

LE DÉTERMINISME ENVIRONNEMENTAL DU SEXE CHEZ LES POISSONS GONOCHORIQUES.

Baroiller, J.F. ^{1,2}

1 CIRAD-EMVT, C/O CEMAGREF, BP 5095 34032 Montpellier

2 Laboratoire de Physiologie des Poissons, INRA, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes Cédex

Introduction

Afin d'optimiser la rentabilité d'élevage de nombreuses espèces de poissons, des populations monosexes sont souvent recherchées en aquaculture (voir revue de Guiguen et al., ⁱ). En pratique, un monosexage peut être obtenu directement par inversion hormonale, gynogenèse ou androgenèse, ou indirectement par création puis croisement de géniteurs homogamétiques: selon les espèces, des néo-mâles XX ou des femelles WW peuvent être ainsi produits afin de fournir des descendance monosexes femelles (XX ou WZ), tandis que des populations 100% mâles (XY ou ZZ) nécessitent la création et l'utilisation de mâles YY ou de néo-femelles ZZ (voir Chevassus *et al.*, ⁱⁱ et Baroiller et Jalabert, ^{iii, iv}).

Du fait de la législation en cours prohibant l'inversion hormonale, les approches proposées ou recherchées au niveau européen, reposent essentiellement sur la connaissance et la manipulation du déterminisme du sexe (méthodes indirectes) des espèces d'intérêt aquacole. Chez les poissons gonochoriques¹, l'existence d'un déterminisme génétique du sexe a été suggérée dès les années 1920, grâce à l'étude de la ségrégation de marqueurs colorés liés au sexe chez le guppy et le médaka (Schmidt, 5; Aida, 6), puis confirmée par la mise en évidence d'hétérochromosomes² chez la Gambusie, (Chen et Ebeling, 7). Néanmoins, du fait de leur faible différenciation morphologique, des chromosomes sexuels, n'ont ensuite été révélés que chez une faible proportion d'espèces (10% environ); chez les autres espèces, il est parfois possible, de déterminer indirectement le type d'homogamétie (XX/XY ou ZZ/ZW) en analysant le sexe-ratio de descendance gynogénétiques, androgénétiques, polyploïdes ou issues d'individus masculinisés ou féminisés par traitement hormonal (revue de Chourrout, 8). Pour l'ensemble des poissons gonochoriques, les systèmes d'homogamétie femelle XX/XY ou mâles ZZ/ZW semblent les plus représentés (Chourrout, 8). Cependant, chez certaines espèces, de tels déterminismes simples ne permettent pas d'expliquer tous les sexe-ratios observés expérimentalement, qui résulteraient, pour de nombreux auteurs, de l'existence de déterminants sexuels secondaires (voir revue de Chevassus, 9). Faute de marqueurs connus liés au sexe chez la plupart des espèces analysées (revue de Chourrout, 8), on ne peut généralement tester, l'hypothèse d'un déterminisme plus complexe. L'hypothèse d'une influence de facteurs de l'environnement sur la différenciation, et par conséquent sur le sexe-ratio, est généralement plus simple à tester. Bien qu'une telle influence des facteurs externes soit bien connue chez de nombreux reptiles (Pieau, 10), quelques amphibiens (revues de Dournon *et al.*, 11 et Hayes, 12), et que facteurs sociaux ou température déclenchent des changements de sexe chez quelques poissons hermaphrodites³, (Harrington, 13; Shapiro, 14;

1 Espèces à sexe séparé par opposition aux espèces hermaphrodites chez lesquelles l'ensemble ou une partie des individus pourra produire au cours de sa vie, les 2 types de gamètes, ovules et spermatozoïdes, soit de façon simultanée (H. synchrones), soit successivement (H. successifs).

2 Tous les chromosomes peuvent être associés par paires dans l'un des sexes, contrairement à l'autre, où il reste deux chromosomes non appariés, appelés hétérosomes et qui correspondent aux deux chromosomes sexuels du sexe alors appelé hétérogamétique, le mâle XY (femelle XX) ou la femelle WZ (mâle ZZ).

3 La mort ou le retrait de la femelle dominante chez des espèces protérogynes (statut femelle, puis mâle), induit un changement de sexe chez le plus grand mâle qui devient femelle et prend la place du dominant disparu ; le

Warner, 15), ce n'est que dans les années 1980 qu'un déterminisme environnemental (ESD pour Environmental Sex Determination) a été mis en évidence chez une espèce de poisson gonochorique, la capucette, *Menidia menidia* (Conover et Kynard, 16). Une thermosensibilité de la différenciation sexuelle a ensuite été mise en évidence chez un nombre grandissant d'autres espèces. Ce papier décrit les différents modèles de déterminisme environnemental rencontrés chez les espèces sensibles et leurs caractéristiques.

