因和温度、pH、光周期等环境因素也会影响鱼类的性别(Sandra *et al*, 2010)。寻找性别特异性的分子标记是目前鉴定鱼类遗传性别的常用和有效方法之一。RAPD、SSR、AFLP、SSH 的技术方法都已被用于筛选鱼类性别特异性标记(Kovacs *et al*, 2001; Chen *et al*, 2010; Fuji *et al*, 2010)。AFLP 具有基因组覆盖率高、扩增位点丰富、条带多态性高及可重复性好等优点,已在三刺鱼(Griffiths *et al*, 2000)、海鲈(Nakamura *et al*, 2001)、北极鲑鱼(Rachael *et al*, 2003)、半滑舌鲷(Chen *et al*, 2007)、鲤鱼(Chen *et al*, 2010)、黄颡鱼(鲁翠云等,2007)、罗非鱼(杨东等,2007)等多种鱼类中找到了性别特异性标记或筛选到了性别差异条带。

香鱼属于胡瓜鱼目、香鱼科,目前尚未有胡瓜鱼目鱼类性别决定类型和机制等方面的研究报道。染色体核型分析显示香鱼没有异型分化的性染色体(张春丹等,2005)。Watanabe 等(2004)在对日本香鱼 AFLP 检测中发现选扩引物组合 E-AT/M-CTG 可扩增到 1

条在雄鱼中出现率为 100%、雌鱼中出现率仅 5%的条带,该条带长度约 141bp,但并不知道该片段的碱基序列,也未见有后续的研究报道。笔者在浙江养殖香鱼中也得到 1 个雄性特异性 AFLP 条带,扩增该条带的选扩引物组合(E-ATG/M-CTG)与 Watanabe 等(2004)的相比仅相差 1 个碱基,条带大小也基本相同,因此笔者和 Watanabe 等(2004)筛选到的香鱼雄性特异性 AFLP 条带应是同一片段。测序显示该雄性特异性条带含 139 个碱基,但 GenBank 中未检索到与该片段同源的序列。根据测得序列设计 1 对引物对 10 尾香鱼的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,5 尾雄鱼中均扩增到了目的片段,而 5 尾雌鱼中均扩增不到目的片段,这也使通过普通 PCR 扩增实现香鱼遗传性别的鉴定成为了可能,并可用于雌核发育、诱导性逆转以及单性全体繁育等研究。但该片段是否与香鱼性别决定基因相连锁、该片段所在染色体是否为香鱼的性染色体等问题尚有待更进一步研究。

参 考 文 献

- 王伟继,岳志芹,孔杰等,2005. AFLP 分子标记技术的发展及其在海洋生物中的应用. 海洋水产研究, 26(1): 80—85
- 刘翠,李文升,鲁翠云,2011. 西伯利亚鲟(*Acipenser baeri*)养殖群体遗传结构的 AFLP 分析. 水产学杂志, 24(1): 8—13
- 李娜,陈少波,谢起浪等,2008. 闽浙地区香鱼线粒体 Cyt b 基因和 D-loop 区序列多态性分析. 遗传, 30(7): 919—925
- 李祥云,丁天喜,竺俊全等,1999. 我国香鱼的研究现状及增养殖前景. 宁波大学学报(理工版), 12(4): 85—90
- 李祥云,苗亮,安钦等,2012. 香鱼(*Plecoglossus altivelis*)排卵后卵内油球、酶活、丙二醛及受精率、孵化率的变化. 海洋与湖沼, 43(2): 313—317
- 李祥云,竺俊全,赵志东等,2000. 香鱼苗种繁育及养成技术. 淡水渔业, 30(7): 3—5
- 杨东,余来宁,张繁荣等,2007. 筛选与尼罗罗非鱼性别相关的 AFLP 标记. 水生生物学报, 31(6): 901—904
- 张滔,刘相全,孙振兴等,2013. 大竹蛭(*Solen grandis*)不同地理群体遗传多样性的 AFLP 分析. 海洋与湖沼, 44(2): 525—530
- 张全启,徐晓斐,齐洁,2004. 牙鲆野生群体与养殖群体的遗传多样性分析. 中国海洋大学学报, 34(5): 816—820
- 张春丹,张晓波,李祥云,2005. 香鱼染色体核型分析. 水利渔业, 25(4): 16—17, 20
- 范慧慧,张呈念,安钦等,2012. 香鱼嗜水气单胞菌人工染病后血液生理生化指标变化. 水产科学, 31(5): 280—282
- 钟立强,张成锋,周凯等,2010. 四个鲤鱼种群遗传多样性的 AFLP 分析. 基因组学与应用生物学, 29(2): 259—265
- 黄福勇,李祥云,2004. 鳧溪香鱼群体同工酶的生化遗传分析. 水产学报, 28(5): 579—584

