

СЕЛЕКЦІЯ, ГЕНЕТИКА ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

УДК [597-146.3:597-146.5]:597.553.2

ІДЕНТИФІКАЦІЯ СТАТІ У ДУНАЙСЬКОГО ЛОСОСЯ (*HUSCH HUSCH*) МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

Ю.П. Рудь, rud_yuriy@ifr.com.ua, Інститут рибного господарства НААН, м. Київ
В.Ю. Філіпов, liveroff@gmail.com, Інститут рибного господарства НААН, м. Київ
Л.П. Драган, dragan_l@ukr.net, Інститут рибного господарства НААН, м. Київ
Л.П. Бучацький, iridol@bigmir.net, Інститут рибного господарства НААН, м. Київ

Мета. Проаналізувати нуклеотидні послідовності хромосоми Y лососевих видів риб і обрати фрагмент для підбору специфічних олігонуклеотидних праймерів та на основі ПЛР розробити метод ідентифікації статі у дунайського лосося *H. huscho*.

Методика. За допомогою алгоритмів ClustalW в програмному забезпеченні MEGA версії 5.2 було проаналізовано нуклеотидні послідовності хромосоми Y лососевих видів риб. Для розроблення експрес-діагностики статі у дунайського лосося було взято метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Послідовність нуклеотидів у продуктах ампліфікації була досліджена секвенуванням.

Результати. На основі ПЛР розроблено метод ідентифікації статі у дунайського лосося *H. huscho*. Показано, що специфічні олігонуклеотидні праймери продукують амплікони розміром близько 450 пар нуклотидів, які характерні тільки для самців дунайського лосося. Підібрані праймери можуть бути використані для діагностики самців райдужної форелі *Oncorhynchus mykiss*, що свідчить про високу консервативність локусу *sdY*, який присутній в Y хромосомі більшості лососевих риб.

Наукова новизна. Визначено високо консервативний локус *sdY* для підбору специфічних олігонуклеотидних праймерів, які фланкують статевий ДНК-маркер у самців.

Практична значимість. Експрес-діагностика статі у дунайського лосося за допомогою розробленого методу дозволить ідентифікувати самців-реверсантів у процесі гормональної реверсії статі. На етапі відбору реверсантів цей метод дозволить ідентифікувати генотипових самців (XY) у дослідній групі, які не повинні використовуватись у наступному спаровуванні з метою отримання 100 %-го покоління самок дунайського лосося.

Ключові слова: дунайський лосось, статеві-специфічний локус, ПЛР, реверсія статі.

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ ТА АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ І ПУБЛІКАЦІЙ

У багатьох видів риб особини різної статі демонструють неоднакові темпи приросту і досягають різних розмірів, а також характеризуються неоднаковою стійкістю до несприятливих чинників навколишнього середовища [1]. Тому у господарників існує інтерес продукувати покоління тільки самок (іноді самців). Експерименти з генетичним контролем виробництва такого потомства у деяких видів риб надали важливу інформацію про ендогенні статеві гормони, які відіграють певну роль у статевій диференціації [2].

У нижчих хребетних тварин статева диференціація може легко індукуватися під впливом зовнішніх чинників, в результаті чого фенотипова стать інколи відрізняється від генотипово визначеної [3]. Тому пошук статевих ДНК-маркерів



для швидкої ідентифікації статі у риб є необхідним етапом в процесі гормональної реверсії статі.

Акредитований в країнах Європейського Союзу метод непрямой фемінізації для отримання 100%-го покоління самок, передбачає відбір так званих “неосамців”. Неосамці — це фенотипові самці, що мають генотип самок (XX), в яких під дією андрогенів розвинулись сім'яники. У таких фенотипових самців будуть формуватися зрілі сперматозоїди, здатні запліднювати ікру. Однак, при цьому генотип особин зберігається, а тому всі статеві клітини інвертованих самців будуть мати лише статеві хромосоми X. При заплідненні звичайних, не оброблених гормоном самок, інвертованими самцями, в першому поколінні будуть отримані одностатеві популяції самок.

