

지렁이 꼬리재생시 재생아의 형태발생에 관한 연구

조성진 · 이명식 · 허소영 · 신명주 · 박순철
(중앙대학교 생명과학과)

Developmental Changes of Blastema during Earthworm Tail Regeneration

Cho, Sung Jin, Myung Sik Lee, So Young Hur, Myung Ju Shin and Soon Cheol Park
(Department of Life Science, Chung-Ang University)

ABSTRACT

Although the earthworm is an important animal species capable of regenerating missing body part, earthworm regeneration is not well understood at the tissue, cell and molecular levels. In order to understand the developmental changes of blastema during earthworm tail regeneration, the formation and development blastema during regeneration was investigated by histological analysis. Within 1 day after amputation, dedifferentiating blastemal cells appeared in coelomic side of longitudinal muscle layer. At 3 days postamputation, proliferating blastemal cells migrated into coelum and blastema was formed beneath wound epithelium around 7 days after amputation. Segmentation of blastema was observed around 2 weeks after amputation followed by redifferentiation of nephridium, intestine, setae and septa.

Key words : Regeneration, Blastema, Earthworm, *Eisenia andrei*

서 론

일부 무척추 및 척추동물은 유생시기 뿐만 아니라 성체 시기에도 다소간의 차이는 있지만 다른 생물로부터의 공격이나 불의의 사고에 의해 몸의 일부가 결손 되었을 때 이를 완벽한 상태로 재생할 수 있는 능력을 갖고 있다.

재생은 성체에서 국부적으로 일어나는 발생과정으로 생각되고 있으며 분화가 완성된 세포가 어떻게 분화에 역행하여 탈분화되어 재생아를 형성하고 배아발생시 사용되었던 발생프로그램이 재활성화되어 재생조직 및 기관의 성장, 패턴형성 및 형태형성을 조절하는지에 관한 학문적 관심이 고조되고 있다.

이러한 재생기작에 관한 연구는 정상적인 배발생 및 분화기작을 이해하는데 유용한 모델로 인식되고 있다. 현재 재생에 관한 연구에 이용되는 척추동물로는 axolotl 및 newt를 이용하여 다리재생기작에 관한 연구가 활발히 진행되고 있고, 이를 통하여 재생기관의 축결정 (axes determination) (Maden 1982) 및 형태형성인자의 작용기작 (Brookes 1992, Scadding과 Maden 1994) 등에 관한 연구결과가 보고된 바 있다. 최근에는 이외에도 무척추동물인 플라나리아의 재생기간 동안 발현되는 Hox 유전자의 특성과

기능규명 (Salo 등 1997)에 관한 연구가 진행되었으며 극피동물의 일종인 feather star의 초기 및 후기에 나타나는 재생아세포의 기원과 이동에 관한 연구가 보고된 바 있다 (Carnovali 등 1995, 1997). 이밖에도 일부 어류의 지느러미 재생에 관한 연구가 진행된 바 있다 (Wagner와 Misof 1992, Santamaria 등 1996). 특히 이중에서 유미양서류의 다리는 절단되었을 때 쉽게 재생되는 독립적인 발생시스템으로서 패턴형성의 메커니즘을 규명하기 위한 모델시스템으로 이미 오래 전부터 널리 이용되어 왔다 (Holtzer 1956, Wallace 1981). 일반적으로 진재생 또는 부가재생 (epimorphic regeneration)은 조직재생 (tissue regeneration)과 구별되는 개념으로 조직재생이 파괴된 일부 조직만이 원상태로 복구되는 것을 의미하는 반면 진재생은 절단되어 잃어버린 기관 전체가 완벽한 상태로 복구되는 것을 의미한다 (Goss 1992). 또한 진재생 (이하에서 재생이라 함)은 절단하여 둘로 나뉘어진 각각의 몸체로부터 두 개의 완전한 개체가 재생되어 만들어지는 양방향성재생 (bidirectional regeneration)과 잘려진 부분만 재생이 되어지는 단일방향성 재생 (unidirectional regeneration)으로 나누어진다. 전자의 경우에는 하등이배엽성 동물인 히드라와 삼배엽성 동물인 플라나리아 그리고 무척추동물인 지렁이와 극피동물인 불

가사리 등이 포함되고 후자의 경우에는 곤충 및 유미양서류의 꼬리와 다리재생 등이 포함된다 (Brockes 1997). 이러한 동물들은 재생의 결과 기존의 전-후, 등-배, 및 근-원위축을 유지하며 잘려 없어진 부분만을 정확히 재생하게 된다 (Maden 1982).

