

НОВЫЕ МЕТОДЫ И МОДЕЛИ
БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ

УДК 597-114.78:639.371.13

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОЛА У РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ
ONCORHYNCHUS MYKISS МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ
ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

© 2015 г. Ю. П. Рудь, М. И. Майстренко, Л. П. Буцацкий

Институт рыбного хозяйства НААН Украины

03164, Украина, Киев, ул. Обуховская, 135

E-mail: irido1@bigmir.net

Поступила в редакцию 16.01.2014 г.

Окончательный вариант получен 09.10.2014 г.

На основе полимеразной цепной реакции разработан экспресс метод диагностики пола у радужной форели *Onchorhynchus mykiss*. Используя данные из банка геномов NCBI были проанализированы нуклеотидные последовательности специфического полового локуса лососевых видов рыб и подбраны олигонуклеотидные праймеры. Размеры продуктов амплификации составляли 800 пар нуклеотидов. Специфичность амплификации была проверена нуклеотидным анализом последовательности ампликонов. Все продукты ПЦР отвечали участку Y хромосомы, в котором находится исследуемый специфический локус. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей амплифицированных фрагментов полового маркера радужной форели и других лососевых видов рыб показал высокую степень идентичности, которая составляла 95–99%. Максимальная идентичность последовательностей в 99% наблюдалась при анализе представителей одного рода, например *Onchorhynchus*. Таким образом, пол может быть определен с помощью обычной ПЦР, что позволит идентифицировать самцов реверсантов во время процесса гормональной реверсии пола у рыб. Данный метод относится к экспресс-диагностике, поскольку анализ данных и возвращение результатов в рыбное хозяйство проводится на протяжении одних суток. Также результаты вскрытия брюшной полости реверсантов радужной форели и изучения их гормонального статуса представлены в данной работе.

Ключевые слова: радужная форель, реверсия пола, полспецифический ДНК-маркер, ПЦР.

DOI: 10.7868/S0475145015020081

ВВЕДЕНИЕ

Интерес к полу некоторых видов рыб, особенно лососевых и осетровых, обусловлен двумя основными причинами. Одна из них — это получение однополых самок с целью наработки больших количеств икры, и вторая — эти рыбы являются удобной моделью изучения дифференциации пола низших позвоночных.

Изучение хромосом костистых рыб показало, что у многих из них половые хромосомы морфологически не различимы. Однако, у самцов некоторых видов лососевых рыб (радужная форель *O. mykiss*, и озерная форель *Salmo trutta*) морфологические различия хромосом все же имеются (Phillips, Rab, 2001). Локус, определяющий пол у лососей имеет небольшие размеры. С ним тесно связаны последовательности, кодирующие гормон роста, некоторые ферменты и микросателлиты (Allendorf et al., 1994). Генетическими исследованиями было установлено, что, в зависимости от вида лососей, степень их сцепления с пол-

определяющим участком SEX не одинакова. Особый интерес в регуляции дифференцировки пола у лососевых рыб играет именно гормон роста. Известно, что гормон роста участвует в регуляции синтеза стероидов в половых железах рыб. Также у лососевых рыб были обнаружены гены, аналогичные некоторым генам млекопитающих, которые имеют большое значение в процессе дифференцировки пола — Sox-9a, Sox9b, AMH, WT1 и другие (Асланян, Солдатова, 2009). В настоящее время разработано большое количество молекулярных маркеров для различных видов лососевых рыб. Для речной форели известны такие маркеры, как Omy1, Omy8, Omy9, для чавычи Oty1, Oty3 и другие (Brunelli et al., 2008). Было установлено, что Oty1 является частью большого фрагмента Oty8, повторяющегося в геноме в виде 300 копий. Положение молекулярных маркеров на половой хромосоме можно определить с помощью метода FISH-гибридизации. Установлено, например, что маркер Oty1 расположен на теломерном участке

Таблица 1. Схема внесения гормонов для реверсии пола у радужной форели *O. mykiss* на хозяйстве “Ишхан”

Декада	Масса рыбы, г	% гормона от корма	Количество корма, кг		Расход гормона, г
			день	декада	
1	0.150	5	0.0075	0.075	0.225
2	0.225	5	0.0112	0.112	0.33
3	0.34	5	0.017	0.17	0.51
4	0.51	5	0.025	0.25	0.75
5	0.715	4	0.03	0.3	0.9
6	1	4	0.4	0.4	1.2
7	1.4	4	0.056	0.56	1.68
8	1.96	4	0.8	0.8	2.4
9	2.75	4	1.1	1.1	3.3
Всего гормона					11.07

малой акроцентрической Y-хромосомы (Devlin, Nagahama, 2002). Изучение генетических факторов, обуславливающих реверсии пола лососевых рыб, имеет большое практическое значение.