Ключовим етапом при відборі неосамців з покоління F1 є ідентифікація генотипових самців (XY), які не повинні брати участь в наступному схрещуванні з метою отримання 100 %-го покоління самок [4].

ВИДІЛЕННЯ НЕВИРШЕНИХ РАНІШЕ ЧАСТИН ЗАГАЛЬНОЇ ПРОБЛЕМИ. МЕТА РОБОТИ.

Лосось дунайський (*H. hucho*) — одна з найцінніших риб річок басейну Дунаю, що витікають з Карпат, представник лососевих риб, відомий також під назвою головатиця. Це одна з найбільших риб гірських річок, довжина якої досягає понад 180 см, а маса тіла може становити до 60 кг.

Причиною зменшення чисельності лосося дунайського є зарегулювання й забруднення річок. Тому штучне розведення дунайського лосося з використанням новітніх біотехнологій сприятиме збільшенню його чисельності. Одним з біотехнологічних напрямів в аквакультури є пошук статевих ДНК-маркерів, які необхідні для експрес-діагностики статі у риб в процесі гормональної реверсії статі.

Мета роботи – проаналізувати нуклеотидні послідовності хромосоми Y лососевих видів риб і обрати фрагмент для підбору специфічних олігонуклеотидних праймерів та на основі ПЛР розробити метод ідентифікації статі у дунайського лосося *H. hucho*.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Виділення ДНК. До гомогенату з плавців дунайського лосося додавали буфер (10 мМ TRIS-HCl pH = 8,0, 0,1М NaCl, 25 мМ ЕДТА, 0,5 % ДСН) та протеїназу К, перемішували та інкубували 1 годину за температури + 37 °С. ДНК екстрагували фенолом та центрифугували 5 хвилин за 13 000 об./хв. на мікроцентрифузі “Ependorf” (Німеччина). Надосадову рідину відбирали та проводили повторну екстракцію ДНК сумішшю хлороформ — ізоаміловий спирт (24:1). Суспензію центрифугували на мікроцентрифузі упродовж п'яти хвилин за 13 000 об./хв. До супернатанту додавали 0,1 об'єму 3М натрійацетату (pH 5,2) та 2,5 об'єми охолодженого до - 20 °С етанолу. Преципітацію ДНК проводили за кімнатної температури упродовж 1 год. Після цього осаджували ДНК на мікроцентрифузі за 13 000 об./хв. упродовж 10-ти хвилин. Осад ДНК промивали 70 %-им етанолом. ДНК розчиняли в ТЕ-буфері у деіонізованій воді [5]. Концентрацію та якість очищеної ДНК вимірювали на спектрофотометрі “APEL PD-303 UV” з



використанням кварцевих кювет.

Підбір олігонуклеотидних праймерів. Аналіз послідовностей ДНК-фрагментів хромосоми Y деяких видів лососевих риб, узятих з бази даних Національного Центру Біотехнологічної Інформації (NCBI), проводили за допомогою онлайн-сервісу BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Для розроблення олігонуклеотидних праймерів, визначення їхньої специфічності і фізичних властивостей використовували програмне забезпечення Vector NTI 10.

ПЛР. Ампліфікацію проводили на термоциклері “96 Universal Gradient PEQ STAR” (PEQLAB, Німеччина). До складу реакційної суміші входили наступні компоненти: 12,5 мкл DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific), олігонуклеотидні праймери (Metabion, Німеччина) по 1 мкл кожного (20 пмоль/мкл), 2 мкл кДНК та стерильна деіонізована вода до загального об’єму 25 мкл.

Ампліфікація складалась з циклу попередньої денатурації за 94 °C (3 хвилини) та 35 циклів денатурації за 94 °C (30 секунд), відпалу праймерів за градієнту температур 53 – 64 °C (30 секунд), синтезу за 72 °C (1 хвилина) та додаткового останнього циклу синтезу за 72 °C (7 хвилин). Після ПЛР продукти аналізували у 2%-му агарозному гелі в ТАЕ-буфері (40 мМ TRIS-HCl, 20 мМ оцтова кислота, 1 мМ EDTA). Результати електрофорезу спостерігали під ультрафіолетовим транс-ілюмінатором.

