

## บทปฏิบัติการที่ 2

### เรื่อง การปฏิสนธิและการเจริญขั้นต้น

**บทนำ** การปฏิสนธิ (fertilization) หมายถึง การรวมตัวของนิวเคลียสสเปิร์ม และไข่ เป็นผลให้เกิดการเจริญ (development) ของไข่ เกิดเป็นสิ่งมีชีวิตตัวใหม่ที่มีลักษณะเหมือนพ่อแม่ การปฏิสนธิประกอบด้วยขบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการเข้าหา (approach) ไข่ของสเปิร์ม การเคลื่อนผ่าน (penetration) เยื่อหุ้มไข่ และไซโทพลาสซึมของสเปิร์ม รวมทั้งการรวมตัวของโปรนิวเคลียส (pronucleus) จากสเปิร์มและไข่

เมื่อสเปิร์มเคลื่อนผ่านเยื่อหุ้มไข่ (vitelline membrane) ไข่เกิดการเปลี่ยนแปลงโดยไซโทพลาสซึมจะยกตัวเป็น fertilization cone ล้อมรอบหัวสเปิร์มและดึงสเปิร์มเข้าภายใน ต่อมาเกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มไข่ ทำให้เกิดช่องว่างระหว่างเยื่อหุ้มกับไข่ เรียก perivitelline space เยื่อหุ้มระยะนี้เรียกว่า fertilization membrane ทำหน้าที่ป้องกันสเปิร์มตัวอื่นเข้าผสมกับไข่อีก

ไข่ของสัตว์บางชนิดยังไม่เจริญเต็มที่ (immature egg) เป็นเซลล์ไข่ที่สมบูรณ์ (mature ovum หรือ egg) จะถูกกระตุ้นจากสเปิร์มให้เกิดการแบ่งตัวต่อไปเป็นเซลล์ไข่ที่สมบูรณ์ มีจำนวนโครโมโซมในนิวเคลียส เป็น haploid (n) ต่อมานิวเคลียสของไข่และสเปิร์มจะเกิดการรวมตัวภายในไข่ได้เป็น fertilized egg หรือไซโกตที่มีจำนวนโครโมโซมเป็น diploid (2n) ไซโกตจะเกิดการเจริญขั้นต่อไปตามลำดับ ได้เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะเหมือนพ่อแม่ ทุกประการ

ไซโกตจะมีการเจริญต่อไปโดยการแบ่งตัวแบบมีโทซิส (mitosis) อย่างรวดเร็ว จากหนึ่งเซลล์เป็นสองเซลล์ และเซลล์ที่ได้จะแบ่งตัวต่อไปเรื่อย ๆ จนได้เป็นเอ็มบริโอที่มีจำนวนเซลล์มากมาย การแบ่งของไซโกตเช่นนี้ เรียกว่า คลีเวจ (cleavage) หรือ segmentation division เซลล์ที่ได้จากการแบ่งคลีเวจแต่ละเซลล์ เรียกว่า บลาสโตเมียร์ (blastomere) หรือ คลีเวจเซลล์ (cleavage cell) เอ็มบริโอระยะที่มีบลาสโตเมียร์จำนวนมาก ดูคล้ายลูกน้อยหน้า เรียกว่า มอรูลา (morula) อยู่ภายใน fertilization membrane

ต่อมาเอ็มบริโอเริ่มจัดเรียงให้บลาสโตเมียร์อยู่รอบนอกเพื่อสร้างช่องว่างบลาสโตซีล (blastocoel) ตรงกลาง ชั้นของบลาสโตเมียร์ที่ล้อมรอบช่องบลาสโตซีล เรียกว่า บลาสโตเดอร์ม (blastoderm) ขบวนการจัดเรียงตัวเพื่อสร้างช่องว่างเรียกว่าบลาสตูลชัน (blastulation)

เอ็มบริโอระยะนี้จึงเป็นรูปกลมที่มีช่องว่างตรงกลางเรียกว่าระยะบลาสตูลลา (blastula stage)

