

从文昌鱼个体发生谈脊椎动物起源*

INSIGHTS INTO VERTEBRATE ORIGIN FROM AMPHIOXUS ONTOGENESIS

张士瑾 吴贤汉

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

脊椎动物是从哪一类无脊椎动物进化来的?由无脊椎动物进化到脊椎动物又是怎样发生的?有关脊椎动物起源的问题一直是生物学家感兴趣的问题。这可能不仅因为脊椎动物起源代表动物进化过程中一次质的飞跃——由无脊椎骨到有脊椎骨和由无背神经索到有背神经索,而且因为有关脊椎动物起源涉及我们人类自身起源的问题。关于脊椎动物起源,目前为大多数学者接受的观点是由 Garstang (1894) 提出的,即头索动物文昌鱼和脊椎动物亲缘关系最近,文昌鱼和脊椎动物始祖相似,也可以说文昌鱼是脊椎动物始祖的现存代表 (Jollie, 1982)。

文昌鱼成体结构和脊椎动物有许多共同特征:1. 两者都有脊索;2. 都具有位于脊索背部的神经管;3. 都具有鳃裂和分节的肌肉;4. 都具有基本相同的循环系统 (金德祥, 1958)。这些特征都是文昌鱼和脊椎动物始祖相似的证据。但是,和脊椎动物相比,文昌鱼 1. 没有头部;2. 身体不对称;3. 具有脊椎动物所没有的围鳃腔 (atrium);4. 分泌器官和环节动物相似,为原肾。凡此种,又怎么解释?这里,我们主要根据文昌鱼生殖和发育生物学的研究结果,谈谈文昌鱼和脊椎动物起源之间的关系问题。

1 生殖细胞

构成脊椎动物的细胞分两类:体细胞和生殖细胞。生殖细胞是由原生殖细胞 (Primordial germ cell) 发育来的。脊椎动物原生殖细胞都来自中胚层 (Nieuwkoop & Sutasurya, 1979), 由中胚层细胞从生殖原基外迁移到生殖原基内逐渐形成。文昌鱼的原生殖细胞也来自中胚层。文昌鱼幼虫变态时,肌腔上皮细胞在原位形成原生殖细胞 (Boveri, 1892), 没有迁移过程。因此,文昌鱼和脊椎动物原生殖细胞的起源是相同的。

1995 年第 4 期

1.1 卵子

文昌鱼卵子直径约 120 μ m,卵外有卵膜包围。成熟前,文昌鱼长足的卵母细胞的核即生发泡位于动物极,约占卵子体积的一半大。卵母细胞的动物极和卵巢壁连接在一起,与动物极相对的植物极为游离端。这恰好和许多无脊椎动物的卵子在卵巢内是通过植物极与卵巢壁相连接,而动物极是游离端的情形相反。Conklin (1932) 非常重视这一现象。他根据文昌鱼和两栖类等脊索动物胚胎的腹部或前腹部是由卵子动物极形成,而环节动物、软体动物和线虫等无脊椎动物胚胎的背部或前部是由卵子动物极形成的观察结果,推测脊索动物卵子动物极和卵巢壁相连接,将来形成胚胎的腹部或腹前部,而无脊椎动物卵子植物极和卵巢壁相连接,将来形成胚胎的背部或腹前部。这是非常有趣的假设。不过,多数脊椎动物卵子是否同文昌鱼卵子一样,是通过动物极和卵巢壁相连接仍不清楚 (Waddington, 1956)。

目前,一般认为脊椎动物起源于海洋 (Robertson, 1957)。海洋中无脊椎动物卵子排出体外的时期是(1) 早期初级卵母细胞时期;(2) 长足的卵母细胞时期即生发泡 (GV) 时期;(3) 第一次成熟分裂中期 (MI);(4) 成熟分裂已完成,卵原核已形成的时期 (表 1)。没有一类海洋无脊椎动物的卵子是在第二次成熟分裂中期 (MII) 排放的。半索动物和原索动物海鞘的卵子都是在第一次成熟分裂中期排放,但是,原索动物文昌鱼的卵子却是在第二次成熟分裂中期排放。比文昌鱼高等的脊椎动物 (只有狗和狐除外) 无论是水生还是陆生,卵子的排放时