В последние годы количество хозяйств, выращивающих однополых самок возрастает. Получение таких самок проводят в два этапа. На первом этапе получают однополых самцов-реверсантив. Затем, при скрещивании их с обычными самками получают однополых самок. Получение однополых самцов-реверсантов (XX) достигается путем обработки молодых особей рыб низкими дозами андрогенов. Именно в этот период развития рыб возможна эффективная реверсия пола. Обычно с этой целью используют такие андрогены как метил-тестостерон, метилдегидростерон (МДНТ), или гидроксиандростенидион. Полученные таким образом самцы состоят из двух типов:

1. Фенотипические самцы с женским генотипом (содержат 2X хромосомы). Эти однополые самцы (реверсанты) при скрещивании с обычными самками дадут в потомстве 100% самок с генотипом XX.

2. Самцы с естественным генотипом (содержат как X, так и Y хромосомы).

Эти два вышеупомянутых типа самцов фенотипически между собой не отличаются. Различия между ними можно обнаружить только при гистологических исследованиях, или путем реципрокных скрещиваний, что занимает большое количество времени. Поэтому в последние годы для ускоренного выявления самцов-реверсантов (с XX генотипом) во многих странах были разработаны молекулярно-биологические методы, основанные на ДНК-технологии. Применение этих методов стало возможным после обнаружения канадскими исследователями в чавыче *O. tshawytscha* и озёрной форели на Y-хромосоме последователь-

ностей ДНК, повторяющиеся (около 200 раз), размерами 8, 16, 24 и 32 т.п.н. (Devlin R.H., Nagahama Y., 2002). Была разработана ПЦР-диагностика самцов вышеуказанных рыб, широко используемая в современном рыбоводстве. Для диагностики выделяют из плавников или крови ДНК, при этом рыба остается живой. Целью нашей работы была разработка метода ПЦР для выявления Y-хромосомы среди реверсантов радужной форели.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Получение реверсантов. Опыты по реверсии пола проводили на базе форелевого хозяйства “Ишхан” в Черновицкой области Украины. Для получения реверсантов в корм добавляли гормон метилтестостерон 17-альфа в дозе 3 мг/кг корма и скармливали в течение 50 дней, а затем заменили этот гормон на тестостерон пропионат, который скармливали в течение 40 дней. Скармливание корма с добавлением двух форм гормонов начали в период, когда личинки радужной форели перешли на внешнее питание. Срок скармливания корма с гормонами составлял 90 суток. Корм скармливали по мере его поедания рыбой, но из расчета не более 5% от массы рыбы в течение 1–4 декады, и 4% в остальные дни (табл. 1). Видовой состав стероидных гормонов и их концентрацию подбирали согласно проанализированным литературным данным (Metalnikova, 2008, Павлов и др., 2010).

Идентификация пола у радужной форели O. mykiss методом полимеразной цепной реакции. Выделение ДНК. К гомогенату из плавников радужной форели добавляли лизирующий буфер (10 mM Tris-HCl pH = 8.0, 0.1 M NaCl, 25 mM ЭДТА, 0.5% ДСН) и протеиназу К, тщательно перемешивали и инкубировали один час при температуре 37°C. ДНК экстрагировали фенолом и центрифугировали 5 мин при 13000 об/мин на микроцентрифуге

