

壬基酚(NP)对罗氏沼虾幼虾生长和性别分化的影响

朱春华, 薛海波, 李郁娇, 黄国钟, 刘易洋, 李广丽*

(广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025)

摘要: 采用外部形态观察和性腺组织学连续切片方法, 确定罗氏沼虾幼虾的性别分化时期, 并探讨壬基酚(NP)对罗氏沼虾幼虾(体长约1.5 cm)生长和性别分化的影响。结果表明, 罗氏沼虾仔虾后15 d出现生殖原基; 仔虾后24 d, 部分仔虾第四至第五步足基部明显凹陷, 腹甲出现皱折和突起, 并出现生殖管; 仔虾后45 d, 部分仔虾第二游泳足内侧出现雄性附肢, 性腺明显区分为精巢和卵巢。处理时间短于15 d, NP对罗氏沼虾幼虾生长无显著影响; 但处理超过20 d, NP以明显的剂量依存关系显著抑制罗氏沼虾体长和体重($P < 0.05$)。实验结束时(30 d), 对照组个体均已完成性别分化, 精巢和卵巢内分别出现大量精原细胞和卵原细胞, 但NP处理组无法鉴定性别的幼虾比例随NP剂量增加而增加。研究表明, 罗氏沼虾幼虾外部性征出现略早于内部性征的分化, 早期性别分化发生在仔虾变态后21~45 d; 此外, NP可能通过干扰蜕皮及卵黄蛋白原合成从而抑制罗氏沼虾幼虾生长和精巢发育。

关键词: 罗氏沼虾; 幼虾; 生长发育; 性别分化

中图分类号: Q 418; S 917

文献标识码: A

环境内分泌干扰物(environmental endocrine disrupting chemicals, EDCs)亦称环境激素(environmental hormones), 是一类严重干扰机体生长发育过程的外源性化合物。EDCs主要通过生物摄入和积累等途径对生物的内分泌系统等, 尤其是生殖系统造成严重影响, 干扰体内多种激素的产生、释放、转移、代谢、结合、反应和消除, 在生物或其后代中引起不良的效应或内分泌功能的改变^[1]。目前已被确认的EDCs约70多种, 包括天然和人工合成的化学品。大多数EDCs具有难分解和强蓄积的特性, 当它们在水体中积累到一定程度时就会对水体—水生生物系统产生严重危害, 并通过食物链直接或间接地影响人类健康。

壬基酚(nonyphenol, NP)是壬基酚聚氧乙烯醚进入水体环境后经生物降解生成的主要代谢产物, 具有疏水性、脂溶性、难降解性和生物累积性等特点^[1], 因被广泛应用于各种清洁剂和塑料的添加剂而成为水环境中广泛分布的EDCs。研究

表明, NP不但对生物具有明显的急性毒性^[2], 而且还具有明显的雌激素效应^[3], 在雄性后代数量不变时可增加水蚤(*Daphnia magna*)雌性后代的数量^[4], 并使日本青鳉(*Oryzias latipes*)睾丸组织纤维化^[5]。此外, NP还明显提高罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)肝胰腺和卵巢中卵黄蛋白原基因的表达^[6], 并影响生物体生长^[7]、免疫^[8]和循环^[9]等机能。

有关甲壳类性别分化的研究国内外已有一些报道。WU等^[10]以及康现江等^[11]曾系统论述了甲壳动物的性别决定机理以及外界因素对性别分化及性逆转的影响; 李富花等^[12]、林琼武等^[13]和赵光凤等^[14]分别确定了中国对虾(*Penaeus chinensis*)、锯缘青蟹(*Scylla serrata*)和凡纳滨对虾(*Penaeus vannamei*)的早期性别分化时期, 吴萍等^[15]研究了中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)后期的性别分化过程。对南方主要养殖品种罗氏沼虾的研究, 目前多集中于生物学及养殖技术等方面, 有关其性别分化的研究很少有报道。