재생은 일반적으로 4단계로 나누어 이루어진다. 첫번째 단계는 상처회복 (wound healing) 과정으로 절단상부에 위치하는 상피조직을 구성하는 세포들은 기존의 조직체계에서 이탈하여 이동을 시작하며 곧이어 분열을 개시한다. 이들 세포는 절단면을 점차 덮으면서 기존의 상피조직과는 매우 다른 여러 층의 세포로 구성되는 상처회복조직 (wound epidermis)을 형성한다. 두번째 단계는 탈분화 (dedifferentiation) 과정으로 절단면에 근접한 조직에서 일어나며 그 결과로 골격, 근육 및 기타 결합조직의 세포간 물질이 와해되고 조직을 구성하던 세포들은 초기 발생시기의 형태와 유사한 모습을 띠게 된다. 세번째 단계는 재생아형성 (formation of blastema) 과정으로 탈분화된 세포들은 dedifferentiation cell mass를 형성하게 되는데 이것을 재생아 (blastema)라고 한다. 네번째 단계는 성장과 재분화 (proliferation and redifferentiation) 과정으로 재생아는 계속되는 세포분열에 의해 성장을 계속하고 탈분화된 재생아세포들이 재생부위에 밀집되어 새로운 기관으로 분화하는 양상을 보인다. 이 중 탈분화 과정은 실제적인 재생의 시작이며 가장 필수적인 과정으로 이미 분화되었던 세포들이 자신의 특성을 잃고 다시 과거 배발생 시기의 미분화 상태로 돌아가는 현상을 뜻한다. 탈분화는 재생의 초기단계에서 재생과정의 지속여부를 결정짓는 매우 중요한 단계로서 척추동물 중 재생이 잘 일어나는 유미양서류에서는 탈분화가 활발히 일어나지만, 그렇지 않은 조류나 포유류에서는 탈분화 자체가 일어나지 않는다. 또한 탈분화 과정에서 관찰되는 특이한 현상은 세포간 공간의 환경이 극히 제한됨으로써 기존조직의 파괴에 따른 피해가 최소화되며, 세포들이 분열을 재개할 수 있는 상태로 변하게 된다는 점이다 (Stocum 1995). 그러나 아직 이에 수반되는 생화학적 및 분자생물학적 기본원리는 아직 잘 알려져 있지 않다.

본 연구에 사용된 지렁이는 계통분류학상 하등동물과 고등동물의 중간에 위치하고 있는 환형동물문 (Phylum Annelida), 빈모綱 (Class Oligochaeta), 신빈모목 (Order Neoligochaeta), 낚시 지렁이과 (Family Lumbricidae)에 속하는 동물로서 두 동물군의 특징을 모두 가지고 있는 동물이다. 또한 지렁이는 두부와 꼬리재생이 가능한 양방향성 재생동물 중 가장 고등한 동물로서 재생연구를 위한 새로운 모델시스템으로 여러 가지 장점을 갖고 있다. 첫째, 지렁이는 다량의 개체를 손쉽게 구할 수 있으며 배양조건이 간단하여 실험동물로서의 경제성을 갖고 있다. 둘째, 지렁이는 재생에 소요되는 기간이 매우 짧다. 본 연구의 실험 결과 꼬리재생의 경우 절단 후 24시간 이내에 재생아

세포가 나타나기 시작하여 일주일 이내에 재생아 (blastema)의 형성이 완성되고, 약 4주 정도가 지나면 절단된 부위가 거의 완전한 상태로 재생된다. 셋째, 지렁이는 양방향성재생이 가능한 동물로 머리와 꼬리재생시 발생학적으로 그 기원이 매우 다양한 기관의 재생이 이루어져야 한다. 즉, 두부재생을 위해서는 뇌 및 심장 등의 중추기관 재생이 필수적이며, 꼬리재생시에는 장, 신장 (nephridium), 황세포충 (지렁이의 간장 기관에 해당) 및 giant axon 등의 재생이 이루어져야 한다. 그러므로 다른 실험동물보다 매우 다양한 기관의 분화 및 발생기작 연구에 유용한 실험재료로 사용될 수 있다. 지렁이의 재생에 관한 연구는 1970년대에 상처회복 (wound healing) 기간동안에 나타나는 표피조직의 형태적 변화 (Burke 1974, Moment 1974), 재생마디수의 개체변이 (Maderson과 Salthe 1971), 절단각도와 재생마디수의 변화 (Gates 1950) 등 주로 외형 관찰을 통한 매우 기초적인 연구가 간헐적으로 이루어졌을 뿐이다. 비교적 최근에는 절단된 giant axon의 sealing mechanism에 관한 연구 보고가 있었으며 (Kranse 등 1994, Qi 등 1995), 지렁이 재생시 polyamine의 일종인 putrescine의 농도가 증가한다는 연구결과가 발표된 바 있다 (Hamana 1995). 그러나 재생의 필수과정인 재생아의 형성, 기원 및 분자생물학적 기작에 관한 연구는 거의 전무한 상태라 할 수 있다.