“Eppendorf” (Германия). Надосадочную жидкость отбирали и проводили повторную экстракцию ДНК смесью хлороформ–изоамиловый спирт (24 : 1). Суспензию центрифугировали на микроцентрифуге в течение пяти минут при 13000 об/мин. К супернатанту добавляли 0.1 объем 3 М натрий ацетата (рН 5.2) и 2.5 объема охлажденного до -20°C этанола. Преципитацию ДНК проводили при -20°C в течение 10 ч. После этого осаждали ДНК на микроцентрифуге при 13000 об/мин в течение 10-ти минут. Осадок ДНК промывали 70% этанолом. ДНК растворяли в ТЕ-буфере (10 мМ Tris-HCl, 1 мМ ЭДТА, рН = 7.5) или в деионизированной воде (ThermoScientific) (Sambrook, 2001). Концентрацию очищенной ДНК радужной форели измеряли на спектрофотометре “APEL PD-303 UV” с использованием кварцевых кювет.

Подбор олигонуклеотидных праймеров. Подбор олигонуклеотидных праймеров, определение их специфичности и физических свойств, а также анализ последовательностей ДНК фрагментов Y хромосом некоторых видов лососевых, взятых из базы данных Национального Центра Биотехнологической Информации (NCBI), проводили с помощью программного обеспечения Vector NTI 10 и онлайн-сервиса BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Последовательность олигонуклеотидных праймеров была такой: OmYF1 5' – CAAGTCGGGCAGCG-GCAAGTC – 3' и OmYR2 – GGGAGCCTTG-TAGTAAAAGACGC – 3'.

Полимеразная цепная реакция. В состав реакционной смеси входило: 12.5 мкл смеси ПЦР Master Mix Green (ThermoScientific), по 10 пМ каждого олигонуклеотида (Metabion), 1 мкл ДНК радужной форели и стерильная деионизированная вода до общего объема 25 мкл. Амплификацию проводили на термоциклере PqStar 96 Gradient (PEQLAB, Германия). Амплификация ДНК включала 1 цикл предварительной денатурации при 95°C (2 мин) и 35 циклов денатурации при 95°C (1 мин), отжига праймеров при 60°C (1 мин), синтеза при 72°C (1 мин) и дополнительный последний цикл синтеза при 72°C (2 мин). После ПЦР продукты анализировали в 2% агарозном геле в ТАЕ-буфере (40 мМ Tris-HCl, 20 мМ уксусная кислота, 1 мМ ЭДТА). Маркером служил 100 п.н. ДНК-маркер (ThermoScientific). Результаты электрофореза наблюдали под ультрафиолетовым трансиллюминатором.

Определение нуклеотидной последовательности. Выделение ДНК из геля осуществляли с помощью набора Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (ThermoScientific) соответственно протоколу производителя.

Нуклеотидные последовательности ДНК радужной форели исследовали на автоматическом ДНК-секвенаторе “Genetic Analyser 3130” (“Applied Biosystems”, США) с использованием набора для секвенирования (“BigDye® Terminator v. 3.1 Cy-

cle Sequencing Kit”). Последовательность анализировали с помощью программного обеспечения “Sequencing Analysis” (“Applied Biosystems”). Выравнивание нуклеотидных последовательностей ДНК проводили с помощью алгоритмов ClustalW (VectorNTI11, Invitrogen) и BLASTN.

Биохимия и гистология. Анализ активности гормонов в сыворотке крови форели и гистологические срезы фиксированных образцов гонад проводили по общепринятым методикам.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате компьютерного анализа последовательностей ДНК фрагментов Y-хромосом представителей родов *Oncorhynchus*, *Salmo*, *Salvelinus* и др. были обнаружены участки с гомологией более чем 90%. Размеры гомологичных фрагментов составляли от 2000 до 5000 пар нуклеотидов (п.н.). Некоторые фрагменты Y-хромосомы радужной форели соответствовали половым маркерам, найденным у чавычи (Stein et al., 2001). Именно эти участки Y хромосомы радужной форели были выбраны нами для подбора олигонуклеотидных праймеров. На основе последовательностей половых ДНК-маркеров Y хромосомы некоторых видов лососевых было сконструировано филогенетическое дерево (рис. 1).