收稿日期:2010-12-14 修回日期:2010-12-29

资助项目:广东省科技攻关项目(2008B020800006);广东省自然科学基金(8152408801000024)

通讯作者:李广丽, E-mail: ligl@gdou.edu.cn

本研究拟通过外部形态测量和组织学观察等手段,确定罗氏沼虾性别分化时期,并探讨 NP 对罗氏沼虾幼虾生长和性别分化的影响。研究结果可为罗氏沼虾性别控制及养殖水环境保护提供理论依据,并可为环境内分泌干扰物的生态毒理学研究提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 材料

罗氏沼虾幼虾购自广东湛江广华虾苗场生产的同步发育的健康个体,体长约 1.5 cm。幼虾经水泥池中驯养 5 d 后,移至 0.5 m³ 聚乙烯塑料桶中进行实验。实验水温控制在 24~30℃,自然光照,每天投饵 2 次,定时吸污。壬基酚为 Fluka 公司产品。

1.2 罗氏沼虾性别分化时期的确定

罗氏沼虾蚤状幼体变态为仔虾后第 3 天开始取样,每 3 天一次,至外观可区分雌雄。每次随机取 30 尾并测量体长,其中 10 尾以 5% 的戊二醛固定,解剖镜下观察其外部形态。常规石蜡切片, H. E 染色,显微观察并拍照。

1.3 壬基酚对罗氏沼虾幼虾生长的影响

NP 的本底浓度为 0.01~0.06 μg/L。实验设定 5 组, NP 浓度分别为 0、5、15、45 和 135 μg/L, 每组 3 个平行, 每个平行放养罗氏沼虾幼虾 200 尾。NP 共暴露 30 d, 每 2 天更换 50% 水体以确保 NP 浓度稳定。处理后第 15、20、25 和 30 天分别测量罗氏沼虾体长和体重。

1.4 性别鉴定及性腺组织学检查

NP 暴露 30 d 后, 每组随机抽取 30 尾罗氏沼虾, 依据其外部特征(生殖孔、雄性附肢等)解剖镜下鉴定性别。同时 10 尾样品经 Bouin 氏液固定, 常规石蜡切片, H. E 染色后进行性腺组织学观察并拍照。

1.5 数据处理

采用 SPSS 13.0 软件进行单因子方差分析。实验结果以平均值 ± 标准差 (mean ± SD) 表示, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 罗氏沼虾早期性别分化时期

外部形态的观察 仔虾后 21 d (体长约 1.5 cm) 第五步足基部无凹陷, 未发现皱折和

突起。

仔虾后 24 d (体长约为 1.6 cm), 第四至第五步足基部出现两种形态, 一种基部凹陷明显, 腹甲出现皱折和突起 (图版-1); 另一种基部无凹陷且腹甲未出现皱折。

仔虾后 45 d (体长约为 2.5 cm), 第二游泳足内附肢结构出现两种情况: 一种内附肢侧面出现细棒状带刺小突起 (图版-2), 即雄性附肢 (appendix masculine) 的雏形, 另一种内附肢内侧光滑。

性腺组织学观察 仔虾后 15 d (体长约为 1.2 cm), 肝胰脏的背面出现强嗜碱性、由疏松的未分化细胞组成的细胞团。细胞个体较小, 长椭圆形, 细胞核不明显 (图版-3), 可确定为生殖原基。

仔虾后 21 d (体长约为 1.5 cm), 生殖细胞进一步增多, 纵切面的整体形状较细长, 呈带状 (图版-4)。

仔虾后 24 d (体长约为 1.6 cm), 肝胰脏背面的生殖腺增厚, 细胞排列紧密, 大多数为圆形和椭圆形细胞, 少数近长柱形细胞 (图版-5)。在头胸甲腹部近步足区域切片发现生殖管, 生殖管由上皮、基膜及结缔组织组成, 管腔明显, 可看到纵行皱襞, 上皮细胞核椭圆形, 核仁明显 (图版-6)。