따라서 본 연구는 지렁이 꼬리재생시 진재생과정에서 필수적으로 일어나야 하는 재생아의 형성과정과 그 기원을 조직학적으로 규명하고자 한다.

재료 및 방법

1. 지렁이 (*Eisenia andrei*)의 배양 및 절단

1) 배양

본 연구에 사용한 지렁이는 환형동물문 (Phylum Annelida), 빈모綱 (Class Oligochaeta), 신빈모목 (Order Neoligochaeta), 낚시지렁이과 (Family Lumbricidae)에 속하는 *Eisenia andrei*로, 지렁이 농장 (고양시 내덕동 소재)에서 구입하여 환대가 잘 발달된 성숙한 개체만을 선택하여 마디수가 90-110개 정도인 개체를 Park 등 (1996)에 의한 방법으로 사육하였다. 선택된 지렁이는 증류수로 여러 차례 세척한 후 peat moss로 채워진 15×20×7 cm 크기의 플라스틱 용기에 약 200개체씩 넣어 배양기 (SANYO)에서 23±1°C를 유지하며 암소에서 배양하였다. 배양 전에 peat moss는 지렁이 성장에 해로운 선충류의 성장을 최소화하기 위하여 65°C 건조용 전기오븐에서 12시간 이상 건조시킨 후 사용하였다. 배양시 습도는 주기적으로 증류수를 공급하여 80% 이상을 유지하고, 양분으로는 우분을 매일 peat moss 위에 공급하였다. 지렁이는 최소한 일주일 정도 기초 배양한 후 실험에 사용하였다.

2) 절단

꼬리재생실험에 사용된 지렁이는 환대로부터 항문 쪽으로 정확히 15마디를 남기고 꼬리부분은 70% 에탄올에 소독된 면도칼로 절단하였다. 절단 후 꼬리재생 관찰에 필요한 머리부분은 peat moss로 채워진 glass petri dish에 약 30개체씩 넣은 후 위와 같은 방법으로 배양하였다. 절단된 지렁이는 재생시간 경과에 따라 채취한 후 꼬리가 재생된 지렁이를 증류수로 세척한 후 -70°C에서 보관하고 제반 시험에 사용하였다.

2. 재생조직의 형태발생 관찰

1) 전체적 재생과정 관찰

시간 경과에 따른 꼬리재생의 과정을 형태학적으로 관찰하기 위하여 다음과 같은 방법으로 관찰하였다. 절단 후 각각 1일, 3일, 5일, 7일, 10일, 14일, 17일, 21일, 26일, 30일, 50일 및 80일이 경과하여 재생중인 지렁이를 채취하여 -70°C에서 10분간 급냉동시킨 후, 조직이 상하지 않게 0.5% Triton X-100이 포함된 완충용액 (2 mM, pH7.0, Tris-HCl)에 넣어 해동시켰다. 해동된 재생조직의 물기를 제거한 후 Photographic system (GD photographic system, UVP, USA)에서 사진 촬영을 하였다.

2) 조직학적 관찰

재생조직의 형태발생을 관찰하기 위하여 다음과 같이 포본 및 절편제작을 하였다. 시간 경과에 따른 재생조직을 면도칼로 절단하여 10% neutral-formalin (Sigma) 용액으로 24-26시간 고정 (fixation)한 후, 흐르는 수돗물에서 12시간 동안 세척하였다. 그 후, 70% 에탄올 (Merck)부터 100%에탄올까지 농도 상승순으로 약 1시간 정도씩 탈수 (dehydration)한 다음 xylene (Merck)으로 투명하게 하였고, 파라핀 침투를 위하여 58-59°C를 유지하는 배양기 안에서 12시간 정도 진공 침투하였다. 파라핀이 침투된 재생조직을 절편 제작하기 위하여 embedding center (Leica)에서 포매한 (embedding) 후, microtome (Leica)을 이용하여 4-5 μm 두께로 박절하였다. 박절된 절편을 slide glass (Fisher)에 올린 후, slide warmer위에서 부착시킨 다음, xylene으로 탈 파라핀하고 합수과정 (hydration)을 거쳐 hematoxylin과 eosin (Sigma)용액으로 염색하였다. 그 후, permount로 봉입하여 광학현미경 (Vanox-s, Olympus)으로 관찰한 다음 사진 촬영하였다.