Визначення нуклеотидної послідовності. Виділення ДНК з гелю здійснювали за допомогою набору Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas) відповідно до протоколу виробника.

Нуклеотидні послідовності ДНК дунайського лосося досліджували на автоматичному ДНК-секвенаторі “Genetic Analyser 3130” (“Applied Biosystems”, США) з використанням набору для секвенування (“BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit”). Для кожної матриці додавали 8 мкл BigDye® Terminator v3.1, що містила “DyeDeoxy™ dNTPs” та “AmpliTaq” ДНК-полімеразу, 20 нг дволанцюгової ДНК-матриці та 4 пмолі праймеру. Кінцевий об’єм реакційної суміші доводили до 20 мкл. Продукти реакції очищували за допомогою спеціалізованого набору реагентів “BigDye X Terminator® Purification Kit” (“Applied Biosystems”). Зразки розводили 20 мкл формаміду, перемішували та денатурували за 95 °C упродовж 2 хвилин. Електрофорез здійснювали на автоматичному секвенаторі згідно з протоколом виробника. Послідовність аналізували за допомогою програмного забезпечення “Sequencing Analysis” (“Applied Biosystems”).

Вирівнювання нуклеотидних послідовностей ДНК дунайського лосося проводили за допомогою алгоритмів ClustalW в програмному забезпеченні MEGA версії 5.2 та BLASTN. Послідовності інших лососевих риб були отримані з бази даних NCBI.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результат аналізу послідовностей фрагментів ДНК лососевих видів риб показав, що високий ступінь гомології хромосоми Y характерний тільки для риб, що належать до одного роду. Так, наприклад, у представників родів *Salmo*, *Oncorhynchus* і *Salvelinus* відсутня повна гомологія в



послідовностях хромосоми Y, але є короткі висококонсервативні ділянки, які характерні для багатьох видів риб з родини лососевих [6]. При аналізі послідовностей ДНК представників роду *Oncorhynchus* – чавичі *O. tshawytscha*, кижуча *O. kisutch* та райдужної форелі *O. mykiss*, було виявлено такі локуси з гомологією понад 90 %. Розміри гомологічних фрагментів склали від 2000 до 4000 пар нуклеотидів (п.н.) [7]. Ці фрагменти були характерні тільки для самців і відсутні в послідовностях ДНК самок відповідних видів.

Окрім представників роду *Oncorhynchus* подібні послідовності були виявлені у атлантичного лосося *Salmo salar*, струмкової форелі *Salmo trutta*, голяця *Salvelinus fontinalis* та інших представників родини лососевих риб [8]. Ці локуси були названі статеводиморфічними (статевоспецифічними) – від англ. sexually dimorphic on Y chromosome (sdY).

Аналіз усіх доступних послідовностей ДНК локусів sdY у Банку Геномів NCBI за допомогою алгоритму Neighbor-joining у програмі MEGA версії 5.2 показав, що цей високо консервативний локус присутній практично у всіх лососевих риб, за виключенням сигових (рід *Coregonus*) (рис. 1).

