

Tilapia *Oreochromis niloticus*의 성분화시 Aromatase의 작용시기

권준영^{*} · David J Penman¹ · 권혁추

선문대학교 응용생물과학부

¹Institute of Aquaculture, University of Stirling

The Timing of Aromatase Action for Sex Differentiation in the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*

Joon Yeong Kwon[†], David J Penman¹ and Hyuk Chu Kwon

Division of Applied Biological Sciences, Sunmoon University, Asan 336-708, Korea

¹Institute of Aquaculture, University of Stirling, Stirling, Scotland FK9 4LA, U.K.

ABSTRACT : Sex steroids are generally considered as natural sex inducers in fish, and aromatase (cytochrome P450 aromatase) that catalyzes androgens into estrogens in the steroidogenic pathway is also known to be involved in sex differentiation. The timing of aromatase action is, thus, of central importance in the study of fish sex differentiation. We treated sexually undifferentiated tilapia (*Oreochromis niloticus*) larvae with FadrozoleTM, a non-steroidal aromatase inhibitor (AI), by immersing the fish in a solution containing AI during the sex differentiation period to narrow down the critical period of aromatase action. Fish were treated once at 11 or 13 days post fertilization (dpf), or twice at 11 and 13 dpf. The concentrations of AI at each time of the treatment were 0 mg/L (control), 50 mg/L or 100 mg/L. Survival rate was not statistically associated with AI immersion treatment ($p>0.25$). However, sex ratio was significantly altered by the treatment, with higher concentration and double immersion being more effective in masculinizing genetic females ($p<0.05$). These results suggest that aromatase action for sex differentiation in this fish species would begin at least from 11 dpf which is much earlier than previously expected, and that only 3 hours of brief immersion in AI solution is powerful enough to alter genetically programmed sex.

Key words : Aromatase inhibitor, Sex steroid hormone, Sex differentiation, Tilapia.

요 약 : 어류의 체내에서 성분화를 유도하는 물질이 성스테로이드호르몬(sex steroid hormone)이라는 사실이 잘 밝혀져 있으며, 성스테로이드 생합성 효소의 하나인 aromatase도 성분화에 직접적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 유전적으로 암컷인 틸라피아 자어(larvae) 집단을 aromatase 저해제(aromatase inhibitor, AI)인 Fadrozole로 침지 처리하여 초기 발생단계 중 어느 시기에 aromatase가 성분화 유도 작용을 하는 지를 조사하였다. Fadrozole 처리 유무 및 처리 농도의 차이는 부화 자어의 생존율에 유의한 차이를 유발하지 않았다. 하지만, 부화후 11일과 13일째에 고농도의 Fadrozole로 처리한 실험군의 자어는 유전적인 성이 암컷임에도 불구하고 유의하게 높은 비율의 자어가 수컷으로 분화하였다. 이 결과는 틸라피아 부화 자어가 스테로이드 생합성 효소의 저해에 아주 민감하게 반응하며, 이 중에서 aromatase의 주된 작용시기가 예상보다 훨씬 빠른 부화 후 11일 전후라는 사실을 보여준다. 또한 이상의 결과는 단 3시간의 AI 침지 처리가 유전적으로 설정되어 있는 성과 반대방향으로의 성분화를 유도하기에 충분할 정도로 강력함을 의미한다.

서 론

어류의 초기 발생배(developing embryos)를 외인성 성스테로이드 호르몬(exogenous sex steroid hormone)으로 처리하면 유전적 성과 반대방향으로 성전환하든지 또는 불임화된다. 외인성 androgen의 응성화(masculinization) 효과와 외

인성 estrogen의 자성화(feminization) 효과는 많은 어종에서 증명된 바 있다(Yamazaki, 1983). 그러나 이러한 성스테로이드 호르몬들이 성분화에 작용하는 메카니즘은 아직 명확하지 않다. Cytochrome P450 aromatase가 androgen을 estrogen으로 전환시키는 효소라는 사실에 근거하여, 최근 성분화 과정중 이 효소의 역할이 조사되었다. 어류를 포함한 몇몇 생물 중에서, 이 효소의 작용을 저해시켰을 때, androgen과 마찬가지로 유전적 암컷을 응성화시키는 효과가 나타났다(Elbrecht & Smith, 1992; Yu *et al.*, 1993; Piferrer *et al.*, 1994; Kitano *et al.*, 2000; Kwon *et al.*, 2000). 이러한 결과

* 이 논문은 2002년도 선문대학교 교내학술연구비의 지원을 받았습니다.