Facteurs de l'environnement influençant la différenciation

En préambule à cette analyse de l'influence des facteurs de l'environnement sur la différenciation, il importe de rappeler que de nombreuses études ont fait appel volontairement ou non, à des croisements consanguins; l'importance relative de cette consanguinité dans la sensibilité à des facteurs environnementaux, reste souvent difficile à appréhender (Chevassus, 9). Cependant, la consanguinité induit l'apparition de mâles spontanés XX, génétiquement femelles (fixation d'allèles masculinisants, rares et récessifs) chez la carpe commune (Komen *et al.*, 17) et la truite arc-en-ciel (Quillet, données non publiées); chez cette dernière, les basses températures inhiberaient l'expression de ces facteurs masculinisants.

Comme chez les Reptiles (Pieau, 10), la température apparaît, comme le facteur le plus efficace pour influencer le sexe-ratio; on parle alors de thermosensibilité de la différenciation ou TSD (Temperature Sex Determination). D'autres facteurs comme le pH, la salinité, la photopériode, ou les interactions sociales ont parfois fait l'objet d'analyses moins spécifiques, ne permettant généralement pas de conclure. Cependant, chez certaines espèces, le pH, seul ou à travers des interactions avec la température, influence fortement le sexe-ratio: chez le xipho, *Xiphophorus helleri*, des populations monosexes mâles ou majoritairement femelles, sont respectivement obtenues à un pH acide de 6,2 ou légèrement basique de 7,8 (Rubin, 18). Il en est de même chez un autre poecilidé, *Poecilia melanogaster* (Römer et Beisenherz, 19) ou chez 7 des 37 espèces d'Apistogramma (Cichlidés) étudiées chez lesquelles, la proportion de femelles augmente avec la diminution de l'acidité (Rubin, 18, Römer et Beisenherz, 19); ainsi chez *A. caetei*, des populations mixtes sont observées à pH très acide (53-60% mâles à pH 4.5-5.5), tandis qu'en conditions proches de la neutralité, les lots sont proches d'une population monosexue femelle (4 % de mâles à pH 6.5).

Les facteurs sociaux, jusqu'alors peu pris en compte chez les gonochoriques, peuvent eux-aussi modifier fortement le sexe-ratio chez certaines espèces: chez le poisson paradis, *Macropodus opercularis* (Francis, 20), l'isolement des individus favorise l'expression du sexe mâle (89% de mâles), tandis que le regroupement induit des proportions de femelles d'autant plus fortes que les densités sont élevées (66% de femelles à fortes densités).

Les différents types de TSD :

Chez les poissons, trois grands types de réponses à la température sont observées :

- chez la grande majorité des espèces identifiées comme thermosensibles, comme l'attipa, *Hoplosternum littorale* (Hostache *et al.*, 21), *Poeciliopsis lucida* (Schultz, 35) et *Poecilia melanogaster* (Römer et Beisenherz, 19), la proportion de mâles augmente avec la température (figure 1a). Chez les espèces de tilapias analysées, *O. niloticus* (Baroiller *et al.*, 22, 23), *O. aureus* (Desprez et Mélard, 24), et le Tilapia rouge Red Florida (Baroiller *et al.*, 25), hybride issu de 4 espèces, les faibles températures n'affectent pas le sexe-ratio.

phénomène inverse est retrouvé chez des espèces protandres (individus mâles puis femelles), où la disparition du mâle dominant déclenche un changement de sexe chez la plus grande femelle qui prend alors la place du mâle dominant disparu.

Au contraire, chez les Athérinidés, *Menidia menidia* (Conover et Kynard, 16 ; Conover et Heins, 26 ; Conover et Heins, 27, *Patagonina hatcheri* (Strüssmann *et al.*, 28), *Odonthestes bonariensis* (Strüssmann *et al.*, 29), et *O. argentinensis* (Strüssmann *et al.*, 29), les populations sont majoritairement femelles aux faibles températures. Enfin, si l'on excepte le cas d'*Odonthestes bonariensis*, aucune espèce ne présente contrairement à de nombreuses espèces de reptiles (Pieau, 10), une transition totale entre populations monosexes mâles et monosexes femelles obtenues aux températures extrêmes.