* 本文文献检索是在国家自然科学基金 (39470091) 和山东省自然科学基金 (9300140) 资助下进行的。

中国科学院海洋研究所调查研究报告第 2631 号。

实验海洋生物学开放研究实验室研究报告第 111 号。

间都是在第二次成熟分裂中期。由此可见,在系统演化

表 1 精子入卵时卵子在成熟分裂中所处的时期*

门(Phylum)	亚门(Subdivision)	时期(Stage) **
多孔动物(Porifera)		GV
腔肠动物(Cnidaria)	水螅(Hydrozoa)	卵原核
	钵水母(Scyphozoa)	
	珊瑚(Anthozoa)	
扁形动物(Platyhelminthes)	涡虫(Turbellaria)	GV
线形动物(Nemertinea)		GV
苔藓动物(Bryozoa)		MI
环节动物(Annelida)	原环虫(Archannelida)	初级卵母细胞
	多毛类(Polychaeta)	MI 或 GV
虫动物(Echiura)		GV
星虫动物(Sipuncula)		MI
软体动物(Mollusca)	多板类(Polyplacophora)	MI
	无板类(Pelecypoda)	GV
	腹足类(Gastropoda)	MI
	掘足类(Scaphopoda)	MI
	头足类(Cephalopoda)	MI
节肢动物(Arthropoda)	甲壳类(Crustacea)	MI
棘皮动物(Echinodermata)	海星(Asteroidea)	卵原核
	蛇尾(Ophiuroidea)	MI
	海胆(Echinoidea)	卵原核
	海参(Holothuroidea)	GV
	海百合(Crinoidea)	卵原核或 MI
半索动物(Hemichordata)	肠鳃类(Enteropneusta)	MI
脊索动物(chordata)	被囊类(Tunicata)	MII
	头索动物(Cephalochordata)	MI
	脊椎动物(Vertebrata)	MII

* 据 Costello 等(1957)和 Austin(1965)修改; ** GV, 生发泡时期; MI, MII, 第一和第二次成熟分裂中期。

中,文昌鱼是最早出现的卵子在第二次成熟分裂中期排放的海洋动物。各类动物卵子排放的时间也就是卵子获得受精能力的时间。对于不同动物的卵子在不同的成熟分裂时期排放的现象还没有令人满意的解释。不过,脊椎动物在系统演化过程中逐渐发展出脑下垂体这一结构。近来的研究表明,文昌鱼轮器上的哈氏窝(Hatschek's pit)不但结构上与脊椎动物脑下垂体可能同源(Tjoa & Welsch, 1974),而且可以分泌一些促进生殖细胞发育的活性物质(张致一等,1982;方永强等,1984,1993;方永强,1993)。据此,方永强等认为:文昌鱼已建立起类似脊椎动物原始的生殖分泌调控系统,即脑泡组织-哈氏窝-性腺轴这样一种调控系统。这一发现改变了长期以来认为这一系统始自圆口类的观点。脑下垂体分泌促性腺激素,控制卵子的生长、成熟和排放。至于脑下垂体的出现和脊椎动物卵子在第二次成熟分裂中期排放是否存在因果关系,目前尚不清楚。不过,文昌鱼非但具有和脊椎动物脑下垂体同源的功能相似的哈氏窝,而

且其卵子和绝大多数脊椎动物卵子一样,是在第二次成熟分裂中期排放。这说明文昌鱼和脊椎动物在卵子发生的激素调控方面可能十分相似。

1.2 精子

有关动物精子形态的比较研究发现:相关动物一般具有相似的精子。本世纪初,Retzius(1904,1905)研究几种不同门类动物的精子后,发现它们都具有相似的形态,并称为“原型精子”(Primitive sperm)。原型精子(图 1A)由头、中部和尾三部分组成。头部卵圆形,内有细胞核和顶体(Acrosome);中部很短,通常由四个线粒体环绕在细胞核基部;尾部是一根很长的鞭毛,长约为 50 μ m。

海鞘精子头部细胞核长且不对称,顶体只是一些小泡,单个线粒体并不位于头部细胞核基部,而是环绕在核周围(图 1C;Ursprung & Schabtach, 1964),和原型精子不同。但是,文昌鱼具有典型的原型精子(图 1B; Franzén, 1956)。某些鱼类也具有原型精子。据认为,原型精子是将精卵排放到水中行体外受精动物所具有的