ต่อจากรยะบลาสตูลลา เอ็มบริโอมีการเคลื่อนของเซลล์เพื่อสร้างเป็นชั้นของเนื้อ

เยื่อ (germ layer) จำนวนสามชั้น ได้แก่ เนื้อเยื่อชั้นนอก (ectoderm หรือ ectodermal germ layer) เนื้อเยื่อชั้นกลาง (mesoderm หรือ mesodermal germ layer) และเนื้อเยื่อชั้นใน (endoderm หรือ endodermal layer) การสร้างชั้นของเนื้อเยื่อเหล่านี้เกิดจากการยุบตัวหรือบุ๋มตัว (invagination) ของกลุ่มบลาสโตเมอร์ที่อยู่ทางด้านล่างของเอมบริโอทำให้เกิดท่อภายใน ท่อนี้เรียกว่า gastrocoel หรือ archenteron หรือ primitive gut ตำแหน่งที่ท่อนี้เปิดสู่ภายนอกเอมบริโอเรียก บลาสโตพอร์ (blastopore) เอมบริโอระยะนี้คือระยะแกสตรูลา (gastrula stage) ขบวนการเคลื่อนที่ของบลาสโตเมอร์เพื่อสร้างเอมบริโอระยะแกสตรูลาคือ แกสตรูเลชัน (gastrulation) เนื้อเยื่อทั้งสามชั้นนี้ จะเกิดการเจริญเปลี่ยนแปลง (differentiation) เป็นอวัยวะ (organ) ของร่างกาย ขบวนการเจริญเพื่อสร้างอวัยวะต่าง ๆ เรียกว่า organogenesis ซึ่งมีการเจริญเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อที่ทำให้เกิดความซับซ้อน มีลักษณะที่เฉพาะมากขึ้น รวมทั้งการเจริญเติบโตขยายขนาด (growth) ด้วย

เอมบริโอระยะที่มีการสร้างอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ระยะตัวอ่อน (larva stage) ซึ่งตัวอ่อนจะมีการเจริญที่เรียกว่า metamorphosis ให้มีรูปร่างลักษณะคล้ายพ่อแม่มากขึ้น อวัยวะต่าง ๆ สามารถทำงานได้และเข้าสู่ระยะของตัวเต็มวัย (mature animal) ในที่สุด

**วัตถุประสงค์** บทปฏิบัติการนี้มีวัตถุประสงค์ให้นักศึกษา

1. อธิบายความหมาย และลำดับขั้นตอนของการปฏิสนธิ การเจริญขั้นต้นโดยใช้ดาวทะเล (sea star) และเม่นทะเล (sea urchin) เป็นตัวอย่างในการศึกษา
2. เปรียบเทียบการปฏิสนธิ การเจริญขั้นต้นของดาวทะเล และเม่นทะเลกับสัตว์ชนิดอื่น ในบทปฏิบัติการต่อ ๆ ไปได้

**วัสดุอุปกรณ์**

1. รูปปั้น และภาพยนตร์แสดงการปฏิสนธิ และการเจริญของดาวทะเล ตั้งแต่ระยะของไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิ จนถึงระยะแกสตรูลา
2. สไลด์ถาวร และภาพ แสดงการเจริญของดาวทะเล เม่นทะเลในระยะต่าง ๆ ตั้งแต่ไข่ที่ยังไม่มีการปฏิสนธิ การเจริญในระยะคลีเวล ระยะบลาสตูลา ระยะแกสตรูลา และระยะตัวอ่อน
3. กล้องจุลทรรศน์

**การศึกษา**

1. ศึกษาการเจริญขั้นต้นของดาวทะเล จากภาพยนตร์
  2. ศึกษาการปฏิสนธิของดาวทะเล เม่นทะเล จากสไลด์ถาวร และภาพ ตามหัวข้อต่อไปนี้
- ก. ไข่ที่ยังไม่มีการปฏิสนธิ (unfertilized egg) สังเกต**

การกระจายและปริมาณของอาหารสะสม (yolk) ในไซโตพลาสซึม  
vitelline membrane  
germinal vesicle (nucleus)  
nucleolus

ข. ไข่ที่ได้รับการผสม (fertilized egg) หรือไซโกต สั้งเกต  
fertilization membrane  
perivitelline space  
polar body

3. ศึกษาการเจริญขั้นต้นของดาวทะเล เม่นทะเล จากสไลด์ถาวร รูปปั้น และ  
ภาพ ดังนี้

ก. ระยะคลีเวจ

ระยะคลีเวจช่วงต้น สั้งเกต

แนวการแบ่งครั้งที่ 1,2,3 และ 4 ของเอมบริโอ ระยะ 2,4,8 และ 16 เซลล์  
blastomere (cleavage cell)