- chez 2 espèces seulement, l'augmentation de la température semble favoriser l'expression du sexe femelle (figure 1b). De fait, chez le bar, *Dicentrarchus labrax*, des populations monosexes mâles sont observées à basses températures (15°C), des proportions variables mais toujours inférieures à 27% de femelles n'étant obtenues que dans des conditions thermiques classiques d'élevage (24-25°C) (Blazquez *et al.*, 30). Chez un Siluriformes, les alevins du poisson-chat américain, *Ictalurus punctatus* sont féminisés à un moindre degré (63% de femelles à 34°C) par de fortes températures (Patino *et al.*, 31) ; à des températures faibles ou intermédiaires, les sexe-ratios ne sont pas affectés, et des populations mixtes (1 :1) sont obtenues.
- Enfin chez une seule espèce répertoriée à ce jour, la plie japonaise ou hirame, *Paralichthys olivaceus*, une courbe de réponse en U est constatée (Yamamoto, 32): des populations monosexes mâles sont produites aux 2 températures extrêmes, tandis qu'à des niveaux intermédiaires, les proportions correspondent à celles attendues d'après l'homogamétie femelle (XX/XY) de l'espèce (figure 1c) : sexe-ratio équilibré pour des populations génétiquement mixtes (XX et XY) ou populations 100% femelle pour des descendance génétiquement femelles (XX).

Période sensible

Chez les tilapias (Baroiller *et al.*, 22; Baroiller *et al.*, 23), les Athérinidés (Conover et Fleisher, 33; Strüssmann *et al.*, 28), et le bar (Blazquez *et al.*, 30), les traitements thermiques pour être efficaces, doivent débiter avant l'initiation de la différenciation histologique, et couvrir partiellement cette période critique. Chez ces espèces, et comme chez les reptiles, cette période correspond en général à la période hormono-sensible, durant laquelle un traitement d'inversion hormonale doit être appliqué pour être efficace (figure 2).

Interactions génotype/température

Les espèces chez lesquelles, une ESD a été démontrée présentent aussi bien un déterminisme génétique du sexe (GSD) simple de type homogamétie⁴ mâle ou femelle (tilapias⁵, poisson-chat américain⁶, hirame⁶) qu'un déterminisme plus complexe dans lequel des chromosomes sexuels ne peuvent être mis en évidence et basé sur quelques facteurs

4

une paire de chromosomes sexuels homologues chez le mâle (ZZ/ZW) ou la femelle (XX/XY)

5 XX/XY chez *O. niloticus*, et ZZ/ZW chez *O. aureus*

6 *Ictalurus punctatus* comme *P. olivaceus* présentent une homogamétie femelle XX/XY (Patino *et al.*, 31, Yamamoto, 32)

6

majeurs déterminants le sexe comme chez *Menidia menidia*.

Pour la plupart de ces 2 types d'espèces de poissons, des interactions entre le facteur environnemental et le génotype sont fortement suggérées, comme dans les exemples suivants :

- chez *Menidia menidia*, de fortes hétérogénéités dans les thermosensibilités apparaissent entre populations mais aussi à l'intérieur de ces différentes populations étudiées: chez la capucette, un dimorphisme de taille à maturité sexuelle est constaté chez les femelles issues de reproductions précoces à faibles températures (saison de croissance plus importante); la taille affectant favorablement la fécondité des femelles davantage que celle des mâles, les populations à différentes latitudes compensent les différences de températures et de saison en ajustant l'intensité de leur réponse à la température, et donc leur niveau de TSD. Les populations du Sud bénéficiant d'une longue saison de reproduction (et donc de croissance), présentent une forte réponse à la température et produisent majoritairement des femelles, les populations du Nord où la saison de reproduction est courte, sont peu ou pas thermosensible (Conover et Heins, 26, 27; Lagomarsino et Conover, 34). Par ailleurs, à l'intérieur d'une même famille, de fortes hétérogénéités de réponse à une même modification de température sont constatées (Conover et Heins, 26).
- Chez *O. niloticus*, à l'intérieur d'une même souche, les descendance génétiquement femelles les plus sensibles issues de néomâles XX, produisent respectivement 98% de mâles à fortes températures (36°C) et 100% de femelles dans les conditions thermiques optimales (28°C) de l'espèce (Baroiller et al., 23) ; à l'inverse, certaines descendance issues de néomâles de la même fratrie, restent parfaitement insensibles (4% de mâles à 28°C / 5% à 36°C) ; il en est de même dans des descendance de mâles génétiques XY (figure 3), les proportions de mâles augmentant de 18 à 44% (Baroiller et al., 22).

