

THE APPLICATION OF RADIOIMMUNOASSAY TO
SEX IDENTIFICATION IN BLUEFIN TUNA

by

G. B. Sangalang, H. C. Freeman
P. C. F. Hurley

SUMMARY

Using a relatively simple and rapid steroid radioimmunoassay (RIA) procedure that requires only 50 - 100 ul of blood plasma, Sangalang, et al (1978) were able to determine accurately the sex of brook trout, rainbow trout, cod and bluefin tuna. Potential use of the method in the identification of sex in bluefin tuna (Thunnus thynnus) is discussed.

RESUME

En suivant une méthode relativement simple et rapide, de radio-immunologie sanguine, qui ne demandait que 50-100 ul de plasma sanguin, Sangalang et al. (1978) ont pu déterminer avec précision le sexe de la truite fario, la truite arc-en-ciel, la morue et le thon rouge. On traite des possibilités de l'emploi de cette méthode pour identifier le sexe du thon rouge (Thunnus thynnus).

RESUMEN

Utilizando un procedimiento, relativamente sencillo y rápido, de inmunología sanguínea (RIA) que requiere sólo 50-100 ul de plasma, Sangalang et al (1978) pudieron determinar con exactitud el sexo del salvelino (o trucha de fontana), trucha arco iris, bacalao y atún. Se debate el empleo potencial del método en la identificación del sexo del atún (Thunnus thynnus).

Bluefin tuna possess no obvious or reliable secondary sexual characteristics, a problem faced by investigators studying many species of fish. The sole means of sex determination in bluefin tuna has been gross and/or histological examination of the gonads. This has limited research in characteristics differentiated by sex to studies where gonad samples can be obtained or examined by trained personnel at the time of death of the specimen.

Sangalang et al (1978) applied a new technique of RIA of the sex hormone, 11-ketotestosterone (11-KT) to plasma samples collected from 60 giant bluefin tuna captured in mackerel traps in St. Margaret's Bay, N.S. in 1977. They were able to assign sex correctly to 19 of 22 females and all 38 male samples. The procedure, which they describe in detail, involves the analysis of a 100 µl crude plasma sample for response to a prepared 11-KT antiserum. Only the recent availability of a commercially prepared antiserum to 11-KT has made this procedure possible without the expensive and time-consuming laboratory setups necessary to prepare antiserum to this steroid.

This procedure relies on differences in levels of 11-KT between males and females, as demonstrated in several salmonid species (Sangalang and Freeman, 1977, 1978; Idler, et al, 1960). Females have been shown in these cases to have 11-KT levels considerably lower than males, in any given stage of maturity. However in the study of Sangalang et al (1978), 3 of 22 female bluefin demonstrated response levels comparable to those found in male bluefin. It is not known whether the relatively high response levels in the three females was due to their being just past functional maturity.

To improve the reliability of this procedure for bluefin tuna, sampling must clearly be extended to fish throughout the entire cycle of sexual maturity. The detailed RIA procedure described by Sangalang and Freeman (1977), may be used to determine the exact role of 11-KT in the sexual physiology of this species.

On the basis of the results of Sangalang, et al. (1978), a reasonably reliable method has been established for sex determination of post-spawned giant bluefin tuna, without the fatal procedure of gonadectomy. Such a procedure will facilitate studies examining characteristics such as growth rates and migration routes which appear to differ by sex. This is especially the case for tag and release experiments since trained personnel are usually not available at the time of recapture to determine sex and gonad samples are often difficult to obtain. Determination of sex at the time of tag and release by analysis of a plasma sample using this procedure would substantially increase the information obtained from release and recapture data.

It is the intention of investigators involved in the Canadian bluefin tuna tagging program that this procedure be incorporated in future tag and release operations in Canadian waters, whenever possible. It is hoped that this procedure can be tested for and extended to bluefin in all stages of sexual maturity.

Literature Cited

- Idler, D.R., P.J. Schmidt and A.P. Ronald. 1960. Isolation and identification of 11-ketotestosterone in salmon plasma. *Can. J. Biochem. Physiol.* 38: 1053-1057.
- Sangalang, G.B. and H.C. Freeman. 1977. A new sensitive and precise method for determining testosterone and 11-ketotestosterone in fish plasma by radioimmunoassay. *Gen. Comp. Endocrinol.* 32: 432-439
- Sangalang, G.B., H.C. Freeman and R.B. Flemming. 1978. A simple technique for determining the sex of fish by radioimmunoassay using 11-ketotestosterone antiserum. *Gen. Comp. Endocrinol.* (in press).