海洋科学

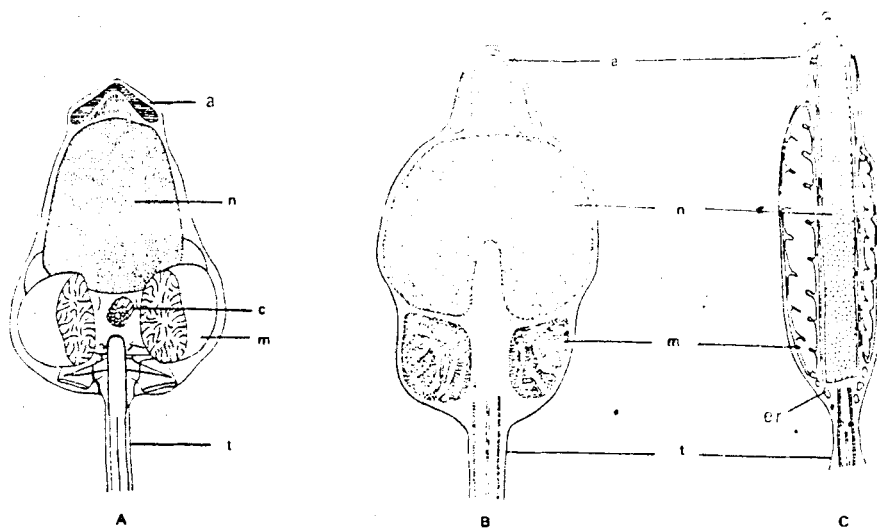


图1 原型精子以及文昌鱼和海鞘精子的结构

A. 原型精子(自 Franzén, 1987); B. 文昌鱼精子(自 Wickstead, 1975); C. 海鞘精子(自 Ursprung 和 Schabtach, 1964)。a. 顶体; c. 中心粒; m. 线粒体; n. 细胞核; t. 尾部; er. 内质网

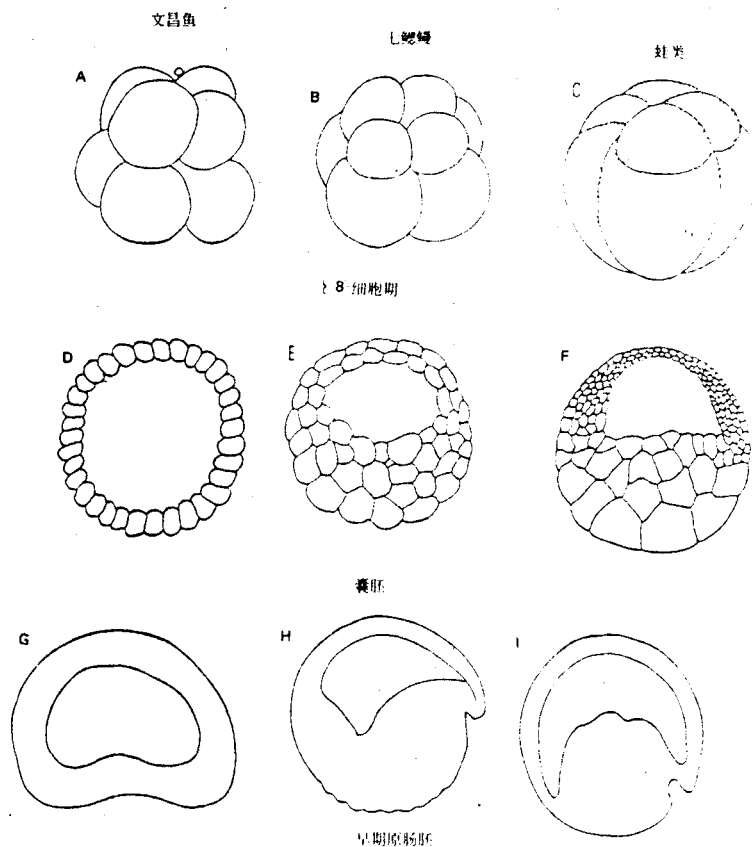


图2 文昌鱼、七鳃鳗和蛙类卵裂、囊胚及早期原肠胚的比较

特征(Franzén, 1987)。原型精子虽然不能作为系统特征应用,但是,具有原型精子的动物一般都保留着原始的

受精方式即生殖细胞排放到水中并在水中受精。文昌鱼不但具有典型的原型精子,而且是具有典型原型精子的最高等无脊椎动物和最低等的脊索动物。很可能,脊椎动物始祖具有和文昌鱼精子类似的原型精子。