仔虾后 35 d (体长约为 2.0 cm), 生殖腺位于心脏前部, 肝胰脏背部。生殖腺进一步发育, 变长增粗, 细胞出现多种形态。这些细胞染色较浅, 体积约是周围细胞的 3~4 倍, 细胞核大、圆、嗜碱性 (图版-7)。

仔虾后 45 d (体长约为 2.5 cm), 性腺可明显区分为精巢 (testis) 和卵巢 (ovary)。精巢由精原细胞外包中胚层细胞的许多小团组成, 纵切面可见细胞核棒状、椭圆形或圆形; 卵巢中卵原细胞排列在中间, 外包滤泡细胞及排列疏松的结缔组织 (图版-8)。

2.2 壬基酚对罗氏沼虾幼虾生长的影响

经浓度为 5、15、45 和 135 μg/L 的 NP 暴露 15 d, 罗氏沼虾幼虾体长和体重与对照组相比无明显差异; 处理超过 20 d, 各 NP 处理组幼虾体长和体重均明显低于对照组 ($P < 0.05$), 且 NP 对生长的抑制效果呈现明显的剂量依存关系 ($P < 0.05$) (图 1, 图 2)。

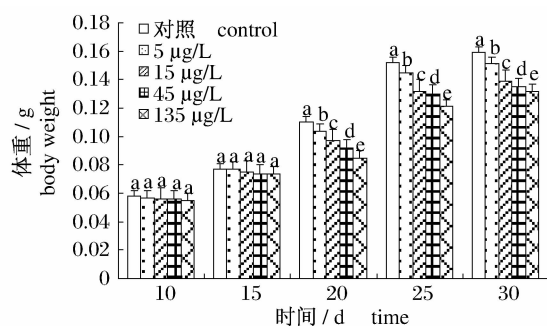


图1 NP对罗氏沼虾幼虾体重的影响

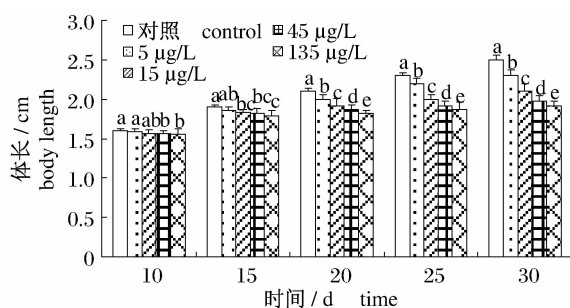
Fig. 1 Body weight of juvenile *M. rosenbergii* exposed to NP

图2 NP对罗氏沼虾幼虾体长的影响

Fig. 2 Body length of juvenile *M. rosenbergii* exposed to NP

2.3 壬基酚对罗氏沼虾幼虾性别分化的影响

NP处理持续30 d,对照组雌雄性比约1:1,性腺为正常卵巢和精巢组织,卵原细胞和精原细胞清晰可见。各浓度NP处理组雌性幼虾比例均占群体数量的50%左右,但各组均有一定比例的幼虾性腺尚处于未分化状态,且性腺未分化比例随处理剂量增加而增加。当NP浓度为135 µg/L时,无法鉴定雌雄的幼虾比例高达12.36%(图3)。实验期间未发现间性性腺。