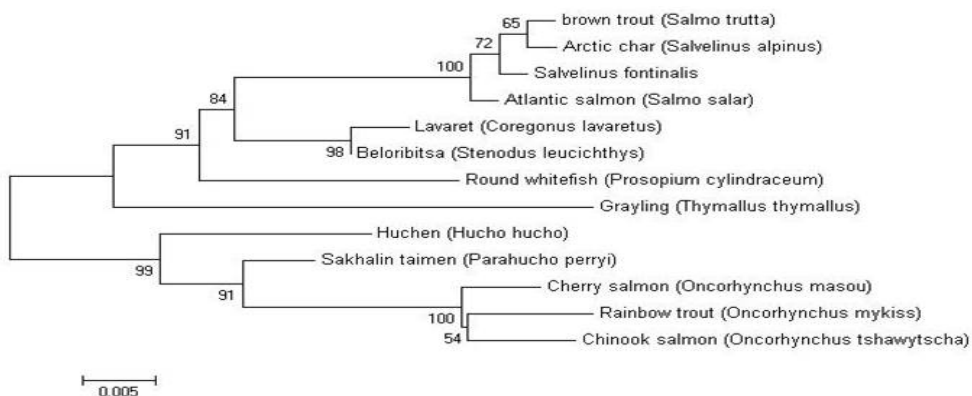


Рис. 1. Філогенетичний аналіз локусу sdY представників родини лососевих риб. Дерево будувалось за допомогою алгоритма Neighbor-joining у програмі MEGA версії 5.2

Як показали результати проведених досліджень, специфічні олігонуклеотидні праймери до локусу sdY успішно ампліфікували очікуваний за розміром фрагмент ДНК дунайського лосося. Довжина продукту ПЛР становила близько 450 пар нуклеотидів (рис. 2).

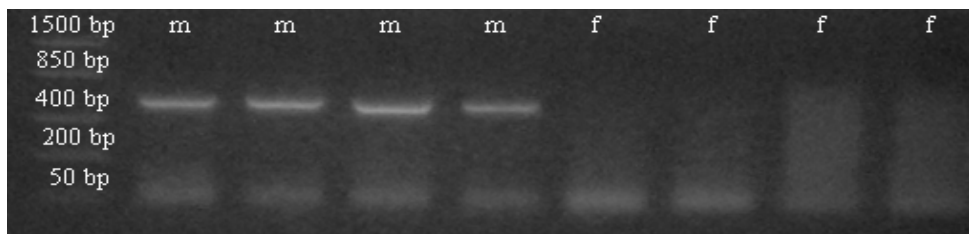


Рис. 2. Ампліфікація фрагмента локусу sdY у дунайського лосося *H. hucho*: m — самець, F — самка



Специфічність ампліфікації була перевірена за допомогою нуклеотидного аналізу продукту ПЛР. Результати сиквенса показали, що ампліфікований фрагмент відповідав ділянці висококонсервативного локусу *sdY*.

Підібрані олігонуклеотидні праймери були апробовані в реакції з ДНК самців та самок райдужної форелі. Результати експерименту показали, що продукти ПЛР були присутні в зразках ДНК самців райдужної форелі, а це свідчить про високу консервативність статеві-специфічного локусу *sdY* та його присутність у різних представників родини лососевих риб. Розмір ампліфікованих фрагментів локусу *sdY* у райдужної форелі становив 450 п.н. (рис. 3).

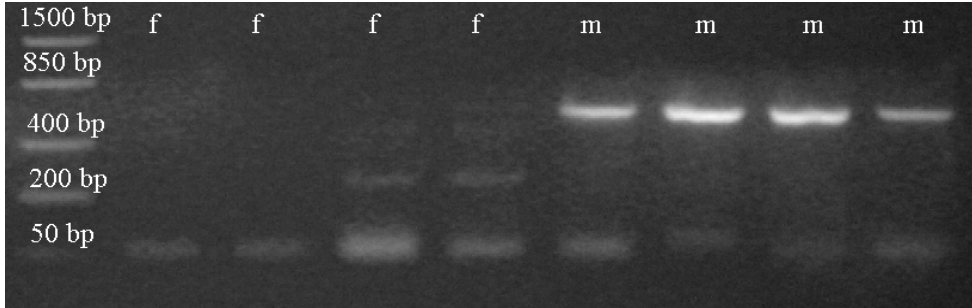


Рис. 3. Ампліфікація фрагмента локусу *sdY* у райдужної форелі *O. mykiss*: m — самець, F — самка.

Таким чином, в результаті точного підбору олігонуклеотидних праймерів був розроблений метод на основі полімеразної ланцюгової реакції для експрес-ідентифікації самців дунайського лосося *H. hucho*. На етапі відбору самців-реверсантів в процесі гормональної реверсії статі, цей метод дозволить ідентифікувати генотипових самців (XY) у дослідній групі, які не повинні використовуватись у наступному спаровуванні з метою отримання 100 %-го покоління самок дунайського лосося.