2 早期发育

文昌鱼受精卵卵裂为全裂。第一次卵裂为经裂,卵裂面和成体左右对称面吻合,把身体分成左右两部分。第二次卵裂亦为经裂,卵裂平面和第一次的垂直,并和成体额切面吻合,把身体分成背部和腹部两部分(Conklin, 1932)。第三次卵裂为纬裂,卵裂平面位于赤道处。这和两栖类受精卵分裂情况基本一致。在圆口类如七鳃鳗中,虽然还不知道第一次和第二次卵裂平面是否分别与身体左右对称面和额切面相吻合,但是,其受精卵分裂方式和文昌鱼以及两栖类的颇为相似(图 2A、B、C)。

文昌鱼囊胚由一层细胞构成,中间为囊胚腔。圆口类和两栖类的囊胚虽然由两层或两层以上的细胞构成,但都有一个囊胚腔。圆口类和两栖类的囊胚腔不像文昌鱼的那样位于中央,而是偏向动物极半球(Hildebrand, 1982)。文昌鱼卵子为少黄卵,卵裂不但为全裂,而且裂球大小基本一致,动物极和植物极裂球分裂速度基本相同,所以,形成的囊胚腔位于中央。圆口类和两栖类卵子为中黄卵,卵裂虽然也为全裂,但由于植物极裂球含有较多卵黄,影响卵裂速度,裂球分裂速度较慢,且裂球体积较大。相应地,形成的囊胚腔位于动物极半球(图 2D、E、F)。

文昌鱼和圆口类以及两栖类原肠形成过程中都有细胞内陷。不同的是文昌鱼胚胎由于内胚层细胞含卵黄少,原肠作用主要是内陷,辅以内卷和外包,而圆口类和两栖类胚胎内胚层细胞含卵黄较多,细胞运动受到一定影响,原肠作用主要是内卷和外包,辅以内陷(图 2G、H、I)。

由上述可见,文昌鱼早期胚胎发育和圆口类及两栖类有许多相似之处。文昌鱼卵子为少黄卵,圆口类和两栖类的卵子为中黄卵,它们的卵裂都为全裂。据认为脊椎动物始祖卵子可能和文昌鱼卵一样,也为少黄卵(Hildebrand, 1982)。但是,现存的大多数鱼类、爬行类、鸟类和哺乳类单孔目动物的卵子都为多黄卵。多黄卵因所含卵黄量过多,卵裂时分裂沟无法穿透全卵,所以卵裂都为部分卵裂。由卵裂产生的细胞构成胚盘(blastoderm)。胚盘通过一狭窄的腔和不分裂的卵黄分开。卵黄为胚胎提供营养,使其发育到足以靠自己摄取食物而生存的阶段。哺乳类真兽亚纲的动物通过胎盘(placenta)为胚胎提供营养,不再需要卵黄,因而它们的卵子又变成

少黄卵,卵裂也变为全裂,且裂球大小一致。多黄卵和哺乳动物次生少黄卵发育的胚胎的原肠作用比较复杂,但是,它们的中胚层形成的机制是相同的,体腔的形成方式也一样,均为裂体腔法(Hildebrand, 1982)。

综上所述,不难看出文昌鱼和脊椎动物早期胚胎发育在卵裂、囊胚形成和原肠作用等方面,有许多共同点。

下面想着重谈一下文昌鱼胚胎发育过程中,中胚层的起源问题。据认为,所有脊椎动物胚胎的中胚层都是在发育早期,由内胚层细胞诱导与其紧挨着的外胚层细胞形成的(Nieuwkoop & Sutasurya, 1979)。文昌鱼如果是脊椎动物始祖有直接关系,那么,可以假设在文昌鱼胚胎发育过程中,中胚层的形成也应和脊椎动物中胚层形成机制一样,是外胚层细胞在内胚层细胞诱导下形成的。