† 교신저자: 충남 아산시 당정면 갈산리 100, 선문대학교 응용생물과학부, (우) 336-708, (전) 041-530-2284, (팩) 041-530-2917, E-mail: jykwon@sunmoon.ac.kr

들은 초기 발생시 유전적인 암컷에서 나타나는 androgen의 aromatization이 암컷 생식소 분화에 열쇠가 되는 과정임을 시사한다. 따라서 초기발생 과정 중 어류 성분화 시기 및 과정을 보다 깊이 이해하기 위해서는 aromatase의 작용시기를 파악하여야 한다.

나일 틸라피아, *Oreochromis niloticus*는 아주 중요한 수산 양식 대상종이다(FAO, 1997). 전 수컷 집단(all male population)의 생산은 이 종의 양식과정 중 나타나는 원치 않는 번식을 막을 수 있기 때문에, 이 종의 성결정에 대한 연구가 진행되어 왔고, 그 결과 다양한 성제어 기술들이 개발되었다. 이러한 기술들에는 외인성 성스테로이드 호르몬 투여법(McAndrew, 1993; MacIntosh & Little, 1995) 또는 염색체 조작(Mair et al., 1997) 등이 있다. *O. niloticus*는 비록 환경적 요인(Baroiller et al., 1995; Abucay et al., 1999), 2차적 유전 요인(Hussain et al., 1994) 등이 성결정에 영향을 미칠 수 있다는 사실이 알려져 있기는 하지만, 주로 XX/XY 염색체에 의하여 성이 결정되어진다.

원치 않는 번식을 방지하는 것뿐만 아니라, 암수간의 성장 차이 또한 이 종에 있어서 중요한 관심사가 된다. 다양한 연구가 이 종의 암수 간 성장 차이를 밝히기 위하여 진행되었고, 현재는 수컷 틸라피아가 암컷보다 훨씬 빨리 크다고 하는 사실이 일반화 되어 있다.

틸라피아는 다음 몇 가지 점에서 성결정 과정과 관련한 aromatase의 역할을 조사하는데, 훌륭한 모델 어종이 될 수 있다. 먼저, 축적된 연구 결과에 힘입어 유전적으로 전 암컷 또는 전 수컷인 틸라피아 집단을 생산할 수 있다. 두 번째로 조직학적 연구를 바탕으로 개략적인 성분화 시기가 밝혀져 있다. 셋째, 성적 성숙기에 이른 틸라피아의 암컷은 영양상태가 양호하면 25°C 전후의 온도에서 15~20일 간격으로 산란하며, 성적 성숙기에 도달한 수컷으로부터는 언제나 그 정액을 채취할 수 있어 이 어종은 번식 및 초기 발생과 관련한 연구에 매우 적합하다. 끝으로 부화 후 2~3개월 이내에 아주 간단한 gonad-squashing technique을 이용하여 암수를 판단할 수 있다.

조직학적 검사결과에 근거하면 최초의 성분화가 확인되는 시기는 이 종에서 수정 후 26~30일 사이이다(Nakamura & Nagahama, 1985, 1989). 그리고 호르몬 처리 결과를 바탕으로 살펴보면, 성적으로 불안정한 시기(즉 외부 요인에 의해 암수 어느 쪽으로든 분화할 수 있는 시기)가 최초로 먹이를 먹는 시기에서부터 수정 후 35일경까지이다. 그러나 최근 이 종의 성분화 시기가 지금까지 생각해 왔던 것보다 훨씬 빠를 수 있다는 의견이 제기되고 있다(Kwon et al., 2000). 이 종

의 보다 정확한 성분화 시기를 파악한다면 현재의 성제어 기술을 개선할 수 있을 것이며, 성분화 메커니즘을 연구하는데 중요한 정보로 제공되어질 수 있다.