결 과

전체적 재생과정의 관찰

지렁이의 재생과정을 관찰하기 위하여 절단 후 1일, 3일, 5일, 7일, 10일, 14일, 17일, 21일, 26일, 30일, 50일 및 80일

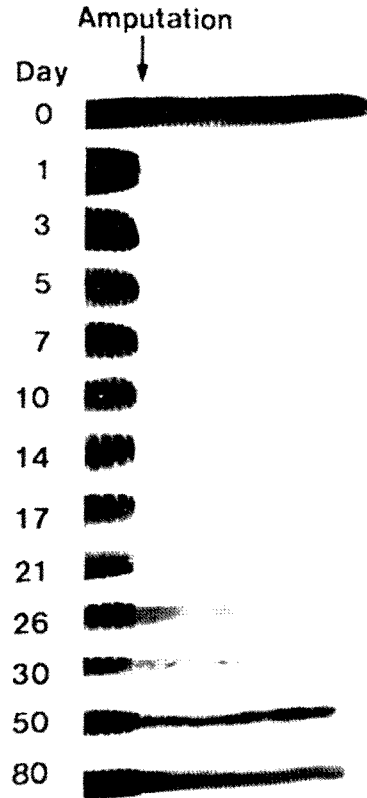


Fig. 1. The process of earthworm tail regeneration. At one and three day stages, extrusion of intestine was observed and wound healing was being processed. Outgrowth of regenerating part was observable from 6 to 7 day stage. Actually white regenerating tail became distinct from 10 days after amputation. At 14 day stage, segmentation of regenerating tail was seen. After then, the growth of regenerating tail was very rapid, followed by pigmentation.

이 경과하여 재생 중인 지렁이를 단계별로 관찰하였다 (Fig. 1). 꼬리재생과정에서 1일과 3일 단계에서는 절단시 돌출 되어나온 장과 상처회복 (wound healing)의 완성된 형태가 관찰되었다. 6일에서 7일 단계에서는 재생부위가 외부로 성장하는 과정이 관찰되었다. 또한 절단 후 10일 경과 후에는 육안으로 관찰할 수 있는 재생조직이 명확히 관찰되었다. 14일 단계에서는 재생부위의 체절형성이 관찰되었다. 꼬리재생은 매우 빠르게 진행되어 21일 단계에서는 재생된 체절을 육안으로 관찰할 수 있을 정도로 재생이 진행되었고 재생부위에 색소형성 (pigmentation)이 나타났다. 26일 단계에서는 재생된 부위에 혈관형성이 진행되고 있음을 보여준다. 30일이 경과 후에는 재생이 거의 완전히 수행되었고 장내 함유물을 통해 재생된 장이 어느 정도 기능을 수행하고 있음을 보여주고 있다. 30일 이후 80일이 경과하였을 때에는 거의 절단 전 외형과 동일한 수준까지 완벽한 재생을 보여주고 있다 (Fig. 2). 이러한 재생과정의 형태적 관찰을 통해 지렁이가 완벽한 진재생동물로서 양