文昌鱼 32-细胞期胚胎由四层细胞组成,每层 8 个细胞。组成文昌鱼 32-细胞期胚胎的四层分裂球由动物极到植物极分别称为 an_1 、 an_2 、 veg_1 和 veg_2 。裂球分离实验结果表明: an_1 主要形成表皮; an_2 除形成表皮外,还有 2/3 的例子形成中胚层组织; veg_1 主要形成脊索和肌肉,偶尔也形成些外胚层或内胚层结构; veg_2 只形成内胚层细胞(Tung *et al.*, 1959)。虽然每层裂球都具有一定的发育命运,但是,裂球重组实验表明它们都具有很强的调整能力。 $an_1 + veg_2$ 和 $an_2 + veg_2$ 都能形成完整幼虫(Tung *et al.*, 1960)。据此,童第周等认为: veg_2 在 an_1 诱导下,可以形成脊索和肌肉;脊索又影响上面覆盖的外胚层形成神经系统。尚真如此,文昌鱼胚胎发育中中胚层的起源和脊椎动物的就明显不同。不过,Nieuwkoop 等(1979)对童第周实验结果重新作了解释,并认为文昌鱼胚胎的中胚层的形成仍然是由内胚层细胞诱导外胚层细胞产生的。因此,有关文昌鱼胚胎中胚层形成的机制问题,目前仍无定论。我们正在对这一问题进行深入探讨。我们相信,对于文昌鱼胚胎中胚层形成机制的探讨将有助于我们了解文昌鱼和脊椎动物之间的亲缘关系。

3 神经管、脊索和鳃裂的形成

原索动物到脊椎动物的进化,关键是脊索、神经管和鳃裂的出现。因此,我们将文昌鱼神经管、脊索和鳃裂的形成突出出来单独加以讨论。

3.1 神经管

神经管由神经板发展而成,而神经板来自外胚层细胞。原肠胚背部的外胚层细胞在紧挨其下的脊索诱导下(童第周等, 1961; 1964)先变扁平,细胞层加厚形成神经板,接着从胚胎后端的胚孔处开始向前,神经板中央下陷,两侧出现两条纵褶即神经褶(neural folds)。在神经褶

海洋科学

形成初期,其边缘仍与表皮层细胞相连。随着神经褶向上在背中线处合并而形成神经管,神经褶便与表皮层脱离,表皮层向上伸展,并由后向前在背中线处合拢,结果表皮层把神经管覆盖起来(Conklin, 1932; 图 3A、B、C)。

神经褶的合并首先在第一对体节处完成,然后向前向后继续合并。在后面,神经管不闭合,而与胚孔相通,形成所谓的神经肠管(neurenteric canal)。神经肠管存在的意义尚不明确,但在鱼类、两栖类、鸟类以至人类胚胎发生中均可见到这一结构(金德祥, 1958; 张天荫, 1980)。神经管的前端也保留有一孔,开口于体外,称为前神经孔(anterior neuropore)。前神经孔在两栖类胚胎中也出现(曲漱惠等, 1980)。

文昌鱼神经管是在位于其下面的脊索诱导下形成

的。这和两栖类可能还有圆口类等脊椎动物胚胎发育中神经管形成的机制十分相似。脊索诱导背部外胚层形成神经组织是从脊索动物开始出现的代表脊椎动物一大特征的现象。

3.2 脊索

文昌鱼原肠胚原肠背部中央大约由四行细胞组成的一条窄长的细胞带构成脊索板(Notochordal plate),其两侧为中胚层带。当中胚层带与其内侧的脊索板及其外侧的内胚层带脱离时,脊索板暂时与内胚层相连接。随后,脊索板中部向背面拱起形成一沟即脊索沟。脊索沟凹面朝向原肠腔,并逐渐与两侧相连的内胚层细胞脱离而形成棒状的脊索(Conklin, 1932; 张天荫, 1980; 图 3A、B、C)。