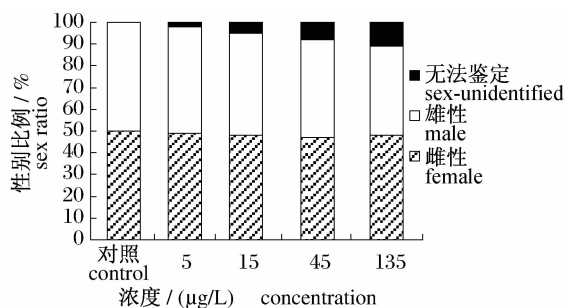


图3 NP对罗氏沼虾幼虾性别比例的影响

Fig. 3 Sex ratio of juvenile *M. rosenbergii* exposed to NP

3 讨论

很多研究表明,生殖管的出现可能是甲壳动物内部性征分化的第一特征^[14,16-17]。如在大眼幼体期即可从生殖管的不同定向来区分日本绒螯蟹雌雄^[16];日本对虾在变为仔虾后第20天开始出现生殖管,但第60天生殖腺才开始分化^[17];凡纳滨对虾在仔虾后第43天可观察到生殖管,仔虾后第55天生殖腺才开始分化^[14]。本研究发现,罗氏沼虾仔虾变态后24 d已见生殖管,仔虾后第45天生殖腺可明显区分雌雄,表明罗氏沼虾内部性征分化的时间开始或早于24 d,且甲壳动物内部性别分化出现的时间存在种类差异。外部形态观察表明,仔虾后21 d所有罗氏沼虾第五步足基部未见凹陷,但仔虾后24 d部分幼虾第四至第五步足基部出现差异,且仔虾后45 d部分幼虾的内附肢侧面出现雄性附肢雏形。综合外部形态及组织学检测结果可以推测,罗氏沼虾仔虾自生殖腺原基出现,到生殖腺能明显区分雌雄生殖细胞,其早期性别分化时期发生在仔虾后21~45 d,且外部性征出现略早于内部性征的分化,这与李富花等^[12]对中国对虾以及NAKAMURA^[17]对日本对虾的研究结果相一致。

李富花等^[12]认为,对虾外部性征的分化可以通过3个方面来体现,即生殖孔的出现、雄性附肢以及交接器的形成,且3个外部性征开始出现分化的时间不同。扫描电镜和组织切片观察表明,中国对虾腹甲后锥的形态分化发生于仔虾后第35天^[12];而凡纳滨对虾仔虾发育过程中腹甲未发生明显变化,但仔虾后第37天,部分仔虾第二腹肢内肢基节内侧部位出现明显突起^[14]。本研究发现,罗氏沼虾仔虾后24 d部分个体的第四至第五步足基部之间的腹甲出现皱折和突起,但未发现锥体状结构,至仔虾后45 d第二腹肢内肢上才出现雄性附肢雏形,表明不同种类外部性征开始出现分化的部位和时间不同。

很多研究发现,EDCs对甲壳动物的生长发育具有抑制效应。BROWN等^[7]研究发现螺赢蜚(*Corophium volutator*)暴露于10~200 mg/L的NP中30 d,未发现生长抑制效应,但持续暴露100 d,其体长增长显著减慢。本研究中,当处理时间短于15 d,NP对罗氏沼虾幼虾生长无显著影响,但处理超过20 d,5 µg/L以上浓度的NP即可

抑制罗氏沼虾幼虾生长,且这种对体长和体重的抑制作用呈现明显的剂量依存关系,并与 NP 暴露时间相关。已知甲壳动物的生长和发育必须以蜕去坚硬的外骨骼为前提,而蜕皮除了主要受蜕皮激素的直接调控外,还受 X 器官-腺复合体产生的神经肽激素的间接调控。蜕皮的开始是以真皮与几丁质表皮的分层为标志,而壳二糖酶为几丁质表皮溶解脱落所必需^[18]。研究表明,壳二糖酶活性与血淋巴中蜕皮激素密切相关,对大型蚤的研究表明, NP 对蜕皮激素受体(EcR)可产生拮抗作用^[19]。据此推测, NP 对罗氏沼虾幼虾生长的抑制效应可能来自于 NP 对 Y 器官-蜕皮激素受体轴的干扰,导致罗氏沼虾蜕皮频率或壳二糖酶活性降低,使蜕皮过程延长。本实验中未检测壳二糖酶活性和统计蜕皮频率,因此推测是否正确,尚需进一步实验论证。