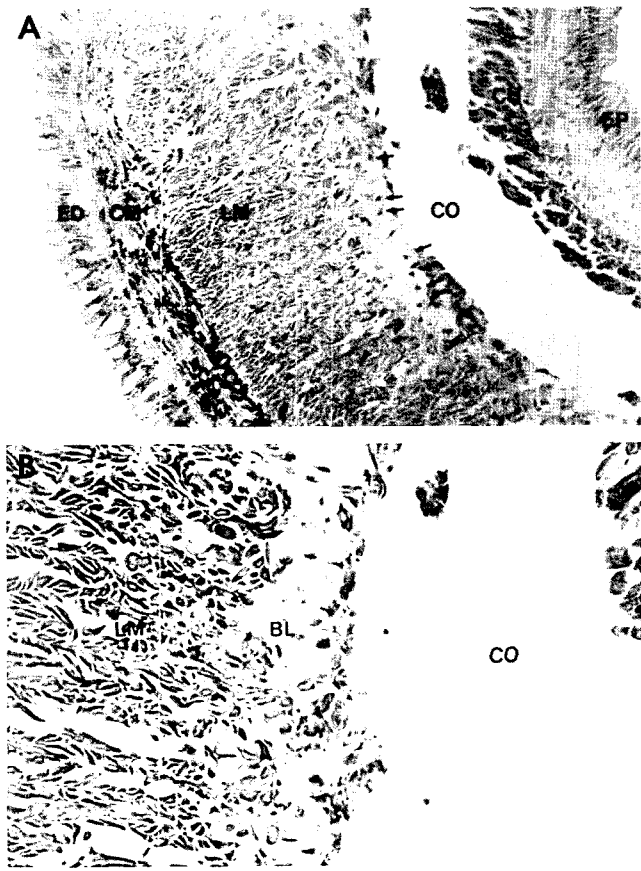


Fig. 2. Cross section of regenerating earthworm tail from 24 hours postamputation stained with hematoxylin and eosin. (A) The dedifferentiating mesenchymal cells (arrows) were observed at the coelomic layer of the longitudinal muscle (LM) of body wall. Dedifferentiating cells had distinct and single nucleus. No dedifferentiating cells appeared in epidermis (ED), circular muscle (CM), coelom (CO), chloragogue tissue (CH), and epithelium of intestine (EP). ($\times 200$). (B) Blastema cells (BL) showed typical characteristic of mesenchymal cells: large size, distinct nucleus, loosely packed and irregular shape. ($\times 400$).

서류의 다리재생시스템과 다른 새로운 재생시스템모델로 제시될 수 있다고 생각되어진다.

조직학적 관찰

지렁이 꼬리재생시 재생아의 기원과 형태발생양상을 시간별로 관찰하여 각 시기에 나타나는 형태적 특징을 관찰하였다. Fig. 2A는 절단 후 24시간이 경과한 재생조직의 횡단면을 광학현미경을 사용하여 관찰한 결과($\times 200$) 미분화된 간충세포의 형태를 가진 탈분화된 세포가 체강면 쪽의 중주근 층에서 관찰되었다. 또한 탈분화가 진행되는 세포는 뚜렷하게 단핵을 가지고 있는 것이 관찰되었다(Fig. 2A의 화살표). 절단 후 24시간이 경과한 재생조직에서 탈분화가 진행되지 않은 조직들은 epidermis (EP), circular

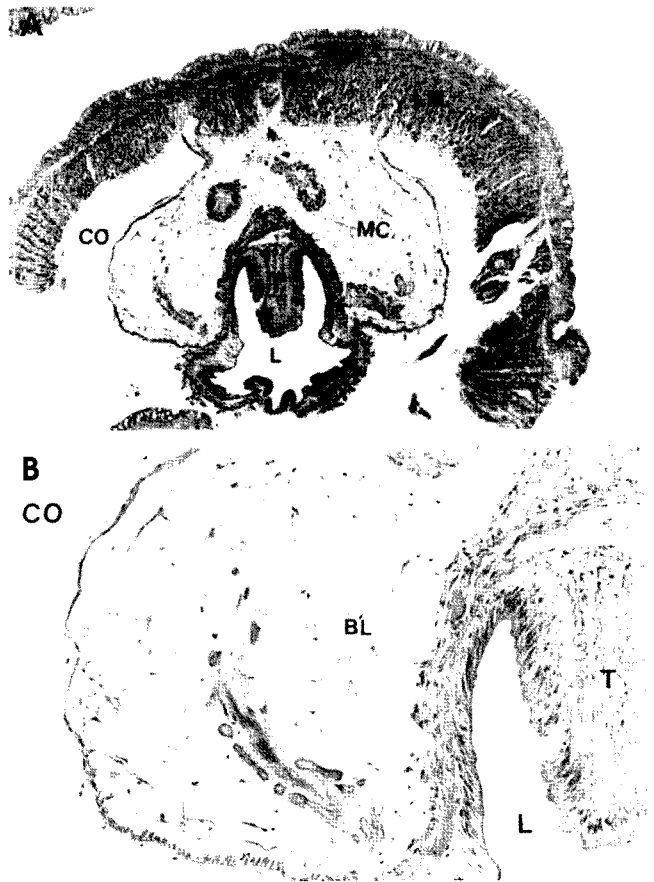


Fig. 3. Cross section of regenerating earthworm tail from 3 days postamputation stained with hematoxylin and eosin. (A) Proliferating mesenchymal cells (MC) migrated toward coelom (CO) to form blastema. T: typhlosolar region; L: lumen of intestine. ($\times 40$). (B) Migration of blastema cells (BL) were progressed and chloragogue tissue appeared to be relatively dissipated. ($\times 200$).