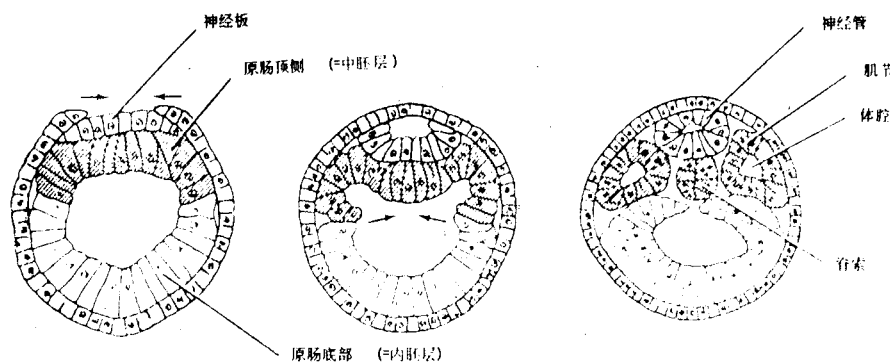


图3 文昌鱼神经管、脊索和体腔的形成(自 Jollie, 1973)

文昌鱼脊索是从原肠背部中央部分形成,中胚层是从原肠背部两侧部分向外翻出形成囊而产生的。原肠的其余部分构成内胚层。圆口类和两栖类原肠胚的原肠顶盖和文昌鱼的一样,都和脊索以及中胚层的形成有密切关系(Jollie, 1973)。

由原肠背部两侧外翻产生中胚层囊即体腔。体腔的这种形成方式称为肠体腔法(Enterocoely)。虽然脊椎动物的体腔都是通过肌节腔化(Cavitation)即裂体腔法(Schizocoely)形成的,但是,在圆口类七鳃鳗发育过程中,前面几对体腔的形成却和文昌鱼一样,通过肠体腔法产生。这里,顺便提一下,圆口类七鳃鳗的消化道和文昌鱼的基本一样,从咽部到泄殖腔为一直管,基本没有什么分化。两者的生活方式和滤食机制也基本相似。

3.3 鳃裂(Gill clefts 或 Gill slits)

所有脊椎动物胚胎发育过程中都有鳃裂形成。文昌鱼咽部两侧有许多鳃裂。当文昌鱼孵化不久,口开于身

体前端左侧时,第一个初级鳃裂在腹中部位置形成,并向身体右侧延伸(Just 等, 1981)。随着文昌鱼幼体逐渐长大,身体右侧初级鳃裂数目逐渐增加。同时,初级鳃裂先逐渐向腹部再向身体在侧移动。次级鳃裂则在初级鳃裂上缘产生并向下延伸,位于身体右侧。文昌鱼幼体右侧的初级鳃裂为 13~14 个,当它们移动到左侧的时候,第一和第十个以后的鳃裂逐渐萎缩消失。与此同时,左侧的次级鳃裂也发展到 8 个。除左右第一个鳃裂外,其余鳃裂都长出舌状鳃条,并且左右数目相等。继第 8 个鳃裂形成后,又陆续长出一些鳃裂(金德祥, 1958)。鳃条上具有纤毛。纤毛的摆动可以使水流入,经鳃裂到围鳃腔,再从围鳃排出体外。在水流进出的过程中,文昌鱼就可进行呼吸和摄食。文昌鱼鳃裂及其上面的纤毛起源于内胚层(张天荫, 1980)。有趣的是,圆口类起呼吸作用的鳃丝(Gill filaments)也起源于内胚层。

从上面所述可以看出,在文昌鱼胚胎发育过程中,

其神经管、脊索和鳃裂的形成与脊椎动物的有许多相同或相似之处。

3.4 头部形成(Cephalization)

文昌鱼和脊椎动物最大不同点之一是文昌鱼缺乏头部如脑和感觉器官眼等。Berrill(1987)认为:文昌鱼基本上是营定居生活的滤食动物。它具有复杂而且分节的神经肌肉系统,这一点远超出其本身需要。这很可能说明文昌鱼曾经一度具有与其运动系统相称的脑和感觉

器官。换言之,文昌鱼在进化过程中失去了头部。不过,Nieuwkoop等(1983)在详细分析各类脊椎动物脑的形成后认为:脊椎动物胚胎的头部是由原肠顶盖脊索中胚层诱导背部外胚层形成的。这一头部形成作用在系统演化过程中是逐渐出现的。“这种作用在头索动物尚未开始,在圆口类尚处于初级阶段,而在有颌鱼类、两栖类、爬行类、鸟类和哺乳类中,这种作用从原肠顶盖前部向后逐渐延伸”。