许多化合物通过干扰脊椎和无脊椎动物的内分泌系统而表现出对生殖和蜕皮过程的损伤以及对子代性别发育过程的干扰等毒性效应^[20]。SHURIN 等^[21]研究发现水蚤暴露于 50 和 100 $\mu\text{g/L}$ 的 NP 中可增加雌性后代数量,但雄性后代的量保持不变。刘征涛等^[22]发现 4-NP 暴露下雄性蚤在新生幼蚤中的比例为 37.9%。本研究发现,各浓度 NP 处理组雌性幼虾比例与对照组持平,但随 NP 处理剂量增加,性腺尚处于未分化状态的幼虾比例增加,表现为 NP 对雄性发育产生抑制作用,且这种抑制效果存在剂量依存关系。对鱼类的研究也发现, NP 不一定导致性别比例的失衡,但可抑制沙塘鳢^[23]精巢的生长和发育,高浓度 NP 还可导致沙塘鳢和斑马鱼^[24]精巢纤维化。可以认为, NP 作用下性腺处于未分化状态的幼虾比例增加主要是由于 NP 诱导机体合成大量的卵黄蛋白原(VTG),因此原本用以性腺发育的能量很大程度上转向合成 VTG,导致用于性腺发育的能量减少,最终出现精巢发育过程滞后现象。现有的研究资料也为这种假设提供了相关的证据,如吴楠等^[6]发现 NP 可显著提高罗氏沼虾肝胰腺和卵巢中卵黄蛋白原基因的表达。

综上所述,罗氏沼虾早期性别分化发生在仔虾变态后 21~45 d,且幼虾外部性征出现略早于内部性征分化;此外, NP 对罗氏沼虾生长和精巢发育的抑制作用可能与其干扰蜕皮及卵黄蛋白原合成有关。

参考文献:

- [1] KAVLOCK R J, DEROSA G P. Research needs for risk assessment of health and environmental effect of endocrine disruptors: A report of the U. S. EPA-sponsored workshop [J]. Environ Health Perspectives, 1996, 104: 715-740.
- [2] SCHWAIGER J, SPIESER O H, BAUER C, et al. Chronic toxicity of nonylphenol and ethinylestradiol: haematological and histopathological effects in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Aquatic Toxicology, 2000, 51: 69-78.
- [3] VAN DEN BELT K, BERCHMANS P, VANGENECHTEN C, et al. Comparative study on in vitro and in vivo estrogenic potencies of 17 β -estradiol, estrone, 17-ethinylestradiol and nonylphenol [J]. Aquatic Toxicology, 2004, 66: 183-195.
- [4] ZOU E, FINGERMAN M. Synthetic estrogenic agents do not interfere with sex differentiation but do inhibit molting of a cladoceran, *Daphnia magna* [J]. Bull Environ Contam Toxicol, 1997, 58: 596-602.
- [5] GRAY M A, METCALFE C D. Induction of testis-ova in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to p-nonylphenol [J]. Environ Toxicol Chem, 1997, 16: 1082-1086.
- [6] 吴楠, 张毅, 李惠云, 等. 壬基酚和雌二醇干扰罗氏沼虾卵黄蛋白原 VTG 基因表达的效应 [J]. 动物学杂志, 2007, 42(4): 1-7.
- [7] BROWN R J M, CONRADI, DEPLEDGE M H. Long-term exposure to 4-nonylphenol affects sexual differentiation and growth of the amphipod *Corophium volutator* (Pallas, 1766) [J]. Sci Total Environ, 1999, 233: 77-88.
- [8] YOU H J, CHOI C Y, JEON Y J, et al. Suppression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor α expression by 4-nonylphenol in macrophages [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 294: 753-759.
- [9] SCHWAIGER J, SPIESER O H, BAUER C, et al. Chronic toxicity of nonylphenol and ethinylestradiol: haematological and histopathological effects in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Aquatic Toxicology, 2000, 51: 69-78.
- [10] WU C G, XIANG J H. Genetic determination and exogenous influence in sex differentiation in crustacean [J]. Developmental & Reproductive Biology, 2002, 11(2): 88-94.
- [11] 康现江, 王所安. 高等甲壳动物性别决定机制及其性逆转 [J]. 动物学杂志, 1998, 33(3): 43-46.
- [12] 李富花, 相建海. 中国对虾早期性别分化研究 [J].