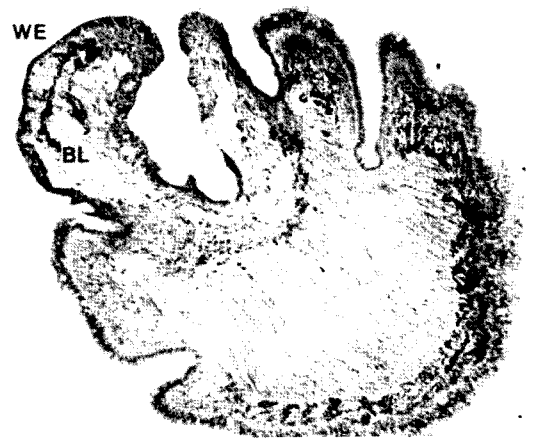


Fig. 4. Oblique section of regenerating earthworm tail from 7 days postamputation stained with hematoxylin and eosin. Well-developed blastema (BL) was formed beneath wound epidermis (WE). ($\times 100$).

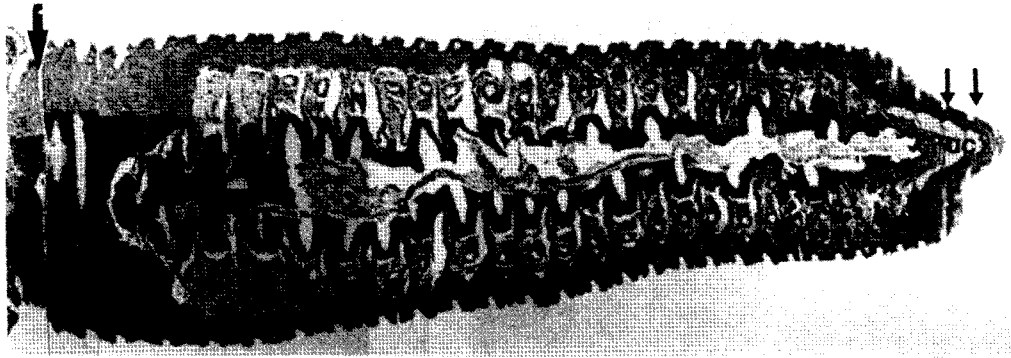


Fig. 5. Longitudinal section of regenerating earthworm tail from 30 days postamputation stained with hematoxylin and eosin. The redifferentiation of blastemal cells was actively being progressed. Regenerating setae (S), nephridia (N), and intestinal epithelium were observed. Note undifferentiated blastemal cell (UC) at the distal end of regenerating tail as well as at the portion just anterior to amputation level (small arrow). Large arrow indicated amputation level. ($\times 200$).

muscle layer (CM), coelum (CO), chloragogue tissue (CH), 장의 epithelium (EP) 등이 관찰되었다. 또한 절단 후 24시간이 경과한 재생조직을 고배율($\times 400$)에서 관찰한 결과 재생아세포가 명확히 중주근 층에서부터 기원하는 모습이 관찰되었고 재생아세포는 전형적인 간층세포 모양인 세포 형태가 크고 불규칙한 모양과 단핵을 가지고 있는 것이 관찰되었다 (Fig. 2B). Fig. 4A는 절단 후 3일이 경과한 재생조직의 횡단면을 관찰한 결과로 재생아세포의 성장이 활발히 진행되었고 체강쪽으로의 이동이 더욱 진행된 것을 볼 수 있었다. 또한 고배율($\times 400$)로 관찰하였을 때 재생아는 장의 최외곽 조직인 chloragogue tissue와 장외막 사이에도 나타났으며 재생아의 이동이 더욱 진행된 것을 볼 수 있었다. 재생아들은 더 발달된 형태를 가지고 체강과 typhlosolar region에서 관찰되었다 (Fig. 3A). 절단 후 7일이 경과한 후 재생아의 이동은 빠르게 진행되어 wound epidermis 바로 아래에 위치하였다 (Fig. 4). 절단 후 꼬리재생은 Fig. 2에서와 같이 10일 이후 빠르게 진행되어 체절형성이 관찰되었다. Fig. 5는 절단 후 30일이 경과하여 새롭게 재생된 조직의 종단면을 관찰한 결과로 재생아의 재분화가 활발하게 진행되었다. 또한 각 체절에는 재생된 신관 (nephridia), 강모 (setae)들이 형성된 것을 관찰할 수 있었다. 재생된 꼬리 끝 부분과 절단지역 바로 앞쪽에서 미분화된 재생아세포가 관찰되었다 (Fig. 5의 화살표).