Как показали результаты наших исследований, специфические олигонуклеотидные праймеры к фрагменту Y-хромосомы радужной форели успешно амплифицировали ожидаемый по размеру фрагмент ДНК. Длина ПЦР продукта составляла около 800 пар нуклеотидов (рис. 2). Это свидетельствует о том, что использование метода ПЦР в диагностике пола сможет идентифицировать генотипических самцов радужной форели и изъять их из опыта. При этом фенотипические самцы останутся в опыте для последующего оплодотворения нативных самок с целью получения 100% поколения самок (F1).

Следующим этапом нашей работы был отбор самцов-реверсантов из подопытной популяции радужной форели в хозяйстве “Ишхан”. В состав подопытной рыбы входили как генотипические самцы, так и самцы-реверсанты, в которых сохранился генотип самок. Необходимо было с помощью разработанного метода ПЦР отобрать и отбраковать генотипических самцов для того, чтобы в опыте остались только самцы реверсанты (рис. 3).

Специфичность амплифицированного продукта была проверена с помощью нуклеотидного анализа. Как показали результаты сиквенса, амплифицированный фрагмент соответствовал участку Y-хромосомы радужной форели *O. mykiss* (рис. 4).

Действенность разработанного метода ПЦР в диагностике пола радужной форели была проверена методами вскрытия брюшной полости и гисто-

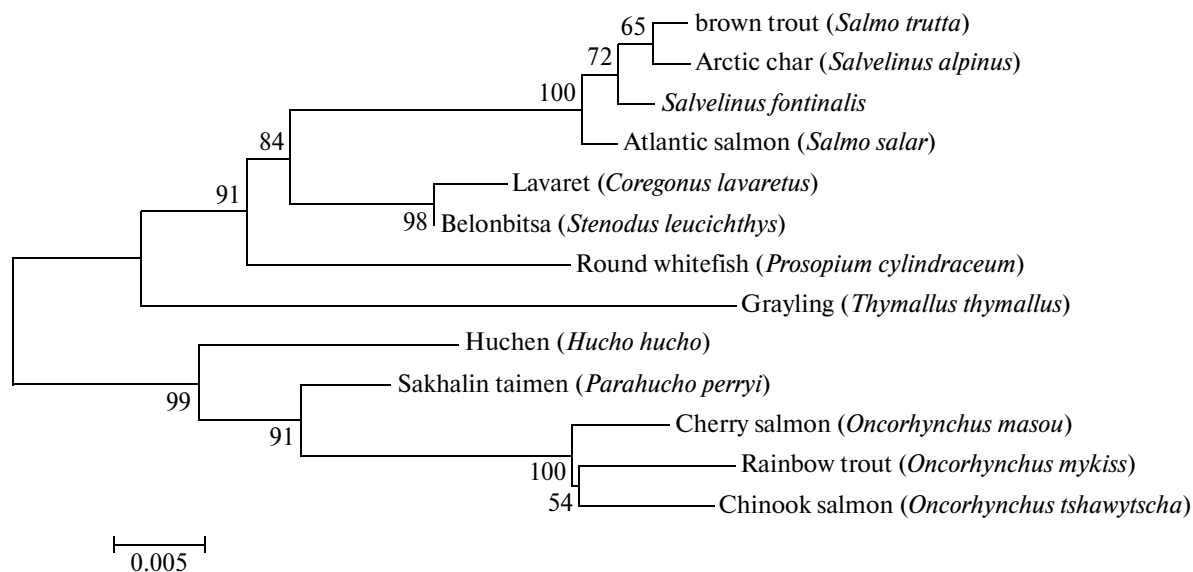


Рис. 1. Филогенетический анализ полового ДНК-маркера Y хромосомы некоторых видов лососевых. Дерево составилось с помощью алгоритма Neighbor-joining в программе MEGA версии 5.2.

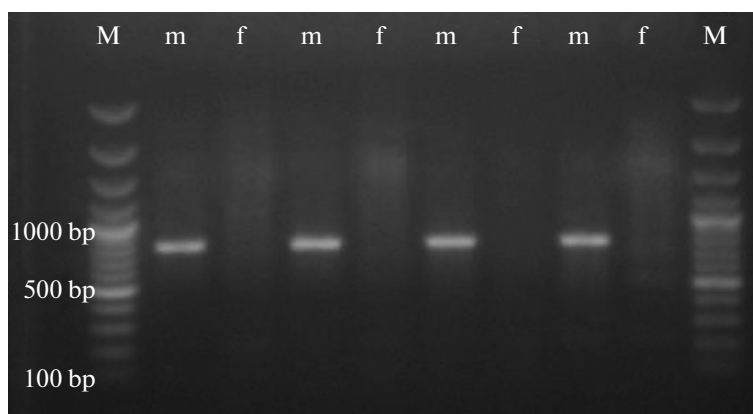


Рис. 2. Идентификация самцов и самок радужной форели *O. mykiss* методом ПЦР: m – самец; f – самка; M – ДНК маркер 100 bp plus.