Aromatase inhibitor(aromatase 저해제, AI)는 인간의 유방암 치료를 위하여 개발되었으며 (Brodie, 1991; Pérez and Borja, 1992), 현재까지 어류를 포함한 많은 하등 척추동물에서 aromatase 작용 저해를 위해 성공적으로 활용되어졌다(Elbrecht & Smith, 1992; Yu et al., 1993; Piferrer et al., 1994; Kitano et al., 2000; Kwon et al., 2000). Fadrozole은 아주 강력한 비 스테로이드계의 경쟁적(nonsteroidal competitive) AI이다(Pérez and Borja, 1992). 이 물질은 이전에 연어과 어류의 성분화 연구(Piferrer et al., 1994) 및 연어과 어류 estrogen 합성에 관한 연구(Afonso et al., 1999) 그리고 틸라피아 성분화 연구(Kwon et al., 2000; Kwon et al., 2002) 등에 이용되어진 바 있다. 그러나 이 연구들은 AI를 장기간 연속적으로 사료와 함께 먹여서 그 효과를 조사하였다. 본 연구에서는 성이 분화되지 않은 틸라피아의 자어를 Fadrozole 용액에 단기간 침지 처리하여 일정기간 사육한 후, 성분화 결과를 조사함으로써 aromatase의 결정적 작용시기를 밝혔다.

재료 및 방법

유전적으로 암컷인 암컷 틸라피아(XX female)와 유전적으로 암컷이지만 수컷으로 분화시킨 틸라피아(XX male)를 수온 28°C에서 사육하면서 성성숙을 유도하였다. 성성숙 후 이 친어들로부터 난(egg)과 정자(sperm)를 얻어 인공수정(artificial fertilization)시키고, 얻어진 수정란들을 28°C의 incubator에서 발생 및 부화시켰다. 수정 48시간 이후 초기 흑색소의 착색(pigmentation) 여부를 파악하여 사란(dead eggs)을 분리 제거하였다. 난황 흡수가 완료되고 입이 열려 먹이를 찾기 시작하는 수정 후 11일된 자어(유전적으로 모두 암컷인 자어 집단)를 각각의 실험수조로 나누어 옮긴 다음, 인위적으로 aromatase의 효소활성을 저해시키기 위해 비스테로이드계 AI의 한 종류인 Fadrozole™(Novartis, NJ, USA) 용액에 침지시켰다.

AI의 처리과정을 간단히 요약하면 다음과 같다. 먼저 Fadrozole을 99% ethanol에 녹인 후 다시 맑은 배양수로 50 mg/L와 100 mg/L의 농도로 희석하였다. 이때 대조구를 포함한 모든 실험구에는 동일한 양의 ethanol을 사용하였다. 이어 수정 후 11일째(11 dpf, days post fertilization) 부화 자어를 네 그룹으로 크게 나누어 그중 두 그룹의 부화 자어들

을 대조구(0 mg/L), 50 mg/L 또는 100 mg/L의 농도 실험구에 각각 수용 처리하였다. AI의 처리시간은 전 실험에서 모두 3시간으로 하였다. 3시간 후에는 다시 정상적인 배양수에 수용하였다. 그로부터 이틀 후(13 dpf), 앞에서 나눈 네 그룹의 부화 자어중 11 dpf에서 처리를 받지 않은 한 그룹과 처리를 받은 한 그룹을 각각 동일한 조건으로 AI 처리하였다. 13 dpf에 최종 처리가 끝나면 서로 다른 시기에 서로 다른 농도로 처리된 각각의 실험그룹을 총 36개(3개 농도×4개 처리시기 및 횟수×3반복=36 실험구)의 수조에 분리 수용하여 1개월간 사육하였다. 1개월 후에는 어체의 성장을 고려하여 대형 수조로 옮겨 2개월간 더 사육하였다. 실험 개시 3개월 후 각 실험구별 생존율을 조사하고, 각각의 실험어를 해부하여 생식소를 채취한 다음, gonad-squashing technique 및 acetocarmine stain법을 이용하여 생식소 표본을 제작하고 현미경하에서 성분화 상태를 조사하였다(Fig. 1). 각 실험구의 틸라피아 자어 수는 각각 40마리씩이었으며, 실험기간 동안 각 실험구에는 하루 두 차례씩 송어용 배합 사료를 공급하였다. 실험기간 중 처음 1개월은 지수식 시스템에서 사육하면서 매일 70%의 물을 환수하였고 이후 암수 판별 전까지 2개월은 순환여과식 시스템에서 사육하였다.