Enfin, des effets parentaux sont suggérés (Baroiller, Clota, données non publiées), une même femelle croisée avec 2 mâles différents, produisant deux descendance respectivement très sensible et insensible (100% et 36 % de mâles à 36°C). Des résultats similaires sont obtenues avec les descendance de 2 femelles reproduites avec un même mâle (36 % et 85 % de mâles à 36°C).

- Au contraire, chez, *O. aureus*, une autre espèce de tilapia, les interactions température/génotype semblent peu marquées, les fortes températures induisant systématiquement la production de descendance 100% ou majoritairement (95-96%) mâles (Desprez et Mélard, 24).
- chez *Poeciliopsis lucida*, une seule des deux lignées homozygotes créées s'avère sensible à la température ; l'analyse de la ségrégation du caractère thermosensible dans les croisements entre ces deux lignées met en évidence son caractère dominant (Schultz, 35).

Démonstration génétique de l'inversion par la température

Comme chez les amphibiens (Dournon et al., 11), l'inversion du sexe par la température, a été démontrée chez un tilapia, *Oreochromis niloticus*, en testant en conditions contrôlées, des mâles issus de traitements masculinisants et leurs témoins (Baroiller *et al.*, 22, 23). Les mâles témoins XY donnent des sexe-ratios équilibrés (1 :1), tandis que la moitié environ des mâles issus de traitements thermiques fournissent des descendance monosexes ou presque 100% femelles. De telles proportions ne peuvent résulter que de croisements XX x XX, démontrant ainsi, la masculinisation fonctionnelle de femelles génétiques XX par la température. De tels individus sont alors parfois appelés des thermo-néomâles.

Mécanismes impliqués dans la thermosensibilité

Chez les poissons, les stéroïdes sexuels, sont probablement impliqués dans les processus de la différenciation gonadique du sexe: si le rôle physiologique des androgènes dans la différenciation testiculaire reste encore à préciser (Baroiller *et al.*, 36), en revanche, l'aromatase, qui permet la transformation des androgènes en oestrogènes, est une enzyme clef pour la différenciation ovarienne (Guiguen *et al.*, 37).

Chez les reptiles, l'implication de l'aromatase dans la différenciation femelle est également démontrée et chez les espèces thermosensibles, la température pourrait agir directement ou indirectement sur la régulation de la transcription du gène de cette enzyme (revue de Pieau, 10).

Chez les poissons, la température pourrait également moduler la transcription ou l'activité d'enzymes de la stéroïdogenèse ovarienne et/ou testiculaire, ou la réceptivité des gonades voire agir plus en amont de la cascade du déterminisme du sexe. Enfin, plus récemment chez les reptiles, comme chez les poissons, d'autres investigations sont également menées sur le rôle du système nerveux central dans la différenciation induite ou non par la température.

Conclusions

Les travaux réalisés depuis la mise évidence d'une thermosensibilité chez *Menidia menidia* (Conover et Kynard, 16), démontrent clairement que des ESD sont beaucoup plus répandues chez les poisson que ce que l'on pensait initialement. Chez de nombreuses espèces, une ESD pourrait expliquer des déviations de sexe-ratios. Chez les quelques espèces, pour lesquelles plusieurs facteurs de l'environnement ont été analysés, la sensibilité est souvent spécifique à un seul d'entre eux : ainsi, par exemple, *M. menidia*, n'est pas sensible à la salinité ou la photopériode.

Les caractéristiques de réponse à la température des poissons thermosensibles diffèrent fortement de celles des Reptiles à TSD. Chez ces derniers, des populations mixtes ne peuvent généralement être obtenues que dans une étroite fenêtre thermique, parfois inférieure à un degré Celsius; par ailleurs, des populations monosexes mâles ou femelles sont obtenues aux 2 températures extrêmes chez la majorité de ces espèces (Pieau, 10). Chez les poissons, si l'on excepte, *Odonthestes bonariensis*, pour lequel des lots 100% mâles ou femelles peuvent être également obtenus aux températures extrêmes, et *Paralichthys olivaceus* qui semble répondre à la température selon un modèle à 2 seuils proche de celui de certains reptiles, l'effet de la température sur le sexe-ratio n'est pas du type "tout ou rien", mais au contraire, beaucoup plus progressif. Enfin, des populations monosexes sont rarement produites.