логических срезов гонад. После идентификации пола в произвольной выборке особей подопытной радужной форели и отбор генотипических самок или самцов-реверсантов было проведено вскрытие. Как показали результаты наших исследований у самок радужной форели под действием стероидных гормонов развивались семенники содержащие живые и активные сперматозоиды. Наряду с семенниками у реверсантов присутствовали и яичники.

Результаты гистологических срезов фиксированных образцов семенников самцов-реверсантов радужной форели показали, что структура гонад отвечала контрольным препаратам и содержала половые клетки на разных этапах развития, что свидетельствует о нормальной работе поло-

вых придатков испытуемых реверсантов радужной форели.

При изучении гормонального статуса реверсантов форели установлено, что количество фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), тестостерона (ТС) и эстрадиола было от 1.5 до 2.5 раза выше чем в контрольной группе (табл. 2). А вот уровень прогестерона был выше у контроля и составлял 1.2 нмоль/л. В остальных группах гормонов существенной разницы не наблюдали (табл. 2). Разница в количестве вышеупомянутых гормонов может быть следствием воздействия эндогенного гормона, который использовался для реверсии пола. Но поскольку самцы реверсанты запрещены для употребления в пищу, ввиду воздействия на них гормонами, они являются только проме-

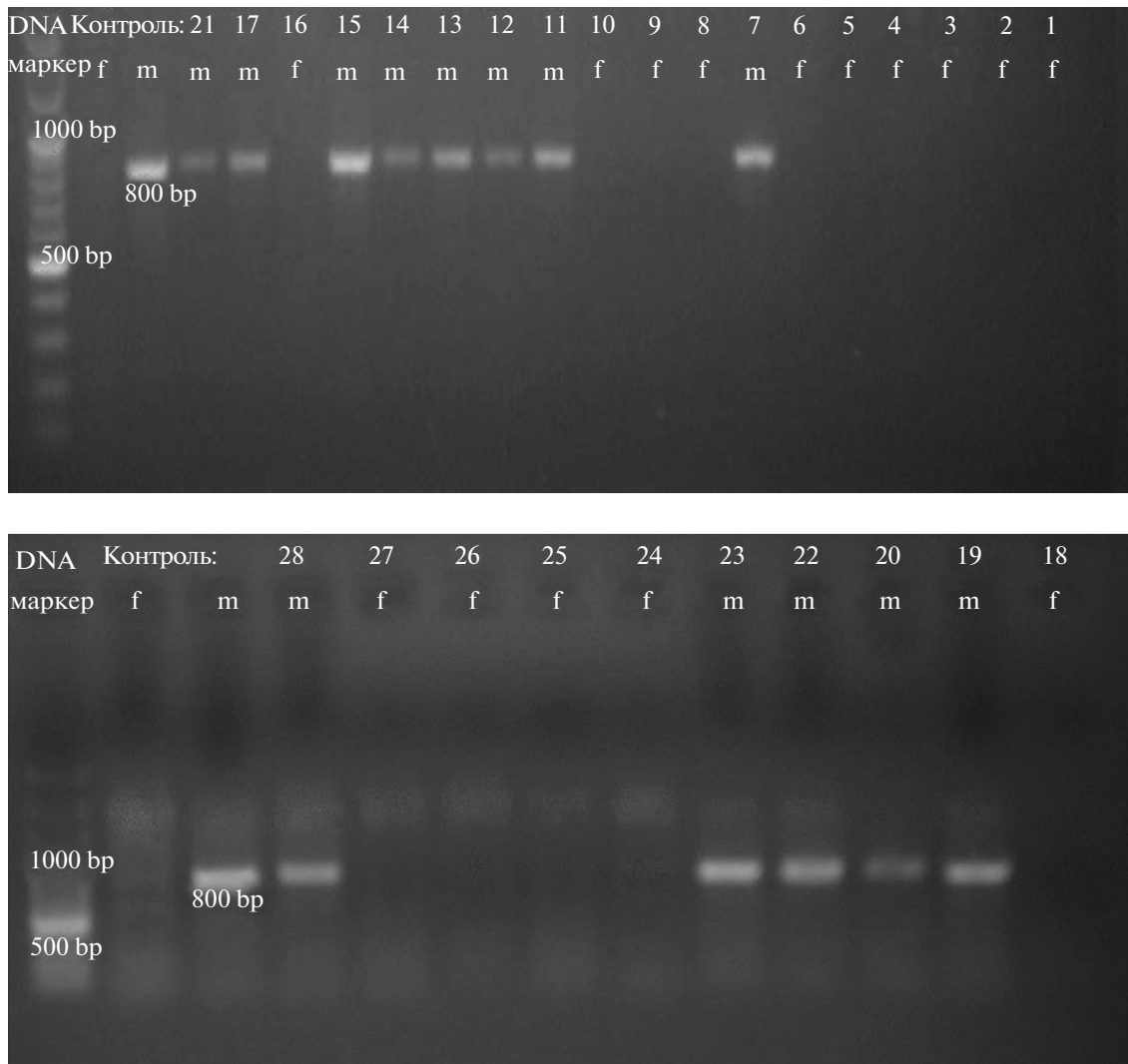


Рис. 3. Идентификация реверсантов радужной форели *O. mykiss*: m – самец; f – самка (в опыте самцы реверсанта); 7, 11–15, 17, 19–23, 28 – генотипические самцы; 1–6, 8–10, 16, 18, 24–27 – фенотипические самцы (реверсанта).

жуточным продуктом в процессе получения 100% поколения самок радужной форели.

ОБСУЖДЕНИЕ

Для изменения пола рыб обычно используют метилтестостерон 17-альфа (Гомельский, 1987),

или тестостерон пропионат (Ванякина, 1969). Нами было изучено комбинированное действие этих двух форм тестостерона на изменения пола радужной форели.

Анализ последовательностей половых хромосом некоторых лососевых видов рыб показал, что

Таблица 2. Содержание половых гормонов в сыворотке крови форели *O. mykiss* (N = 10)

Образцы сывороток	Гормоны							
	ФСГ мМЕ/л	ЛГ МЕ/л	ПРЛ мМЕ/л	ПС нмоль/л	Эстрадиол пг/мл	ТС нмоль/л	SHBG нмоль/л	DHEAS мкг/мл
Опыт	0.5	2.3	117.6	0.9	140.1	4.6	0.2	0
Контроль	0.2	2.1	114.6	1.2	65.7	3.1	0.2	0

Условные обозначения: ФСГ – фолликулостимулирующий гормон, ТС – тестостерон, ПС – прогестерон, SHBG – глобулин связывающий половой гормон, ПРЛ – пролактин, DHEAS – дегидроэпиандростерон-сульфат, ЛГ – лютеинизирующий гормон.