생체조직 염색을 위한 acetocarmine은 Guerrero & Shelton (1974)의 방법을 따라 조제하였다. 먼저 0.5 g의 carmine (Sigma)을 100 mL의 45% acetic acid에 녹인 후 2~4분간 끓였다. 그런 다음 이 용액을 식혀서 여과지에 걸러 녹지 않은 carmine 입자를 제거하였다. 생식소 분석시 이 acetocarmine 용액을 각 표본당 한 방울씩 사용하여 염색하였다.

미성숙된 틸라피아 자어의 생식소는 두신(head kidney) 뒤쪽에서 시작되어 부레의 옆면을 따라 좌우 하나씩의 가는 실과 같은 형태로 미완성된 생식공까지 뻗어 있다. 틸라피아 자어를 해부하여 내장을 들어올리고 이 두 가닥의 생식소를 채취한 후 생리식염수에 가볍게 씻어 슬라이드글라스 위에

놓고 acetocarmine 용액을 첨가하였다. 그 위에 커버글라스를 덮은 다음 글라스 표면에 작은 압박을 가하여 빛의 투과도를 높인 후 검경(배율 25×~100×)하여 암수를 판정하였다.

얻어진 모든 데이터는 mean±S.E.로 표현하였으며, 통계학적인 분석시 %로 표현되는 데이터는 arcsine transformation한 후 통계처리 하였다. 통계학적 검정은 일원분산 분석(one-way ANOVA)에 이은 Turkey's multiple range test에 의하였으며, 유의 수준(p) 0.05 이하를 유의한 차이의 판정기준으로 정하였다.

결 과

AI 침지실험기간중의 전체적인 생존율은 처리조건에 관계없이 낮게 나타났다(Table 1). 이 낮은 생존율의 원인은 자어를 대형 수조로 옮기는 시간이 지연되어 나타난 것으로 판단된다. 대조구(AI 0 mg/L)의 생존율은 처리구들(11 dpf AI 50 mg/L: 35.0±3.8%; 13 dpf AI 50 mg/L: 30.0±4.3%; 11&13 dpf AI 50 mg/L: 32.5±3.8%; 11 dpf AI 100 mg/L: 39.2±5.8%; 13 dpf AI 100 mg/L: 43.3±13.4%; 11&13 dpf AI 100 mg/L: 40.0±14.2%)의 생존율보다 높은 53.3±5.8%였다. 하지만, 각 실험구별 생존율의 차이는 통계학적으로 AI 침지처리와 무관하였다($p>0.25$).

미성숙된 틸라피아의 생식소를 squashing technique으로 분석했을 때, 개체에 따라 다른 구조의 생식소를 가지고 있는 것이 확인되었다. 이들은 현미경하에서 관찰된 형태에 따라 두 그룹으로 나누어졌는데(Fig. 1), 한 그룹은 생식소내부에 타원형으로 생긴 다수의 난모세포를 가지고 있었으며, 다른 그룹에서는 난모세포가 전혀 관찰되지 않았고 전형적인 미분화 정소의 형태를 띠고 있었다. 따라서 본 연구에서는 난모세포를 가지고 있는 그룹을 암컷으로 가지고 있지 않은 그룹을 수컷으로 판정하였다.

Table 1. Survival rates of tilapia *O. niloticus* fry treated by immersion in 50 mg/L or 100 mg/L AI solution once at 11 or 13 dpf, or twice at 11 and 13 dpf

Treatments	Survival rates in each replicate(%)			Mean±S.E.
Control	42.5	62.5	55.0	53.3± 5.8
11 d-50	40.0	37.5	27.5	35.0± 3.8
13 d-50	37.5	30.0	22.5	30.0± 4.3
11&13 d-50	25.0	37.5	35.0	32.5± 3.8
11 d-100	30.0	37.5	50.0	39.2± 5.8
13 d-100	27.5	32.5	70.0	43.3±13.4
11&13 d-100	12.5	47.5	60.0	40.0±14.2