Le thon rouge ne possède pas de caractères sexuels secondaires visibles ou fiables; c'est le problème auquel ont à faire face les chercheurs en étudiant bon nombre d'espèces de poissons. Jusqu'à présent, l'unique moyen de déterminer le sexe chez le thon rouge était l'examen sommaire ou histologique des gonades. Les recherches sur la différenciation des sexes par les signes caractéristiques se résument aux examens que pouvaient effectuer les spécialistes sur les gonades prélevées sur des spécimens au moment de leur mort.

Sangalang et ses collaborateurs (1978) ont appliqué une nouvelle technique de radioimmunoessai de l'hormone sexuelle, le 11-ketotestostérone (11-KT), aux échantillons de plasma prélevés sur 60 thons rouges géants capturés en 1977 dans les parcs à maquereaux de la baie Sainte-Marguerite en Nouvelle-Écosse. Ils ont pu déterminer correctement le sexe de 19 femelles sur 22 et celui de tous les 28 spécimens mâles. La méthode employée, et qu'ils décrivent en détails, consiste à analyser un échantillon de 100 µl de plasma brut et à observer sa réaction à une préparation d'antisérum 11-KT. Seule la présence sur le marché d'un antisérum 11-KT préparé commercialement a permis l'emploi de cette méthode qui, autrement, aurait exigé des préparatifs longs et coûteux pour produire localement, en laboratoire, l'antisérum de ce stéroïde.

Ce procédé s'appuie sur la différence de teneur en 11-KT entre mâles et femelles, différence qui a été démontrée pour plusieurs espèces de salmonidés (Sangalang et Freeman, 1977, 1978; Idier, et al, 1960). Il avait alors été prouvé que les femelles avaient une teneur beaucoup plus faible en 11-KT, et cela à tous les stades de leur maturité. Toutefois, dans l'étude de Sangalang et al (1978), 3 des 22 thons rouges femelles ont présenté des niveaux de réactions comparables à ceux obtenus chez les thons rouges mâles. On ne saurait dire toutefois si les niveaux de réaction relativement élevés chez les trois femelles étaient attribuables au fait qu'elles aient pu se trouver au début de la phase post-fonctionnelle de leur maturité sexuelle.

Afin de conférer une plus grande fiabilité à cette méthode en ce qui concerne le thon rouge, il faudrait que les échantillons analysés soient prélevés sur des thons à toutes les phases du cycle de maturité. Le mode opératoire de radioimmunoessai décrit en détail par Sangalang et Freeman (1977) peut servir à déterminer le rôle exact de l'hormone 11-KT dans la physiologie sexuelle de cette espèce.

En se fondant sur les résultats obtenus par Sangalang et ses collaborateurs (1978), c'est une méthode raisonnablement fiable pour la détermination du sexe chez le thon rouge géant mature sans avoir recours à l'intervention radicale qu'est la gonadectomie. Cette méthode va faciliter les études sur des points caractéristiques tels que le rythme de croissance et les trajets migratoires, qui semblent différer d'un sexe à l'autre. Cette plus grande facilité sera particulièrement sensible dans le cas des expériences relatives à l'étiquetage et à la remise à l'eau, étant donné qu'au moment du repêchage, le personnel spécialisé est rarement sur place pour déterminer le sexe et que les échantillons de gonades sont souvent difficiles à obtenir. L'établissement du sexe au moment de l'étiquetage et du rejet à la mer au moyen de l'analyse d'échantillons de plasma par la méthode de radioimmunoessai enrichirait de façon significative les données recueillies au moment du rejet à la mer et de la reprise.

Les chercheurs attachés au programme canadien d'étiquetage du thon rouge désirent grandement voir cette méthode de détermination des sexes intégrée, dans la mesure du possible, aux opérations d'étiquetage et de rejet à l'eau qui sont effectuées dans les eaux canadiennes. Il est à souhaiter que ce procédé puisse être expérimenté et étendu à tous les stades de la maturité sexuelle du thon rouge.

Références

- Idier, D.R., P.J. Schmidt et A.P. Remald. 1960. Isolation and identification of 11-ketotestosterone in salmon plasma.
Can. J. Biochem. Physiol. 38: 1053-1057
- Sangalang, G.B. et H.C. Freeman, 1977. A new sensitive and precise method for determining testosterone and 11-ketotestosterone in fish plasma by radioimmunoassay.
Gen. Comp. Endocrinol. 32: 432-439
- Sangalang, G.B., H.C. Freeman et R.B. Fleming. 1978. A simple technique for determining the sex of fish by radioimmunoassay using 11-ketotestosterone antiserum.
Gen. Comp. Endocrinol. (sous presse)

El atún rojo no posee ninguna característica sexual secundaria obvia o fiable, problema planteado a los investigadores que estudian numerosas especies de peces. El único medio de determinar el sexo en el atún rojo ha sido mediante el examen general e histológico de las gónadas. Este procedimiento ha limitado la investigación en características diferenciadas por el sexo a estudios en que las muestras de gónadas pueden obtenerse o ser examinadas por personal capacitado a la muerte del espécimen.