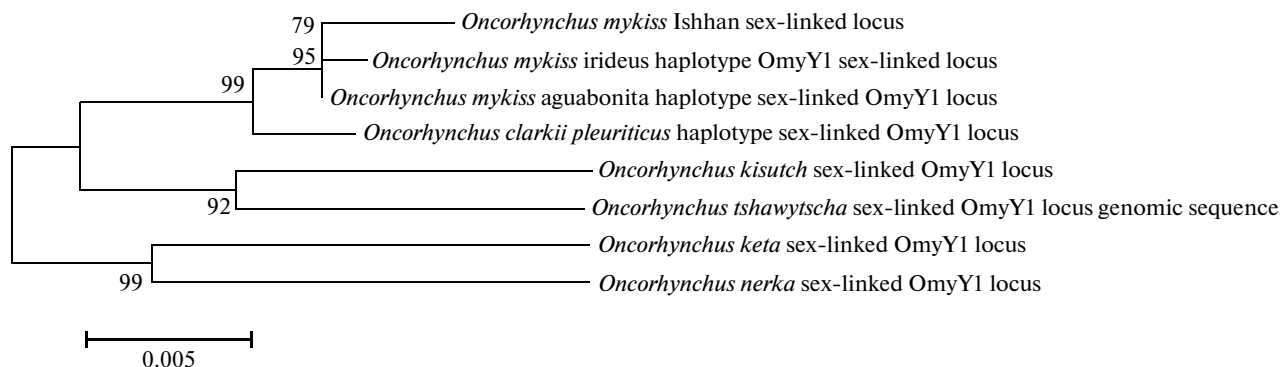


Рис. 4. Анализ последовательности нуклеотидов в амплифицированном фрагменте полового ДНК-маркера Y-хромосомы радужной форели *O. mykiss*. Дерево составлялось с помощью алгоритма Neighbor-joining в программе MEGA версии 5.2.

высокая степень гомологии половых маркеров характерна только для рыб, принадлежащих к одному роду. Так, например, у представителей родов *Salmo*, *Oncorhynchus* и *Salvelinus* отсутствует гомология половых маркеров (Phillip et al., 2001). Поэтому для определения Y-хромосомы у радужной форели нами проведен тщательный компьютерный анализ последовательностей ДНК фрагментов Y-хромосом двух близкородственных представителей рода *Oncorhynchus* чавычи *O. tshawytscha* и радужной форели *O. mykiss*. В результате проведенного поиска подобраны праймеры, способные выявлять фрагмент Y-хромосомы у радужной форели и таким образом проводить диагностику особей на самок и самцов.

Часто X и Y хромосомы у некоторых видов рыб, таких как медака (*Oryzias latipes*), имеют аналогичную морфологию и несут одинаковую генетическую информацию, то есть набор генов и их последовательность расположены в одинаковом порядке как в X-, так и в Y-хромосоме (Matsuda et al., 2002). С помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* было показано, что ДНК-маркер 5S рРНК радужной форели гибридизует у самок в XX хромосоме по двум локусам, а у самцов по двум локусам в XY хромосоме (Ittura et al., 2001). Это свидетельствует о сходстве X и Y хромосом, и в отличие от птиц и млекопитающих, ранняя стадия дифференциации Y хромосомы у рыб делает их интересными объектами исследования эволюции половых хромосом.

У 10% видов рыб, в том числе и лососевых, идентифицированы половые маркеры (Devlin et al., 2002). С помощью обычной ПЦР можно идентифицировать эти специфические последовательности ДНК, и тем самым быстро определить пол особи. Геном радужной форели составляет примерно 2.4×10^6 т.п.н., а участки ДНК, которые можно использовать для поиска половых маркеров составляют 6.1×10^3 т.п.н. (Felip A. et al., 2005). Таким образом, в результате точного под-

бора олигонуклеотидных праймеров был разработан метод ПЦР для экспресс идентификации самцов радужной форели *O. mykiss*. Аккредитованный в странах Европейского Союза метод не прямой феминизации перед получением 100% поколения самок, предусматривает отбор так называемых “неосамцов” (самцы реверсанта), имеющих генотип самок (XX). На этапе отбора неосамцов метод ПЦР позволяет идентифицировать генотипических самцов (XY) в первом поколении, которые не должны принимать участие в следующем скрещивании с целью получения 100%-го поколения самок.

Необходимо подчеркнуть также, что полученных реверсантов, а также гиногенетических особей лососевых рыб в последнее время широко используют для получения триплоидных (стерильных) особей. В некоторых странах Европы (Англия, Франция и др.) приняты законы, запрещающие выпуск диплоидной форели и других лососей в реки, с целью предотвращения возможной гибридизации с дикой форелью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Асланян М.М., Солдатова О.П. Генетика пола. Ростов-на-Дону, 2009. 90 с.
- Гомельский Б.И. Методические указания по гормональной и генетической регуляции пола у карпа. Москва, 1987. С. 3–4.
- Ванякина Е.Д. Генетика определения пола и некоторые вопросы гормональной регуляции пола у костистых рыб. Москва, 1969. С. 29–44.
- Метальникова К.В. Предварительные результаты исследования форели из 2-го поколения от самца, обработанного метилтестостероном // Экологическая физиология и биохимия рыб в аспекте продуктивности водоемов. 2002. Т. 141. С. 129–137.
- Метальникова К.В. Регуляция пола у радужной форели // Рыбное хозяйство. 1991. № 2. С. 35–37.
- Павлов Е.Д., Ту Н.В., Ту Н.Т. Состояние половых желез молоди триплоидной форели *Oncorhynchus*