- 彭 敏, 陈晓汉, 陈秀荔等, 2011. 卵形鲳鲹养殖群体与野生群体遗传多样性的 AFLP 分析. 西南农业学报, 24(5): 1987—1991
- 韩志强, 庄志猛, 高天翔等, 2007. 半滑舌鲷 DNA 的群体遗传变异. 中国水产科学, 14(2): 192—200
- 鲁延付, 乐小亮, 赵 爽, 2009. 福建东张水库陆封型香鱼的遗传变异. 生态科学, 28(6): 548—550
- 鲁翠云, 孙效文, 梁利群等, 2007. AFLP 分析黄颡鱼雌雄个体的遗传差异. 水产学杂志, 20(2): 24—34
- 黎中宝, 方 秀, 陈 锦等, 2009. 大黄鱼(*Pseudoscia crocea*)养殖群体遗传多样性的降低. 海洋与湖沼, 40(4): 446—450
- Chen J J, Du Q Y, Yue Y Y *et al*, 2010. Screening and identification of male-specific DNA fragments in common carps *Cyprinus carpio* using suppression subtractive hybridization. Journal of Fish Biology, 77(2): 403—413
- Chen S L, Li J, Deng S P *et al*, 2007. Isolation of female-specific AFLP markers and molecular identification of genetic sex in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). Marine Biotechnology, 9: 273—280
- Fuji K, Yoshida K, Hattori K *et al*, 2010. Identification of the sex-linked locus in yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. Aquaculture, 308(S1): S51—S55
- Griffiths R, Orr K, Adam A *et al*, 2000. DNA sex identification in the three-spined stickleback. Fish Biology, 57(5): 1331—1334
- Kovacs B, Egedi S, Bartfai R *et al*, 2001. Male-specific DNA markers from African catfish (*Clarias gariepinus*). Geneica, 110: 267—276
- Li C H, Chen J, Shi Y H *et al*, 2011. Use of suppressive subtractive hybridization to identify differentially expressed genes in ayu (*Plecoglossus altivelis*) associated with *Listonella anguillarum* infection. Fish & Shellfish Immunology, 31(3): 500—506
- Nakamura K, Ozakia A, Akuatia T *et al*, 2001. Genetic mapping of the dominant albino locus in trout (*Oncorhynchus mykiss*). Molecular Genetics and Genomics, 265(4): 687—693
- Rachael A, Woram G, Karim G *et al*, 2003. Comparative genome analysis of the primary sex-determining locus in salmohid fishes. Genome Research, 13(2): 272—280
- Sandra G, Norma M, 2010. Sexual determination and differentiation in teleost fish. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 20(1): 101—121
- Seki S J J, Agresti G A E, Gall N *et al*, 1999. AFLP analysis of genetic diversity in three populations of ayu *Plecoglossus altivelis*. Fisheries Science, 65(6): 888—892
- Shimizu A, Uchida K, Udagawa M *et al*, 2008. Multiple spawning of amphidromous type ayu *Plecoglossus altivelis* in a large river, Mogami River System. Fisheries Science, 74: 1283—1289
- Taniguchi N, Hatanaka H, Seki S, 1990. Genetic variation in quantitative characters of meiotic- and mitotic-gynogenetic diploid ayu, *Plecoglossus altivelis*. Aquaculture, 85: 223—233
- Taniguchi N, Seki S, Fukai J *et al*, 1988. Induction of two types of gynogenetic diploids by hydrostatic pressure shock and verification by genetic marker in ayu. Nippon Suisan Gakkaishi, 54(9): 1483—1491
- Watanabe T, Yamasaki K, Seki S *et al*, 2004. Detection of ayu sex-linked DNA markers using homologous clones. Fisheries Science, 70: 47—52
- Zabeau M, Vos P, 1993. Selective restriction fragment amplification, a general method for DNA fingerprinting. European, 05348A1

GENETIC DIVERSITY AND THE ISOLATION OF SEX-SPECIFIC MOLECULAR MARKER BY AFLP IN CULTURED *PLECOGLOSSUS ALTIVELIS* POPULATION

YAN Song-Song, MIAO Liang, LI Ming-Yun, FAN Hui-Hui,
HU Mou, CHEN Jiong, SHI Yu-Hong

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

Abstract We analyzed the genetic diversity of cultured *Plecoglossus altivelis* population to isolate sex-specific marker in amplified fragment length polymorphic (AFLP) technique. Forty sex-matured fish individuals (70—120g) in two batches were randomly sampled from a local fish farm. The first batch included 30 (15 each for male and female) in Sep. 2010 for AFLP analysis; and the second batch included 10 (5 each for male and female) in Sep. 2011 for sex-specific marker isolation. A total of 889 bands were obtained using 15 pairs of AFLP primer, of which 380 loci were polymorphism taking 42.74% of the total. The Nei's gene diversity and Shannon index was 0.1454 and 0.2174, respectively. The results indicate that the cultured *P. altivelis* population was in medium genetic diversity. Among all, only a primer pair E-ATG/M-CTG amplified a band that presented in all males but females. The length of this male-specific AFLP marker was 139bp. Specific PCR primers were then designed and PCR amplification performed on the second batch 10 sex-known individuals of *P. altivelis*. Results show that the objective band could be amplified in all males but females. We believe that that the marker is male-specific and can be used to identify the genetic sex of *P. altivelis*. This study may contribute to the sex-specific molecular marking and to sex determination and control in *P. altivelis*.

Key words *Plecoglossus altivelis*; AFLP; cultured population; gene diversity; sex-specific molecular marker