고 찰

지렁이는 양방향성 재생동물 중 가장 고등한 동물로 다른 실험대상 동물보다 저렴하게 다량의 개체를 손쉽게 구할 수 있고 재생에 소요되는 기간이 짧다. 또한 현재까지 진행되어온 양서류에서의 재생연구는 주로 사지재생에 관한 것으로 간층조직 (mesenchymal tissue)에 의한 중배엽성

기관의 분화 등이 재생에 주 연구대상이 되어왔다. 그러나 지렁이의 경우, 잘려져 나간 몸통 전체를 재생해야 하기 때문에 중배엽성기관 이외에 장, 후신 및 간장기관까지도 재생대상이 되어야 한다. 이러한 잇점 때문에 지렁이는 고등척추동물의 탈분화 및 재분화과정을 연구하기에 매우 유용한 모델로 사용할 수 있고 다른 동물에 비해 보다 독특한 재생연구시스템을 제공해 줄 수 있다고 생각된다. 지렁이가 재생기작을 연구하기 위한 새로운 모델로 제시되기 위해서는 이 동물이 수행하는 재생이 분화된 세포에서 이루어지는 것이 아니라 탈분화된 재생아세포로부터 이루어진다는 실험적 근거가 뒷받침되어야 한다. 따라서 본 연구에서는 지렁이 꼬리재생시 탈분화된 재생아세포의 기원과 형태발생양상을 시간별로 관찰하였다. 그 결과 지렁이 꼬리재생시 재생아세포들의 기원은 체강면의 중주근세포로부터 생성되기 시작한다는 것이 명확히 관찰되었다 (Fig. 2). 이러한 사실은 지렁이의 꼬리재생이 재생아세포의 형성을 수반하는 진재생기작에 의해 이루어지고 있다는 사실을 말해 주고 있다. 또한 지렁이 꼬리재생시 재생아세포의 기원은 완전히 분화된 근육세포가 간층세포로 탈분화된다는 사실을 뒷받침해주는 증거로 제시될 수 있다고 생각된다. 다른 재생모델시스템에서 관찰된 재생아세포의 기원은 다음과 같이 보고되어 졌다. 양서류 재생아의 간층세포는 주로 근육 (Kirtner와 Brockes 1984), 연골 (Casimir 등 1988) 및 Schwann 세포 (Maden 1977)로부터 기원하고 있는 것으로 생각되며 불가사리의 팔재생에 있어서는 재생아세포의 일부가 체강상피 (coelomic epithelium)에서 기원하는 것으로 보고되었다 (Candia 등 1997). 비록 결과에서는 다른 조직에서 탈분화하는 세포들을 관찰할 수는 없었지만 다른 조직들이 본 연구에서 관찰하지 못한 다른 단계에서 재생아형성에 기여할 수 있다는 사실을 배제할 수는 없다. 그러므로 좀 더 다양한 단계의 조직학적 관찰이 필요하다고 생각된다. 중주근세포에서 기원한 재생아세포는 절단

후 3일 이내에 성장이 활발히 진행되고 체강 안으로 이동하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 절단 후 7일이 경과된 재생조직에서는 wound epidermis 바로 아래에 형성된 재생아세포층이 보여지고 아직 분절의 명확한 형태는 관찰되지 않았다(Fig. 4). 재생은 10일 이후 빠르게 진행되며 재생이 거의 완성된 30일이 경과된 재생부위를 관찰한 결과 원위재생아 세포층은 잘 발달되었으며 절단면의 인접 부위에서도 재생아세포층이 관찰되었다. 또한 재생중인 신탄관과 강모의 형태도 관찰할 수 있었다(Fig. 5). 이러한 관찰결과 지렁이는 꼬리재생시 탈분화된 재생아세포에 의해 진재생과 다양한 기관의 재분화가 수행되므로 다른 실험 동물보다 다양한 기관의 분화 및 발생기작 연구에 유용한 재생시스템모델로서 제시될 수 있다고 사료된다.

사 사

이 논문은 2000학년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임.