- mykiss* в условиях Южного Вьетнама при искусственной инверсии пола // Вопросы ихтиологии. 2010. № 5. С. 675–684.
- Родина Н.А. Использование методов гормонального переопределения пола для регуляции полового состава популяции рыб // Интернет ресурс <http://internevod.com/rus/academy/sci/04/nr3/shtmi>
- Allendorf F.W., Gellman W.A., Thorgaard G.H. Sex-linkage of two enzyme loci in *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout) // *Heredity*. 1994. V. 72 (Pt 5). P. 498–507.
- Brunelli J.P., Wertzler K.J., Sundin K., et al. Y-specific sequences and polymorphisms in rainbow trout and Chinook salmon // *Genome*. 2008. V. 51 (9). P. 739–48.
- Devlin R.H., Nagahama Y. Sex determination and sex differentiation in fish: An overview of genetic, physiological, and environmental influences // *Aquaculture*. 2002. V. 208. P. 191–364.
- Felip A., Young W.P., Wheeler P.A. et al. An AFLP-based approach for the identification of sex-linked markers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // *Aquaculture*. 2005. V. 247. P. 35–43.
- Iturra P., Lam N., Fuente M. et al. Characterization of sex chromosomes in rainbow trout and coho salmon using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) // *Genetica*. 2001. V. 111. P. 125–131.
- Matsuda M., Nagahama Y., Shinomlya A. et al. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish // *Nature*. 2002. V. 417. P. 559–563.
- Metalnikova K.V. Methods for obtaining sex reversants in *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and *Huso huso* × *Acipenser ruthenus* (Hybrid F2) and histogenesis in salmon reversants in response to androgenes // *Actual Status and Active Protection of Sturgeon Fish Populations Endangered by Extinction* / Ed. Kolman R., Kapust A. Olsztyn. 2008. pp. 113–126.
- Phillips R., Rab P. Chromosome evolution in the Salmonidae (Pisces): an update // *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2001. V. 76 (1). P. 1–25.
- Sambrook J., Russell D.W. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* / 3rd. ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.
- Stein J., Phillips R.B., Devlin R.H. Identification of the Y chromosome in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) // *Cytogenet. Cell Genet.* 2001. V. 92. P. 108–110.

Sex Identification of the Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* by Polymerase Chain Reaction

Yu. P. Rud', M. I. Maistrenko, and L. P. Buchatskii

Institute of Fish Industry, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, ul. Obukhovskaya 135, Kyiv, 03164 Ukraine
e-mail: irido1@bigmir.net

Received January 16, 2014; in final version, October 9, 2014

Abstract—A polymerase chain reaction-based test for rapid sex identification of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* has been elaborated. Using the data deposited with the NCBI genome bank, nucleotide sequences of the specific sex-linked locus of salmonid species have been analyzed and the oligonucleotide primers have been selected. The length of the amplification products is 800 nucleotide pairs. Amplification specificity has been tested by nucleotide analysis of the amplicon sequences. All PCR products match the Y chromosome region housing the corresponding specific locus. A comparative analysis of the nucleotide sequences of the fragments carrying the rainbow trout (and other salmonid species) sex-linked marker demonstrates a high degree of identity, amounting to 95–99%. The maximal identity between the sequences (99%) is observed when analyzing representatives of the same genus, for example, *Oncorhynchus*. Thus, the sex is detectable by a simple PCR test, thereby allowing the male revertants emerging via hormonal sex reversion to be identified. This test is a rapid diagnostic method, since it requires only 1 day for testing and informing the fish farm on its results. Results of abdomen opening of rainbow trout revertants and examination of their hormonal status are also described.

Keywords: rainbow trout, sex reversion, sex-specific DNA marker, PCR