- 海洋科学集刊,2002,44:101-105.
- [13] 林琼武,李少菁,王桂忠. 锯缘青蟹幼体性别分化的解剖学及组织学实验研究[J]. 台湾海峡,1994,3(13):284-289.
- [14] 赵光凤,李广丽,朱春华. 凡纳滨对虾性别分化的初步研究[J]. 广东海洋大学学报,2009,29(3):19-23.
- [15] 吴萍,楼允东,邱高峰. 中华绒螯蟹性腺发育的形态学、组织学和组织化学变化[J]. 上海水产大学学报,2003,12(2):106-112.
- [16] LEE T H, YARNAUCHI M, YAMAZAKI F. Sex differentiation in the crab *Eriocheir japonicus* (Decapoda, Grapsidae) [J]. *Invert Reprod Develop*, 1994,25:123-138.
- [17] NAKAMURA K. Differentiation of genital organs and androgenic gland in the kuruma prawn *Penaeus japonicus* [J]. *Mem Fac Fish Kagoshima Univ*, 1992,41:87-94.
- [18] ZOU E, FINGERMAN M. Effects of estrogenic agents on chitinase activity in the epidermis and hepatopancreas of the fiddler crab [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*,1999,42(2):185-190.
- [19] DINAN L, BOURNE P, WHITING P, *et al.* Screening of environmental of contaminants for ecdysteroid agonist and antagonist activity using the *Drosophila melanogaster* B II cell *in vitro* assay [J]. *Environ Toxicol Chem*,2001,20:2038-2046.
- [20] LEBLANC G A. Steroid hormone-regulated processes in invertebrates and their susceptibility to environmental endocrine disruption [M] // GUILLETE L J, eds. *Environmental endocrine disrupters: An evolutionary perspective*. London: Taylor & Francis,1998.
- [21] SHURIN J,DODSON S I. Sublethal toxic effects of cyanobacteria and nonylphenol on environmental sex determination and development in *Daphnia* [J]. *Environ Toxicol Chem*,1997,16(6):1269-1276.
- [22] 刘征涛,张颖,徐镜波,等. 烷基酚类的生殖干扰毒性与结构相关研究[J]. 环境科学研究,2002,15(6):39-41.
- [23] 李祥军,周忠良,顾建华. 壬基酚对河川沙塘鳢性腺分化和发育影响的研究[J]. 水产科学,2009,28(1):15-19.
- [24] HILL R L, JANZ D M. Developmental estrogenic exposure in zebrafish(*Danio rerio*):I. Effects on sex ratio and breeding success[J]. *Aquatic Toxicology*, 2003(63):417-429.