인 용 문 헌

- Brockes, J.P. 1992. Introduction of a retinoic reporter gene into urodele limb blastema. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**: 11386-11390.
- Brockes, J.P. 1997. Amphibian limb regeneration: rebuilding a complex structure. *Science* **276**: 81-87.
- Burke, J.M. 1974. Wound healing in *Eisenia foetida* (Oligochaeta). *J. Exp. Zool.* **188**: 49-64.
- Candia Carnevali, M.D., F. Bonasoro and A. Biale. 1997. Pattern of bromodeoxyuridine incorporation in the advanced stages of arm regeneration in the feather star *Antedon mediterranea*. *Cell Tissue Res.* **289**: 363-374.
- Carnevali, M.D.C. and F. Bonasoro. 1995. Pattern of cell proliferation in the early stages of arm regeneration in the feather star *Antedon mediterranea*. *J. Exp. Zool.* **272**: 464-474.
- Carnevali, M.D.C. and F. Bonasoro. 1997. Pattern of bromodeoxyuridine incorporation in the advanced stages of arm regeneration in the feather star *Antedon mediterranea*. *Cell Tissue Res.* **289**: 363-374.
- Casimir, C.M., P.B. Gates, R.K. Patient and J.P. Brockes. 1988. Evidence for dedifferentiation and metaplasia in amphibian limb regeneration from inheritance of DNA methylation. *Development* **104**: 657-668.
- Gates, G.E. 1950. Regeneration in an earthworm, *Eisenia foetida*. II. Posterior regeneration. *Biol. Bull.* **98**: 36-45.
- Goss, R.J. and R. Holt. 1992. Epimorphic vs. tissue regeneration in *Xenopus* forelimbs. *J. Exp. Biol.* **261**: 451-457.
- Hamana, K., H. Hamana and T. Shinozawa. 1995. Alterations in polyamine levels of nematode, earthworm, leech and planarian during regeneration, temperature and osmotic stresses. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **111**: 91-97.
- Holtzer, S.W. 1956. The inductive activity of the spinal cord in urodele tail regeneration. *J. Morph.* **99**: 1-39.
- Kirtner, C.R. and J.P. Brockes. 1984. Monoclonal antibodies identify blastemal cells derived from dedifferentiating muscle in newt limb regeneration. *Nature* **308**: 67-69.
- Kranse, T.L., H.M. Fishman, M.L. Ballinger and G.D. Bittner. 1994. Extent and mechanism of sealing in transected giant axons of squid and earthworms. *J. Neurosci.* **14**: 6638-6651.
- Maden, M. 1977. The role of Schwann cells in paradoxical regeneration in the axolotl. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **41**: 1-13.
- Maden, M. 1982. Vitamin A and pattern formation in the regenerating limb. *Nature* **295**: 72-75.
- Maderson, P.F.A. and S.N. Salthe. 1971. Further observation on tail regeneration in *Anolis carolinensis*. *J. Exp. Zool.* **177**: 185-190.
- Moment, G.B. 1974. Variation and its causation in earthworm regeneration. *J. Exp. Zool.* **190**: 297-304.
- Park, S.C., H.W. Park and T.J. Smith. 1996. Expression of alkaline phosphatases during embryonic development and immature stages of the earthworm, *Eisenia andrei*. *Soil Biol. Biochem.* **28**: 579-582.
- Qi, P., N. Todorova, A.T. Todorov, J.H. Fendler and G.S. Rodziewicz. 1995. Action potentials pass severed earthworm MGA segments reconnected by laser and electric field pulses. *Brain Res. Bull.* **37**: 189-192.
- Salo, E., J.R. Bayascas and E. Castillo. 1997. Planarian Hox gene: novel patterns of expression during regeneration. *Development* **124**: 141-148.
- Santamaria, J.A. and J. Becerra. 1996. Incorporation of bromodeoxyuridine in regeneration fin tissue of the goldfish *Carassius auratus*. *J. Exp. Zool.* **275**: 300-307.
- Scadding, S.R. and M. Madern. 1994. Retinoic acid gradients during limb regeneration. *Dev. Biol.* **162**: 608-617.
- Stocum, D.L. 1995. Wound repair, regeneration, and artificial tissues, R. G. Landes Co., Austin, Texas, pp. 230.
- Wagner, G.P. and B.Y. Misof. 1992. Evolutionary modification of regenerative capability in vertebrates: A comparative study on test pectoral fin regeneration. *J. Exp. Zool.* **261**: 62-78.
- Wallace, H. 1981. Vertebrate limb regeneration. (J. Wiley and sons, New York)