D'un point de vue plus pratique, l'influence des facteurs externes sur la différenciation, suggère de nouvelles approches pour le contrôle du sexe. Par ailleurs, dans une même optique, il importe de mieux caractériser les interactions entre facteurs externes et génotype, afin de pouvoir les prendre en compte, lors de la mise en place d'approches génétiques du monosexage, chez les espèces sensibles.

Bibliographie

- 1 Guiguen, Y., Baroiller, J.F., Jalabert, B., et A., Fostier., 1996. Le contrôle du sexe phénotypique chez les poissons. La Pisciculture Française, 124: 16-19.
- ii 2. Chevassus, B., Chourrout D., Jalabert, B., 1979. Le contrôle de la reproduction chez les poissons. I. Les populations "monosexes". Bull. Fr. Piscic., 274, 18-31.
3. Baroiller, J.F. and Jalabert, B., 1989. Contribution of research in reproductive physiology to the culture of tilapias. Aquat. Living Resour. 2: 105-116.
4. Baroiller, J.F. et Jalabert, B., 1990. Physiologie de la reproduction des Tilapias: Bilan des connaissances et perspectives de recherche d'intérêt appliqué. In "L'Aquaculture des tilapias du développement à la recherche" (J. Lazard, B. Jalabert et T. Doudet, eds). Cahiers scientifiques du CTFT, 10: 39-62.
5. Schmidt, J., 1919. Racial investigations III. Experiments with *Lebistes reticulatus* (Peters). C.R. Lab. Carlsberg, 14, 1-8.
6. Aida, T., 1921. On the inheritance of color in a fresh-water fish *Aplocheilus latipes* Temminck and Schlegel, with special reference to the sex-linked inheritance. Genetics, 6, 554-573.
7. Chen, T. R., Ebeling, A. W., 1968. Karyological evidence of femal heterogamety in the mosquitofish *Gambusia affinis*. Copeia, 1968, 70-75.
8. Chourrout, D., 1988b. Revue sur le déterminisme génétique du sexe des poissons téléostéens. Bull. Soc. Zool. Fr., 113, 123-144.
9. Chevassus, B., 1998. Modification du phénotype sexuel et du mode de reproduction chez les poissons salmonidés : inversion sexuelle hormonale, gynogenèse, hybridation interspécifique et polyploïdisation. Doctorat en Sciences de l'Université Paris XI Orsay, 162 pp.
10. Pieau, C., 1996. Temperature variation and sex determination in reptiles. BioEssays, 18 : 19-26.
11. Dournon, C., Houillon, C., Pieau, C., 1990. Temperature sex-reversal in Amphibians and Reptiles. Int. J. Dev. Biol., 34, 81-92.
12. Hayes, T., 1998. Sex determination and primary sex differentiation in amphibians : genetic and developmental mechanisms. J. Exp. Zool., 281 : 373-399.
13. Harrington, R. W. Jr., 1971. How ecological and genetic factors interact to determine when self-fertilizing hermaphrodites of *Rivulus marmoratus* change into functional secondary males, with a reappraisal of the modes of intersexuality among fishes. Copeia, 1971, 389-432.
14. Shapiro, D. Y., 1990. Sex-changing fish as a manipulable system for the study of the determination, differentiation, and stability of sex in vertebrates. J. Exp. Zool. (Sup.), 4S, 132-136.
15. Warner, R.R., 1984. Mating behavior and hermaphroditism in coral reef fishes. Amer. Scientist, 72 : 128-136.
16. Conover, D. O., Kynard, B. E., 1981. Environmental sex determination: interaction of temperature and genotype in a fish. Science, 213, 577-579.
17. Komen, J., De Boer, P., Richter, C. J. J., 1992. Male sex reversal in gynogenetic XX females of common carp (*Cyprinus carpio* L.) by a recessive mutation in a sex determining gene. J. Hered., 83, 431-434.
18. Rubin, D. A., 1985. Effect of pH on sex ratio in cichlids and a poeciliid (Teleostei). Copeia, 1985, 233-235.
19. Römer, U., Beisenherz, W., 1996. Environmental determination of sex in *Apistogramma* (Cichlidae) and two other freshwater fishes (Teleostei). J. Fish Biol., 48, 714-725.
20. Francis, R. C., 1984. The effects of bidirectional selection for social dominance on agonistic behaviour and sex ratios in the paradise fish, (*Macropodus opercularis*). Behaviour, 90, 25-45.
21. Hostache, G., Pascal, M. et Tessier, C., 1995. Influence de la température d'incubation sur le rapport mâle : femelle chez l'atipa, *Hoplosternum littorale* Hancock (1828). Can. J. Zool. 73 : 1239-1246.
22. Baroiller, J.F., Chourrout, D., Fostier, A., and Jalabert, B. 1995a. Temperature and sex chromosomes govern sex ratios of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. J. Exp. Zool., 273: 216-223.
23. Baroiller, J.F., Fostier, A., Cauty, C., Rognon, X. and Jalabert, B., 1996. Significant effects of high temperatures on sex-ratio of progenies from *Oreochromis niloticus* with sibling sex-reversed males broodstock. In R.S.V. Pullin, J. Lazard, M. Legendre, J.B. Amon Kothias and D. Pauly (eds). "Third International Symposium on Tilapia in Aquaculture". ICLARM Conf. Proc. 41. 11-16 Nov 1991, Abidjan, Côte d'Ivoire. pp. 333-343.
24. Desprez, D., and Mélard, C., Effect of ambient water temperature on sex determinism in the blue tilapia, *Oreochromis aureus*. Aquaculture, 162 : 79-84.
25. Baroiller, J.F., Clota, F. and Geraz, E. 1995b. Temperature sex determination in two tilapias species, *Oreochromis niloticus* and the red tilapia (Red Florida strain): effect of high or low temperatures, 1996. In "Proceedings of the 5th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish". The University of Texas at Austin, Austin, Texas, USA, 2-8 July, 1995, F.W. Goetz and P. Thomas, eds. pp. 158-160.
26. Conover, D. O., Heins, S. W., 1987a. The environmental and genetic components of sex-ratio in *Menidia menidia* (Pisces: Atherinidae). Copeia, 1987, 732-743.
27. Conover, D.O., and Heins, 1987b. Adaptive variation in environmental and genetic sex determination in a fish. Nature, Vol. 326, 6112: 496-498.
28. Strüssmann, C.A., Calsina Cota, J.C., Phonlor, G. Higuchi, H., and Takashima, F., 1996. Temperature effects on