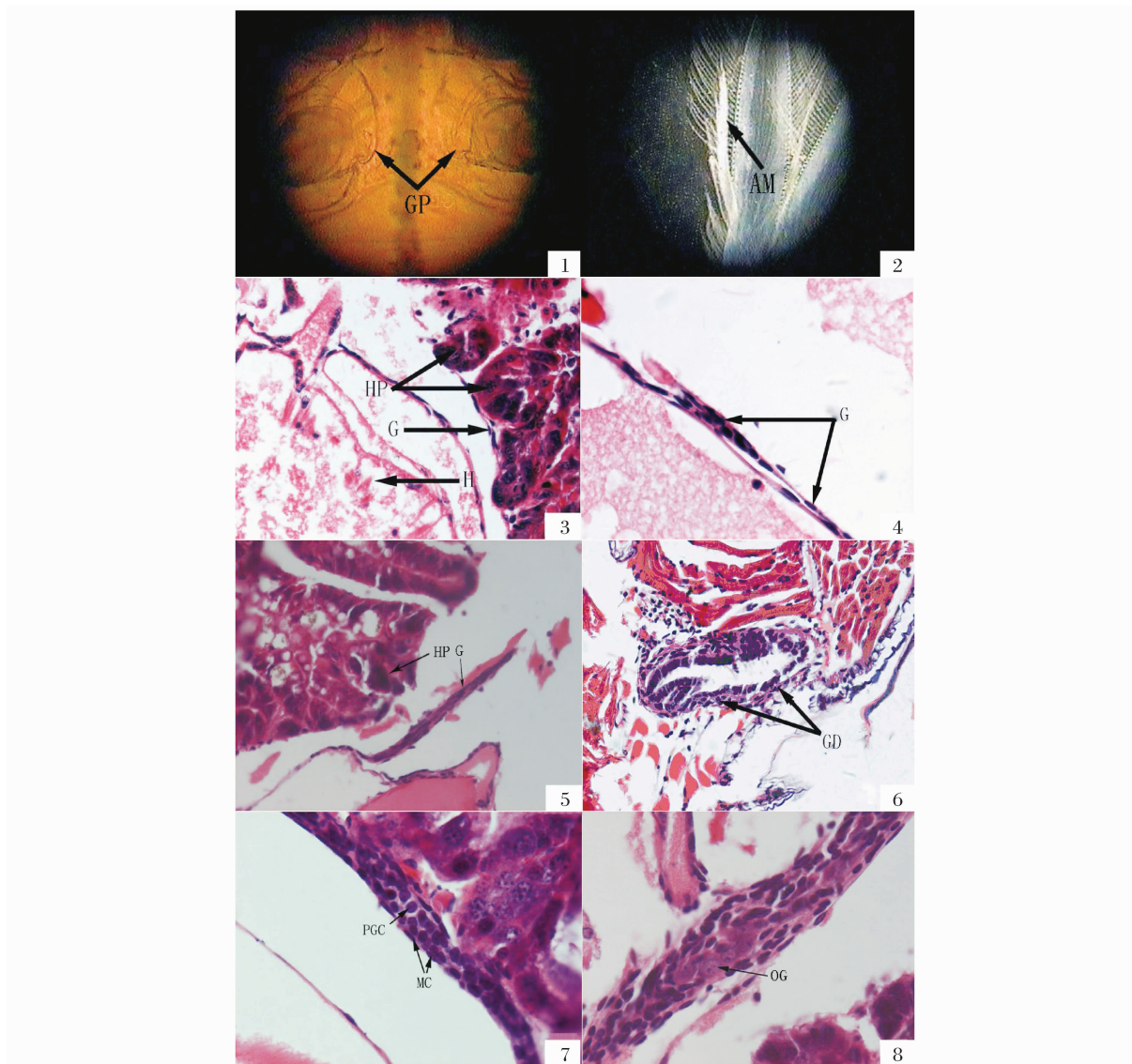
Effects of 4-nonylphenol on growth and sex differentiation in *Macrobrachium rosenbergii*