Sangalang et al. (1978) aplicó una nueva técnica del RIE de la hormona sexual 11-cetotestosterona (11-CT) a muestras de plasma recopiladas de entre 60 atunes rojos gigantes capturados en las nasas de caballa en la bahía St. Margaret, Nueva Escocia en 1977. Los autores pudieron determinar correctamente el sexo en 19 de las 22 muestras hembras y en todas las 38 muestras masculinas. El método, descrito por los autores en detalle, implica el análisis de una muestra de plasma pura de 100 l en respuesta a un antisuero preparado 11-CT. Únicamente la disponibilidad reciente de un antisuero preparado comercialmente 11-CT hizo posible este procedimiento sin tener que recurrir a las costosas y largas preparaciones de laboratorio necesarias para producir el antisuero a este esteroide.

Este procedimiento depende de las diferencias de los niveles del 11-CT entre machos y hembras, según se ha demostrado en varias especies salmónidas (Sangalang y Freeman, 1977, 1978; Idler et al, 1960). Se demostró en estos casos que las hembras tienen niveles de 11-CT considerablemente más bajos que los de los machos en cualquier etapa de la madurez. Sin embargo, en el estudio de Sangalang et al (1978), 3 de los 22 atunes rojos hembras demostraron un nivel de respuesta similar a los encontrados en los atunes machos. Se ignora si los niveles de respuesta relativamente altos de las tres especies hembras se debieron a que habían pasado su madurez funcional.

Con objeto de mejorar la fiabilidad de este procedimiento respecto al atún rojo, la preparación de muestras deberá extenderse claramente a los peces a través de todo el ciclo de madurez sexual. El procedimiento detallado de RIE descrito por Sangalang y Freeman (1977), puede utilizarse para determinar la función exacta del 11-CT en la fisiología sexual de esta especie.

En base a los resultados obtenidos por Sangalang et al (1978), se ha establecido un método suficientemente fiable para la determinación sexual del atún rojo gigante post-frezado sin necesidad de recurrir al procedimiento fatal de la gonadectomía. Dicho procedimiento facilitará los estudios al examinar características tales como las tasas de crecimiento así como las rutas migratorias

que parecen diferir según el sexo. Esto es lo que ocurre especialmente en los experimentos de marcado y puesta en libertad, ya que en el período de recaptura no existe actualmente personal capacitado para determinar el sexo y las muestras de gónadas son, a menudo, difíciles de obtener. La determinación del sexo en el período de marcado y puesta en libertad mediante análisis de una muestra de plasma por este procedimiento aumentaría considerablemente la información procedente de datos relativos a puesta en libertad y recaptura.

Los investigadores que participan en este programa canadiense de marcado del atún rojo tienen la intención de incorporar este procedimiento a las futuras operaciones de marcado y puesta en libertad en aguas canadienses, cada vez que sea posible. Se espera que el procedimiento pueda ponerse a prueba así como aplicarlo al atún rojo en todas las etapas de su madurez sexual.

Bibliografía

- Idler, D.R., P.J. Schmidt y A.P. Ronald. 1960. Isolation and identification of 11-ketotestosterone in salmon plasma (Aislamiento e identificación del 11-cetotestosterona en el plasma de salmón).
Can. J. Biochem. Physiol. 38: 1053-1057.
- Sangalang, G.B. y H.C. Freeman. 1977. A new sensitive and precise method for determining testosterone and 11-ketotestosterone in fish plasma by radioimmunoassay. (Un nuevo método delicado y preciso para determinar la testosterona y la 11-cetotestosterona en el plasma de los peces mediante el radioinmunoensayo).
Gen. Comp. Endocrinol. 32: 432-439
- Sangalang, G.B., H.C. Freeman y R.B. Fleming. 1978. A simple technique for determining the sex of fish by radioimmunoassay using 11-ketotestosterone antiserum. (Una técnica sencilla para determinar el sexo de los peces mediante el radioinmunoensayo utilizando el antisuero 11-cetotestosterona).
Gen. Comp. Endocrinol (en prensa).