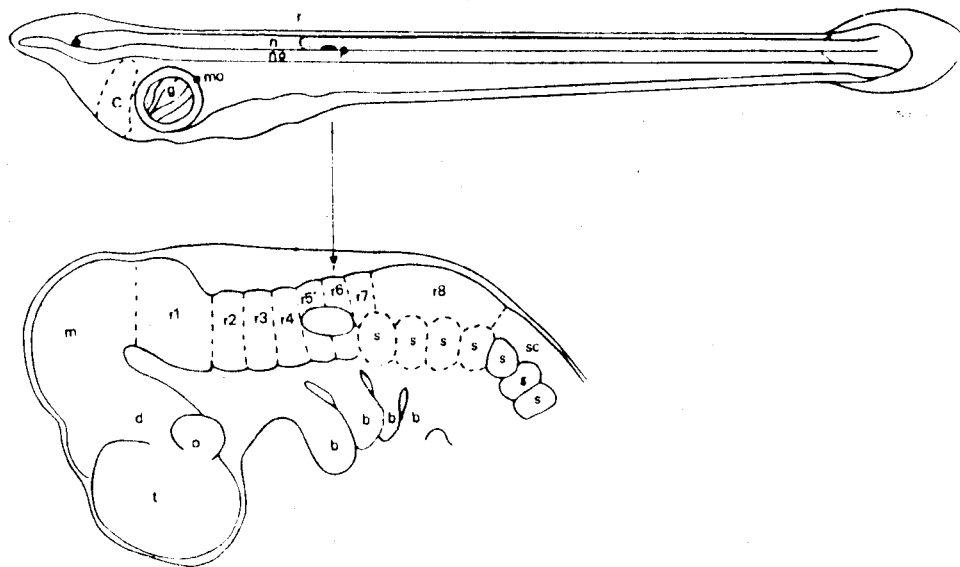


图4 Hox基因在文昌鱼和脊椎动物胚胎中的表达区域

A. $3\frac{1}{2}$ 天文昌鱼幼虫;B. 鸡胚(代表脊椎动物胚胎,用来和文昌鱼胚胎比较)。双箭头表示 AmphiHox3 在文昌鱼神经组织表达的前端界面(第一色素点)和脊椎动物同源基因表达的前端界面(4/5 菱脑原节之间)。很可能两者表达的区域具有同源性。b. 鳃弓;c. 棒状腺;d. 间脑;g. 第一鳃裂;m. 后脑;m. 口;n. 神经索;no. 脊索;p. 色素点;r1-8. 菱脑原节;s. 肌节;sc. 脊髓;t. 端脑。(自 Holland 等,1992)

新近,Holland 等(1992)对文昌鱼神经管和脊椎动物脑之间的关系从分子水平作了很有意义的探讨。脊椎动物 Hox-1,-2,-3 和-4(Hox A,B,C 和 D)基因簇在系统演化上和果蝇的同源异型基因复合体(HOM-C)有关。越来越多的证据表明:Hox 基因簇的表达可作为脊椎动物胚胎前后轴的分子标志。文昌鱼的 Hox3 基因(Amphi-Hox3)DNA 序列表明它和哺乳类小鼠的一组基因 Hox-A3、HoxB3 和 HoxD3 同源。用文昌鱼神经胚(受精后 13h 和受精后 20h)以及幼虫(3d)作整体原位杂交表明:AmphiHox3 表达只限于从前端第四、五对肌节也就是第一色素点开始向后的神经沟或神经管部分以及胚体最后端的中胚层中。随着发育进行体轴不断延长,神经管不

断向后部延伸,AmphiHox3 的表达也随神经管向后延伸而延伸,但前端总是限定在第一色素点处。有趣的是 AmphiHox3 的表达并不随肌节的增加而延伸,它的表达总是限于胚体后端的中胚层中,从不在肌节中表达。因此,AmphiHox3 在从神经管前端至第一色素点处这一段神经管区域不表达,在肌节中也不表达。脊椎动物多数 Hox 基因包括和 AmphiHox3 同源的基因的表达也存在类似情况,即在神经管前面一段区域不表达(图4)。这表明:文昌鱼神经管前面一段即从前端至第一色素点的区域可能和脊椎动物的脑具有空间上的同源性(Spatial homology)。两种动物体型结构(Body plan)在空间上的同源性常常可以用来推测它们的演化过程。因此,脊椎动