ZHU Chun-hua, XUE Hai-bo, LI Yu-jiao, HUANG Guo-zhong, LIU Yi-yang, LI Guang-li*
(Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: Time of sex differentiation, as well as effects of 4-nonylphenol (NP) on growth and sex differentiation in juvenile *Macrobrachium rosenbergii* were studied by morphologic observation and histological sections. Ten zoea were collected randomly every 3 days, fixed in Bouin's solution, then embedded in paraffin and sectioned. Transverse sections were stained with hematoxylin and eosin to identify its sex differentiation time. Juvenile *M. rosenbergii* were divided into 5 groups ($n=200$ per group): control, 5, 15, 45, and 135 $\mu\text{g/L}$ NP, respectively. All these juvenile *M. rosenbergii* were immersed in different doses of NP solutions for 30 days, and 50% NP solutions were renewed every 2 days to keep NP's steady concentration. Ten juvenile *M. rosenbergii* were collected randomly from each group on 15, 20, 25, and 30 d, and both the body mass and length were measured respectively for the assessment of NP on growth. Thirty juvenile *M. rosenbergii* were collected randomly from each group on 30 d to identify their sex by outward features (gonopore, appendix masculine, etc) under anatomical lens, and 10 were fixed, embedded and sectioned to observe its gonad histology. Data were subjected to one-way analysis of variance followed by Duncan's multiple rang test. Results showed that primordial germ cells (PGCs) appeared in 15 d larva; however, genital duct, a wrinkled and pimply plastron, and a sunken basal part on the 4th–5th walking legs appeared in 24 d larva in some *M. rosenbergii*. In addition, a rudiment of the appendix masculine on the internal of the 2nd pleopod was found in 45 d larva in some *M. rosenbergii*, and gonads could be identified easily as testis and ovary, respectively. *M. rosenbergii* larvae were not affected in their body weight and length if treated by NP less than 15 d, however, they were inhibited significantly in a dose-dependent manner if treated more than 20 d ($P < 0.05$). Spermatogonium and oogonium were observed respectively in the testis and ovary in the control group on 30 d, however, gonads unidentified as male and female were found in the NP-treated groups, and the quantity of sex-unidentified *M. rosenbergii* increased with the doses of NP. Results suggested that the time of sex differentiation of larval *M. rosenbergii* occurred between 21 to 45 d larva and the change of external forms occurred before that of the internal forms. Furthermore, growth and testis development were inhibited possibly because of NP interfering with the processes of molt and vitellogenin synthesis.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*; juvenile shrimp; growth and development; sex differentiation

Corresponding author: LI Guang-li. E-mail: ligl@gdou.edu.cn



图版 罗氏沼虾外部形态及性腺组织切片

1. 仔虾后 24 d 第四、五步足基部形态, $\times 40$; 2. 仔虾后 45 d 雄虾第二游泳足内肢内侧的雄性附肢, $\times 40$; 3. 仔虾后 15 d 性腺纵切面, $\times 200$; 4. 仔虾后 21 d 性腺纵切面, $\times 200$; 5. 仔虾后 24 d 性腺纵切面, $\times 200$; 6. 仔虾后 24 d 生殖管横切面, $\times 200$; 7. 仔虾后 35 d 性腺纵切面, $\times 200$; 8. 仔虾后 45 d 卵巢纵切面, $\times 200$ 。

GP:生殖孔; AM:雄性附肢; HP:肝胰脏; G:性腺; H:心脏; GD:生殖管; PGC:原始生殖细胞; MC:生殖上皮细胞; OG:卵原细胞。

Plate Morphologic and gonad histological sections of *M. rosenbergii*

1. Basal part of the 4th - 5th walking legs at 24 d, $\times 40$; 2. Appendix masculina on the internal of the 2nd pleopod at 45 d, $\times 40$; 3. Longitudinal section of gonad at 15 d, $\times 200$; 4. Longitudinal section of gonad at 21 d, $\times 200$; 5. Longitudinal section of gonad at 24 d, $\times 200$; 6. Cross section of genital duct at 24 d, $\times 200$; 7. Longitudinal section of gonad at 35 d, $\times 200$; 8. Longitudinal section of ovary at 45 d, $\times 200$.

GP:gonopore; AM:appendix masculina; HP:hepatopancreas; G:gonad; H:heart; GD:genital duct; PGC:primordial germ cells; GEC:germinal epithelial cells; OG:oogonium.