- sex differentiation of two South American atherinids, *Odontesthes argentinensis* and *Patagonina hatcheri*. Environmental Biology of Fishes, 47: 143-154.
29. Strüssmann, C.A., Saito, T., Usui, M., Yamada, H., and Takashima, F., 1997. Thermal Thresholds and critical period of thermolabile sex determination in two Atherinid fishes, *Odontesthes bonariensis* and *Patagonina hatcheri*. Journal of Experimental Zoology., 278: 167-177.
 30. Blazquez, M., Zanuy, S., Carillo, M., and Piferrer, F., 1998. Effects of rearing temperature on sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). J. Exp. Zool., 281 : 207-216.
 31. Patino, R., Davis, K.B., Schoore, J.E., Uguz, C., Strüssmann, C.A., Parker, N.C., Simco, B.A., and Goudie, C.A., 1996. Sex differentiation of channel catfish gonads : normal development and effects of temperature. J. Exp. Zool., 276 : 209-218.
 32. Yamamoto, E., 1995. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in Hiramé Flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). Bull. Tottori Pref. Fish. Exp. Stn., 34, 1-145. (in japanese with an english summary)
 33. Conover, D.O., and Fleisher, M.H., 1986. Temperature sensitive period of sex determination in the atlantic silverside, *Menidia menidia*. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 43: 514-520.
 34. Lagomarsino I. V., and Conover, D. O., 1993. Variation in environmental and genotypic sex-determining mechanisms across a latitudinal gradient in the fish, *Menidia menidia*. Evolution, 47, 487-494.
 35. Schultz, R. J., 1993. Genetic regulation of temperature-mediated sex ratios in the livebearing fish *Poeciliopsis lucida*. Copeia, 1993, 1148-1151.
 36. Baroiller, J.F., Guiguen, Y., Iseki, K., and Fostier, A., 1998. Physiological role of androgens on gonadal sex differentiation in two teleost fish, *Oncorhynchus mykiss* and *Oreochromis niloticus*. J. Exp. Zool., 281 : 506-507.
 37. Guiguen, Y., Ricordel, M.J. and Fostier, A., 1998. Involvement of Estrogens in the process of sex differentiation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) : in vivo treatments, aromatase activity, and aromatase gene expression. J. Exp. Zool, 281: 506.