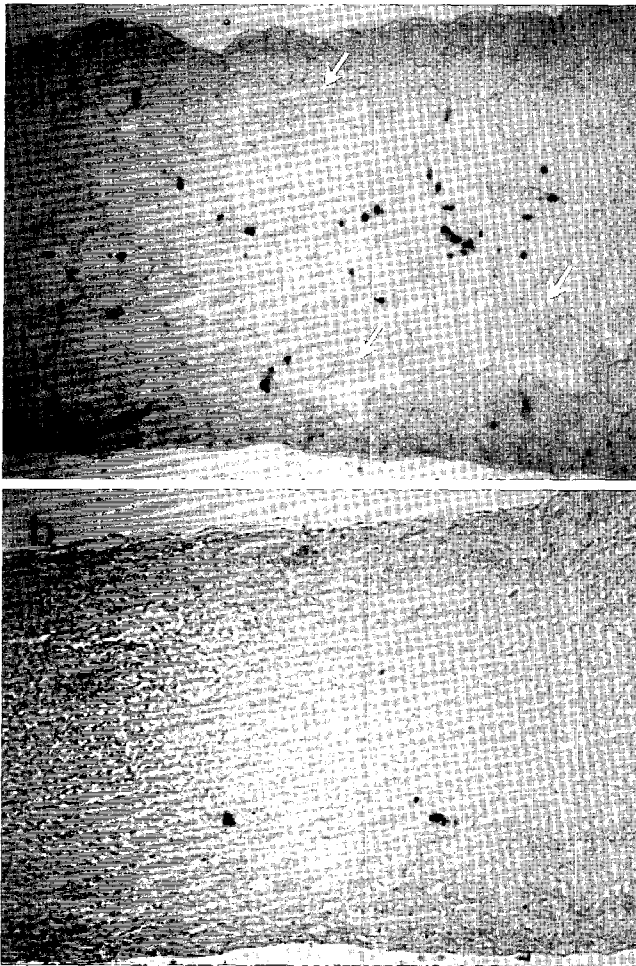


Fig. 1. Squashed gonads stained with acetocarmine(×100). Two types of gonads(a: one type with many oval structures-arrows, b: the other type without any prominent oval structure) were observed from the groups of genetically female *O. niloticus* treated by immersion in 50 mg/L or 100 mg/L AI solution once at 11 or 13 dpf, or twice at 11 and 13 dpf. Type a was judged as the ovarian structure, type b the testicular structure.

모든 AI 침지 처리한 실험구는 수컷 틸라피아로 성전환한 비율에 있어 AI 처리에 양성적으로 반응하였다(Fig. 1). 부화 후 11일째 AI 용액에 대한 1회의 침지처리는 낮은 농도(50 mg/L)와 높은 농도(100 mg/L) 모두에서 통계적으로 유의한 수컷 비율의 증가를 유도하지 않았다($p > 0.05$). 반면 부화 후 13일째 AI 용액에 대한 1회의 침지처리는 낮은 농도에서는 유의한 수컷의 비율 증가를 보이지 않았지만, 높은 농도에서는 통계적으로 유의한 수컷 비율 상승을 야기하였다($p < 0.05$). 부화 후 11일째와 13일째 2회 AI 용액에 침지하였을 때는 낮은 농도와 높은 농도 모두에서 유의하게 수컷 비율의 증가를 보였다($p < 0.05$). 이는 AI 처리의 농도 의존적

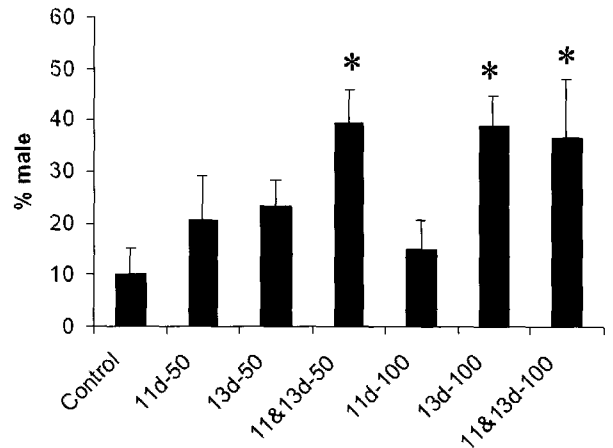


Fig. 2. Sex ratios in groups of genetically female *O. niloticus* treated by immersion in 50 mg/L or 100 mg/L AI solution once at 11 or 13 dpf, or twice at 11 and 13 dpf. * Significantly different from control($p < 0.05$). Each bar represents the mean±S.E.