物的脑可能不像以前所推测的那样(Stieda, 1873, 见 Willey 1894 综述), 仅仅是从类似于文昌鱼的祖先的“脑泡”(Cerebral vesicle)变异或增生形成的, 而是从前端至第一色素点处这一较大区域的神经管演化而来。

上面, 我们从生殖和发育生物学的角度, 讨论了文昌鱼和脊椎动物起源之间的关系问题。文昌鱼和脊椎动物的胚胎发育在诸如生殖细胞起源、卵裂、囊胚形成、原肠作用和器官发生等方面, 有很多相似之处。因此, 文昌鱼和脊椎动物亲缘关系是比较近的, 它很可能是脊椎动物始祖的现存代表。

参考文献

- [1] 方永强, 1993. 科学通报 38: 840~842.
- [2] 方永强等, 1993. 动物学报 39: 431~435.
- [3] 方永强等, 1984. 实验生物学报 17: 115~117.
- [4] 曲漱惠等, 1980. 动物胚胎学. 人民教育出版社, 204.
- [5] 张天荫, 1980. 动物胚胎学. 人民教育出版社, 178~188.
- [6] 张致一等, 1982. 科学通报 27: 1 233~1 234.
- [7] 金德祥, 1958. 文昌鱼. 福建人民出版社, 1~56.
- [8] 童第周等, 1961. 实验生物学报 7: 263.
- [9] 童第周等, 1964. 实验生物学报 9: 211.
- [10] Berrill, N. J., 1987. *Internal. J. Invert. Reprod. & Dev.* 11: 1-14.
- [11] Boveri, D. T., 1892. *Anat. Anz.* 7: 170-181.
- [12] Conklin, E. G., 1932. *J. Morph.* 54: 69-151.
- [13] Franzén, A., 1956. *Zool. Bidr. Uppsala* 31: 355-482.
- [14] Franzén, A., 1987. *Reprod. Mar. Invert.* 9: 1-47, Blackwell, Palo Alto.
- [15] Garstang, W., 1894. *Zool. Anz.* 17: 119.
- [16] Hildebrand, M., 1982. *Anal. Vert. Struc.* John Wiley & Sons, New York.
- [17] Holland, P. W. *et al.*, 1992. *Develop.* 116: 653-661.
- [18] Hubrecht, A. A. W., 1883. *Quart. J. Micr. Sci.* 23: 349.
- [19] Jollie, M., 1982. *Zool. J. Linn. Soc.* 75: 167-188.
- [20] Jollie, M., 1973. *Chordate Morphology.* Robert E. Krieger Publishing Company. N. Y. 193-216.
- [21] Nieuwkoop, P. D. & L. A. Sutasurya, 1979. *Primordial Germ Cells in the Chordates: Embryogenesis and Phylogenesis*, Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- [22] Nieuwkoop, P. D. & L. A. Sulasurya, 1983. *Develop. & Evol.* 123-135.
- [23] Retzius, G., 1904. *N. F.* 11: 1-32.
- [24] Retzius, G., 1905. *N. F.* 12: 79-115.
- [25] Robertson, J. D., 1957. *Biol. Rev. Cambr. Philos. Soc.* 32: 156-187.
- [26] Tjoa, L. T. & U. Welsch, 1974. *Cell Tissue Res.* 153: 175-187.
- [27] Tung, T. C. *et al.*, 1959. *Acta Biol. Exp. Sinica*, 6: 191-210.
- [28] Tung, T. C. *et al.*, 1960. *Sci. Sinica*, 9: 119-141.
- [29] Ursprung, H. and E. Schabtiach, 1964. *J. Exp. Zool.* 156: 253-268.
- [30] Waddington, C. H., 1956. *Principles of Embryology*, George Allen & Unwin Ltd., London.
- [31] Willey, A., 1894. *Amphioxus and the Ancestry of the Vertebrates*. New York: MacMillan.