Враховуючи той факт, що для продукції червоної ікри культивування самців не потрібне, а ідентифікація статі у лососевих риб стає можливою лише після декількох років, питання діагностики статі у лососевих риб є дуже актуальним. Можливість експрес-ідентифікації самців дунайського лосося та їх відбракування знижує вартість культивування самок до 30%.

Часто хромосоми X і Y у деяких видів риб, таких як медака *Oryzias latipes*, мають аналогічну морфологію і несуть однакову генетичну інформацію [9]. Ittura et al. (2001) за допомогою флуоресцентної гібридизації *in situ* показали, що ДНК-маркер 5S rDNA райдужної форелі диференціюється у самок в хромосомах XX за двома локусами, а в самців – за двома локусами в хромосомах XY [10]. Це свідчить про схожість хромосом X і Y і, у відмінності від птахів і ссавців, рання стадія диференціації хромосоми Y у риб робить їх цікавими об'єктами дослідження еволюції статевих хромосом.

У 10 % видів риб, у тому числі і лососевих, ідентифіковані статеві маркери [11]. За допомогою звичайної ПЛР можна ідентифікувати ці специфічні послідовності ДНК, і тим самим швидко визначити стать особини. Але не у всіх цінних видів риб ідентифіковані статеві ДНК-маркери. Так, наприклад,



результати експериментів лабораторій Німеччини, Франції та Італії, спрямованих на вивчення актуального питання ідентифікації статі у чотирьох різновидів осетрів (*Acipenser baerii*, *A. naccarii*, *A. gueldenstaedtii*, *A. ruthenus*), свідчать про відсутність статевих ДНК-маркерів, а отже, неможливість експрес-діагностики статі методом ПЛР [12].

Значний внесок у розвиток аквакультури вносять методи сучасної біотехнології. Серед них можна назвати такі: трансгенні методики, методи ембріональних стовбурових клітин, методи кріоконсервації статевих продуктів, методи протеоміки та вивчення геномів риб за допомогою AFLP і QTL. Використання вищезгаданих методів дозволяє збільшувати швидкість росту риб, підвищувати їх резистентність до інфекційних захворювань, впливати на репродуктивні процеси, одержувати покращені гібриди.

ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШОГО РОЗВИТКУ

На основі полімеразної ланцюгової реакції розроблено метод ідентифікації статі у дунайського лосося *H. hucho*. За допомогою розробленого методу можна діагностувати стать у дунайського лосося на ранньому етапі процесу реверсії статі та відбракувати генотипових самців з метою зменшення витрат на їх утримання.

Специфічні олігонуклеотидні праймери можуть бути використані в діагностиці самців райдужної форелі *O. mykiss*, що свідчить про високу консервативність локусу sdY, який присутній в хромосомі Y більшості лососевих риб.

ЛІТЕРАТУРА

1. Sacobie C. F. D. Sex differentiation and early gonadal development in brook trout / C. F. D. Sacobie, T. J. Benfey // North American Journal of Aquaculture. — 2005. — Vol. 67. — P. 181—186.
2. Genetic determination and temperature effects on turbot *Scophthalmus maximus* sex differentiation : An investigation using steroid sex-inverted males and females / P. Haffray, E. Lebegue, S. Jeu [et al.] // Aquaculture. — 2009. — Vol. 294. — P. 30—36.
3. Sex change in coral reef fish / M. Nakamura, Y. Kobayashi, S. Miura [et al.] // Fish Physiology and Biochemistry. — 2005. — Vol. 31 (2-3). — P. 117—122.
4. Dunham R. A. Aquaculture and fisheries biotechnology: genetic approaches / Dunham R. A. — CABI Publishing : Wallingford, 2004. — 372 p.
5. Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual 3rd edition / J. Sambrook, D. W. Russell. — New York : Cold Spring Harbour, 2001.
6. Chromosome painting supports lack of homology among sex chromosomes in *Oncorhynchus*, *Salmo*, and *Salvelinus* (Salmonidae) / R. B. Phillips, N. R. Konkol, K. M. Reed [et al.] // Genetica. — 2001. — Vol. 111. — P. 119—123.
7. Rud Yu.P. PCR based method for rapid determination of sex in rainbow trout / Yu. P. Rud, I. B. Vladimirovsky, L. P. Buchatsky // Aquaculture of Central and Eastern Europe : present and future. 2nd NACEE Conference (Chiciniău, October 17-19, 2011) : Pontos, Chiciniău, 2011. — P. 224—226.
8. The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (sdY) is a conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids / A. Yano, B. Nicol, E. Jouanno [et al.] // Evolutionary Applications. — 2013. — Vol. 6. — P. 486—496.



9. DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish / M. Matsuda, Y. Nagahama, A. Shinomlya [et al.] // *Nature*. — 2002. — Vol. 417. — P. 559—563.
10. Characterization of sex chromosomes in rainbow trout and coho salmon using fluorescence in situ hybridization (FISH) / P. Iturra, N. Lam, M. Fuente [et al.] // *Genetica*. — 2001. — Vol. 111. — P. 125—131.
11. Devlin R. H. Sex determination and sex differentiation in fish: An overview of genetic, physiological, and environmental influences / R. H. Devlin, Y. Nagahama // *Aquaculture*. — 2002. — Vol. 208. — P. 191—364.
12. Extensive screening of sturgeon genomes by random screening techniques revealed no sex-specific marker / S. Wuertz, S. Gaillard, F. Barbisan [et al.] // *Aquaculture*. — 2006. — Vol. 258. — P. 685—688.

REFERENCES

1. Sacobie, C.F.D. & Benfey, T.J. (2005). Sex differentiation and early gonadal development in brook trout. *North American Journal of Aquaculture*, 67, 181-186.
2. Haffray, P., Lebegue, E. & Jeu, S. (2009). Genetic determination and temperature effects on turbot *Scophthalmus maximus* sex differentiation: An investigation using steroid sex-inverted males and females. *Aquaculture*, 294, 30-36.
3. Nakamura, M., Kobayashi, Y. & Miura, S. (2005). Sex change in coral reef fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 31 (2-3), 117-122.
4. Dunham, R.A. (2004). *Aquaculture and fisheries biotechnology: genetic approaches*. Wallingford: CABI Publishing.
5. Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual 3rd edition*. New York: Cold Spring Harbour.
6. Phillips, R.B., Konkol, N.R., Reed, K.M. & Stein, J.D. (2001). Chromosome painting supports lack of homology among sex chromosomes in *Oncorhynchus*, *Salmo*, and *Salvelinus* (Salmonidae). *Genetica*, 111, 119–123.
7. Rud, Yu.P., Vladimirovsky, I.B. & Buchatsky, L.P. (2011). PCR based method for rapid determination of sex in rainbow trout. *Aquaculture of Central and Eastern Europe: present and future*. 2nd NACEE Conference, Pontos, Chicinău, 224-226.
8. Yano, A., Nicol, B. & Jouanno, E. (2013). The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (sdY) is a conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids. *Evolutionary Applications*, 6, 486–496.
9. Matsuda, M., Nagahama, Y. & Shinomlya, A. (2002). DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*, 417, 559–563.
10. Iturra, P., Lam, N. & Fuente, M. (2001). Characterization of sex chromosomes in rainbow trout and coho salmon using fluorescence in situ hybridization (FISH). *Genetica*, 111, 125–131.
11. Devlin, R.H. & Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: An overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208, 191–364.
12. Wuertz, S., Gaillard, S. & Barbisan, F. (2006). Extensive screening of sturgeon genomes by random screening techniques revealed no sex-specific marker. *Aquaculture*, 258, 685–688.



ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОЛА У ДУНАЙСКОГО ЛОСОСЯ (*HUCHO HUCHO*) МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Ю.П. Рудь, rud_yuriy@ifr.com.ua, Институт рыбного хозяйства НААН, г. Киев
В.Ю. Филиппов, liveroff@gmail.com, Институт рыбного хозяйства НААН, г. Киев
Л.П. Драган, dragan_l@ukr.net, Институт рыбного хозяйства НААН, г. Киев
Л.П. Бучацкий, irido1@bigmir.net, Институт рыбного хозяйства НААН, г. Киев

Цель. Проанализировать нуклеотидные последовательности хромосомы Y лососевых видов рыб и определить фрагмент для подбора специфических олигонуклеотидных праймеров, а также на основе ПЦР разработать метод идентификации пола у дунайского лосося *H. hucho*.

Методика. С помощью алгоритмов ClustalW в программном обеспечении MEGA версии 5.2 были проанализированы нуклеотидные последовательности хромосомы Y лососевых видов рыб. Для разработки экспресс-диагностики пола у дунайского лосося был взят метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Последовательность нуклеотидов в продуктах амплификации была исследована секвенированием.

Результаты. На основе ПЦР разработан метод идентификации пола у дунайского лосося *H. hucho*. Показано, что специфические олигонуклеотидные праймеры продуцируют ампликоны размером около 450 пар нуклеотидов, которые характерны только для самцов дунайского лосося. Также показано, что подобранные праймеры могут быть использованы в диагностике самцов радужной форели *Oncorhynchus mykiss*, что свидетельствует о высокой консервативности локуса *sdY*, который присутствует в хромосоме Y большинства лососевых рыб.

Научная новизна. Определен высококонсервативный локус *sdY* для подбора специфических олигонуклеотидных праймеров, которые фланкируют половой ДНК-маркер у самцов.

Практическая значимость. Экспресс-диагностика пола у дунайского лосося с помощью разработанного метода позволит идентифицировать самцов-реверсантов в процессе гормональной реверсии пола. На этапе отбора реверсантов этот метод позволит идентифицировать генотипических самцов (XY) в опытной группе, которые не должны использоваться в следующем спаривании с целью получения 100 %-го поколения самок дунайского лосося.

Ключевые слова: дунайский лосось, специфический половой локус, ПЦР, реверсия пола.

THE METHOD OF POLYMERASE CHAIN REACTION FOR SEX DETERMINATION IN HUCHEN (*HUCHO HUCHO*)

Yu. Rud, rud_yuriy@ifr.com.ua, Institute of Fisheries of NAAS, Kyiv
V. Filipov, liveroff@gmail.com, Institute of Fisheries of NAAS, Kyiv
L. Dragan, dragan_l@ukr.net, Institute of Fisheries of NAAS, Kyiv
L. Buchatsky, irido1@bigmir.net, Institute of Fisheries of NAAS, Kyiv

Purpose. To analyse the nucleotide sequences of salmonids Y chromosome and to determine the fragment for specific primers selection and also to develop the PCR based method for sex determination in huchen *H. hucho*.

Methodology. Using the ClustalW algorithm in MEGA 5.2, the nucleotide sequences of salmonids Y chromosome were analysed. For developing of method for rapid diagnostic of huchen sex the polymerase chain reaction (PCR) assay was used. The nucleotide sequences of amplified products were investigated by sequencing.

Findings. Using PCR assay the method of sex determination in huchen *H. hucho* was developed. It was shown that specific PCR products in size of 450 nucleotides were visible in huchen males only. In addition we showed that selected primers can be used in sex determination of rainbow trout



Oncorhynchus mykiss and this fact is proved the high rate of sdY locus similarity and its wide distribution in salmonids.

Originality. The nucleotide sequences of salmonids Y chromosome were analysed and highly conservative region of sdY locus for specific primers selection, which covers sex-linked marker, was identified.

Practical Value. Rapid sex determination in huchen by the developed method will allow to identify reversal males in process of gormonal sex reversion. At the stage of reversal males screening, this method will allow to identify the genotypic males (XY) in experimental group and discard them because only phenotypic males with XX genotype (reversal males) must be used in the crosses with native femelas for getting of 100 % all-females stock.

Key words: huchen, sexually dimorphic locus, PCR, sex reversal