효과 및 축적 효과를 잘 반영하는 결과이다.

고 찰

AI의 단기 침지 처리는 유전적으로 암컷인 틸라피아 자어를 수컷으로 분화시켰다. 이는 aromatase가 틸라피아의 성분화에 핵심적인 역할을 한다는 사실과 이 종의 성분화가 난황흡수 직후 먹이를 찾기 시작할 무렵(11 dpf)부터 본격적으로 진행된다는 사실을 증명한다.

본 연구에서 이용한 AI(Fadrozole)는 어류의 성장이나 생존에 심각한 부작용을 야기하지 않았다. Fadrozole의 작용은 가역적이며, 유사한 종류의 다른 aromatase inhibitor, aminoglutethimide보다 200~400배 가량 그 효능이 더 강함에도 불구하고 그 독성은 훨씬 작다(Pérez & Borja, 1992). 인간에게 이 저해제가 사용된 이래 생명을 위협할 정도의 독성이 보고된 사례는 없었다. 따라서 어류에 대한 Fadrozole 사용의 안전성에는 큰 문제가 없는 것으로 판단된다. 하지만, 보다 미세한 부작용 여부는 앞으로 이어지는 연구에서 신중히 재검토되어야 할 것이다.

틸라피아의 성분화 시기는 부화 후 27~30일 사이인 것으로 알려져 왔다(Nakamura & Nagahama, 1989). 하지만 본 연구에서는 이 시기보다 훨씬 빠른 부화 후 11일과 13일에 AI를 이용하여 스테로이드 생합성 경로를 저해했을 때 자어의 성전환이 일어났다. 이는 성분화가 기존에 생각한 것보다 훨씬 빠른 시기에 일어난다는 사실을 의미한다. 이러한 본 연구의 결과는 최근에 보고된 두 연구 결과(Kwon et al.,

2000; Kwon *et al.*, 2002)들과도 부합한다. 이들 두 연구에서는 침지처리 대신 장기간에 걸쳐 사료에 AI를 섞어 먹였는데, 이들 연구에서도 역시 부화 초기에 AI의 성전환 효과가 제기되었다.

현재까지 개발된 틸라피아 전 수컷 집단 생산 기술에서는 대략 25일에서 30일간 androgen을 틸라피아 자어에 투여하였다(McAndrew, 1993). 하지만 이보다 짧은 21일간의 처리나(MacIntoshi & Little, 1995), 20일간의 처리(Mair *et al.*, 1997)도 성공적인 단성집단(monosex population)의 생산을 유도한 바 있다. 본 연구의 결과는, 적절한 처리 시기와 농도가 파악된다면, 5일 이하는 물론 심지어는 2~3시간의 짧은 침지 처리도 단성집단 생산에 효과적일 수 있음을 시사한다.

본 연구의 결과와 이전의 연구 결과(Kwon *et al.*, 2000; Kwon *et al.*, 2001; Kwon *et al.*, 2002)들을 종합하여 볼 때, 틸라피아의 성분화는 부화 후 10~20일 사이에 집중적으로 진행되는 것으로 추정된다. 이 결과에 근거하면 수산양식가(aquaculturist)들이 틸라피아의 단성양식(monosex culture)을 시도하고자 할 때, 호르몬 및 AI 처리기간을 이 시기에 맞추어 단축할 수 있으며, 그 결과 많은 시간과 비용을 줄일 수 있게 할 수 있을 뿐 아니라 장기간의 화학물질 처리에 대한 소비자들의 거부감도 감소시킬 수 있다. 본 연구의 결과는, 또한, 환경호르몬이 이 어종의 성발현에 미치는 영향을 조사하고자 할 때, 부화 후 10~15일 사이를 반드시 실험기간에 포함시켜야 한다는 사실을 제시한다.

결론적으로, 본 연구의 결과는 sex steroid hormone과 aromatase가 어류의 성분화에 결정적 역할을 한다는 이론을 지지한다. 그리고 aromatase inhibitor가 어류의 성제어 기술의 하나로 활용될 수 있음을 제시한다. 또한 틸라피아의 성분화 시기가 지금까지 밝혀졌던 것보다 15일 이상 더 빠르며 따라서 이 종의 성제어를 위한 기술의 적용 시점도 앞당겨져야 함을 의미한다. 앞으로 어류 성분화를 보다 깊이 있게 이해하기 위해서 aromatase 유전자들의 발현 조절 메커니즘이 연구되어야 할 것이다.

인용문헌

- Abucay JS, Mair GC, Skibinski DOF, Beardmore JA (1999) Environmental sex determination: The effects of temperature and salinity on sex ratio in *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture* 173:219-234.
- Afonso LOB, Iwama GK, Smith J, Donaldson EM (1999) Effects of the aromatase Fadrozole on plasma sex steroid secretion and ovulation rate in female coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, close to final maturation. *Gen Comp Endocrinol* 113:221-229.
- Baroiller JF, Chourrou D, Fostier A, Jalabert B (1995) Temperature and sex chromosomes govern sex ratios of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. *J Exp Zool* 273:216-223.
- Brodie A (1991) Aromatase and its inhibitors - An overview. *J Steroid Biochem Mol Biol* 40:255-261.
- Elbrecht A, Smith RG (1992) Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science* 255:467-470.
- FAO (1997) Review of the state of world aquaculture. *FAO Fisheries Circular No. 886 (Rev. 1)*. p 163.
- Guerrero RD, Shelton WL (1974) An aceto-carmin squash method of sexing juvenile fishes. *Prog Fish Cult* 36: 56-56.
- Hussain MG, McAndrew BJ, Penman DJ, Sodsuk P (1994) Estimate gene-centromere recombination frequencies in gynogenetic diploids of *Oreochromis niloticus* (L.) using allozymes, skin colour and a putative sex-determination locus (SDL-2). In: Beaumont AR (ed.), *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*. Chapman and Hall, London, pp 502-508.
- Kitano T, Takamune K, Nagahama Y, Abe SI (2000) Aromatase inhibitor and 17 α -methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder(*Paralichthys olivaceous*). *Mol Reprod Dev* 56:1-5.
- Kwon JY, Haghpanah V, Kogson-Hurtado LM, McAndrew BJ, Penman DJ (2000) Masculinization of genetic female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation. *J Exp Zool* 287:46-53.
- Kwon JY, McAndrew BJ, Penman DJ (2001) Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mol Reprod Dev* 59:359-370.
- Kwon JY, McAndrew BJ, Penman DJ (2002) Treatment with an aromatase inhibitor suppresses high-temperature feminization of genetic male (YY) Nile tilapia. *J Fish*

- Biol 60:625-636.
- MacIntosh DJ, Little DC (1995) Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). In: Bromage NR, Roberts RJ (eds.), Broodstock Management and Egg and Larval Quality, Blackwell Science, New York, pp. 277-320.
- Mair GC, Abucay JS, Skibinski DOF, Abella TA, Beardmore JA (1997) Genetic manipulation of sex ratio for the large-scale production of all-male tilapia, *Oreochromis niloticus*. Can J Fish Aqua Sci 54:396-404.
- McAndrew BJ (1993) Sex control in tilapiines. In: Muir JF, Robert RJ(eds.), Recent advances in aquaculture IV, Blackwell Science, New York, pp. 87-98.
- Nakamura M, Nagahama Y (1985) Steroid producing cells during ovarian differentiation of the tilapia, *Sarotherodon niloticus*. Dev Growth Diff 27:701-708.
- Nakamura M, Nagahama Y (1989) Differentiation and development of leydig cells, and changes of testosterone levels during testicular differentiation in tilapia *Oreochromis niloticus*. Fish Physiol Biochem 7:211-219.
- Pérez N, Borja J (1992) Aromatase inhibitors: clinical pharmacology and therapeutic implications in breast cancer. J Int Med Res 20:303-312.
- Piferrer F, Zanuy S, Carrillo M, Solar II, Devlin RH, Donaldson EM (1994) Brief treatment with an aromatase inhibitor during sex differentiation causes chromosomally female salmon to develop as normal, functional males. J Exp Zool 270:255-262.
- Yamazaki F (1983) Sex control and manipulation in fish. Aquaculture 33:329-354.
- Yu NW, Hsu CY, Ku HH, Chang LT, Liu HW (1993) Gonadal differentiation and secretion of estradiol and testosterone of ovaries of *Rana catesbiana* tadpoles treated with 4-hydroxyandrostenedione. J Exp Zool 265: 252-257.