ระยะคลีเวจช่วงหลัง สั้งเกต

จำนวนและขนาดของ blastomere เปรียบเทียบกับระยะคลีเวจช่วงต้น

ข. ระยะบลาสตูลา สั้งเกต

blastocoel

เปรียบเทียบขนาด blastomere ในดาวทะเลและเม่นทะเล

blastomere

blastoderm

ค. ระยะแกสตรูลา สั้งเกต

gastrocoel (primitive gut หรือ archenteron)

blastopore

ectoderm

mesoderm

endoderm

ง. ระยะตัวอ่อน

จาก bipinnaria larva ของดาวทะเล สั้งเกต

ciliated band

stomodaeum

mouth

esophagus

stomach

intestine

coelomic pouch

anus

จาก *pluteus larva* ของเม่นทะเล สั้งเกต

larval arm

stomodaeum

mouth

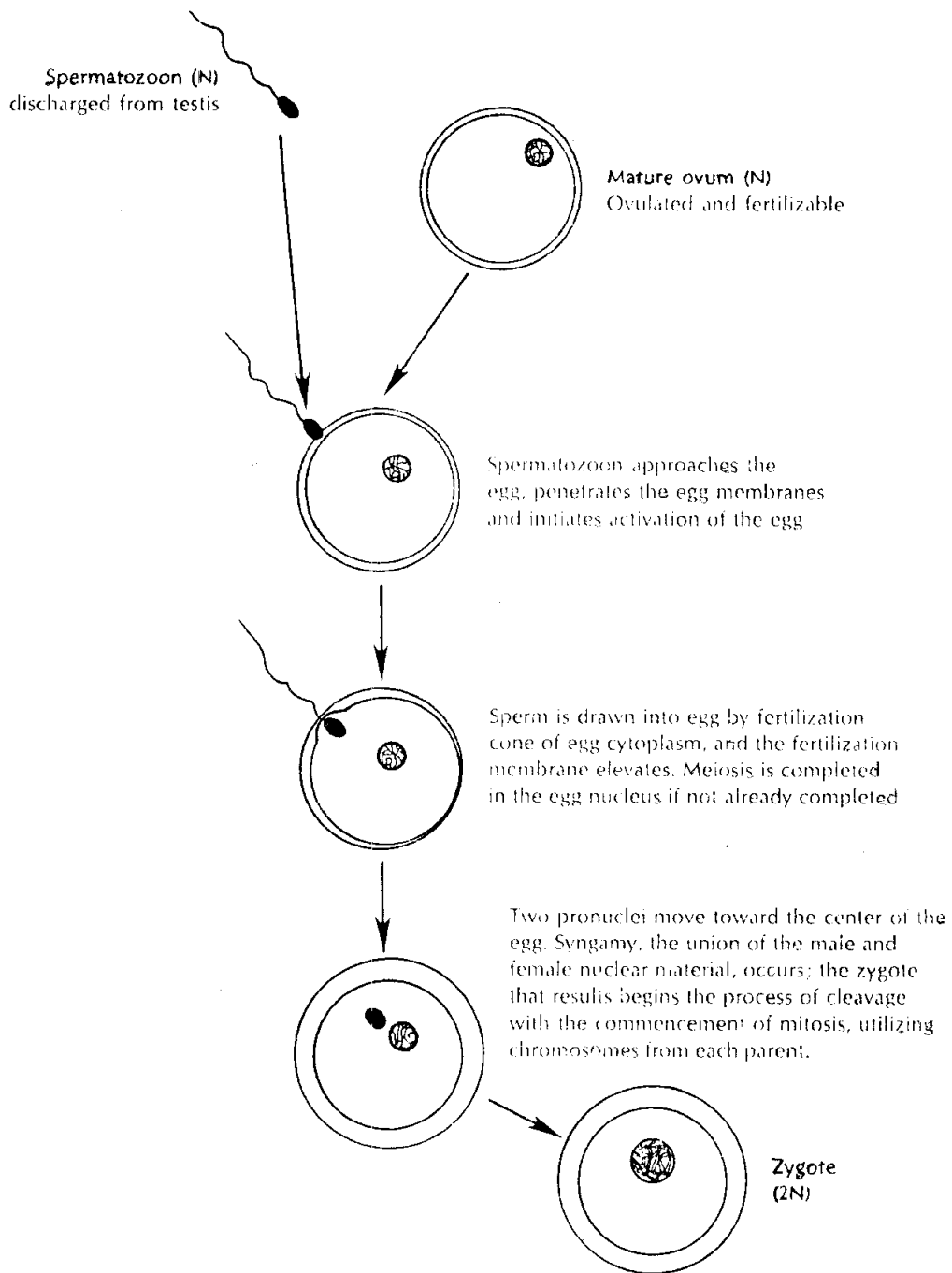
esophagus

stomach

intestine

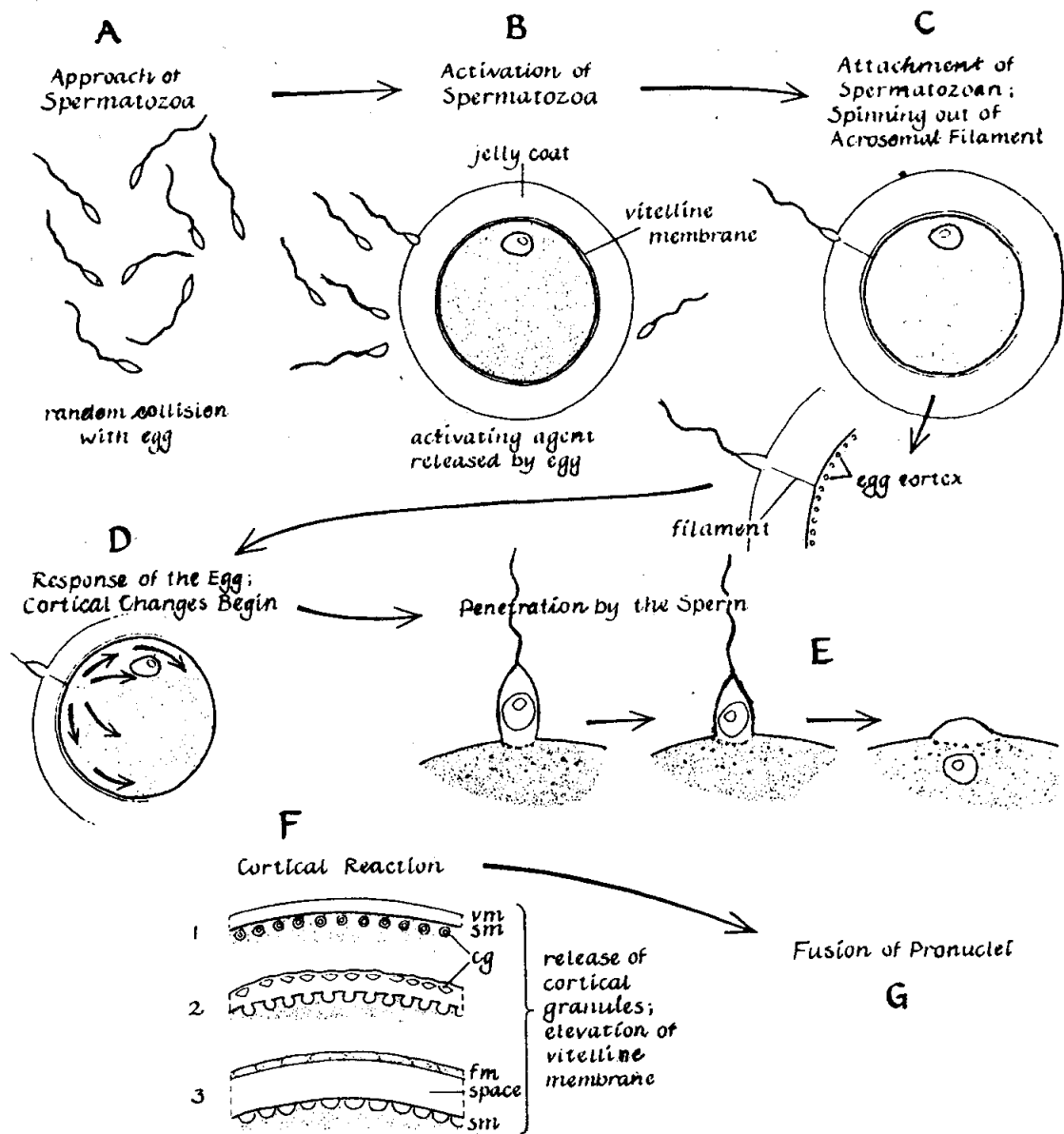
anus

coelom

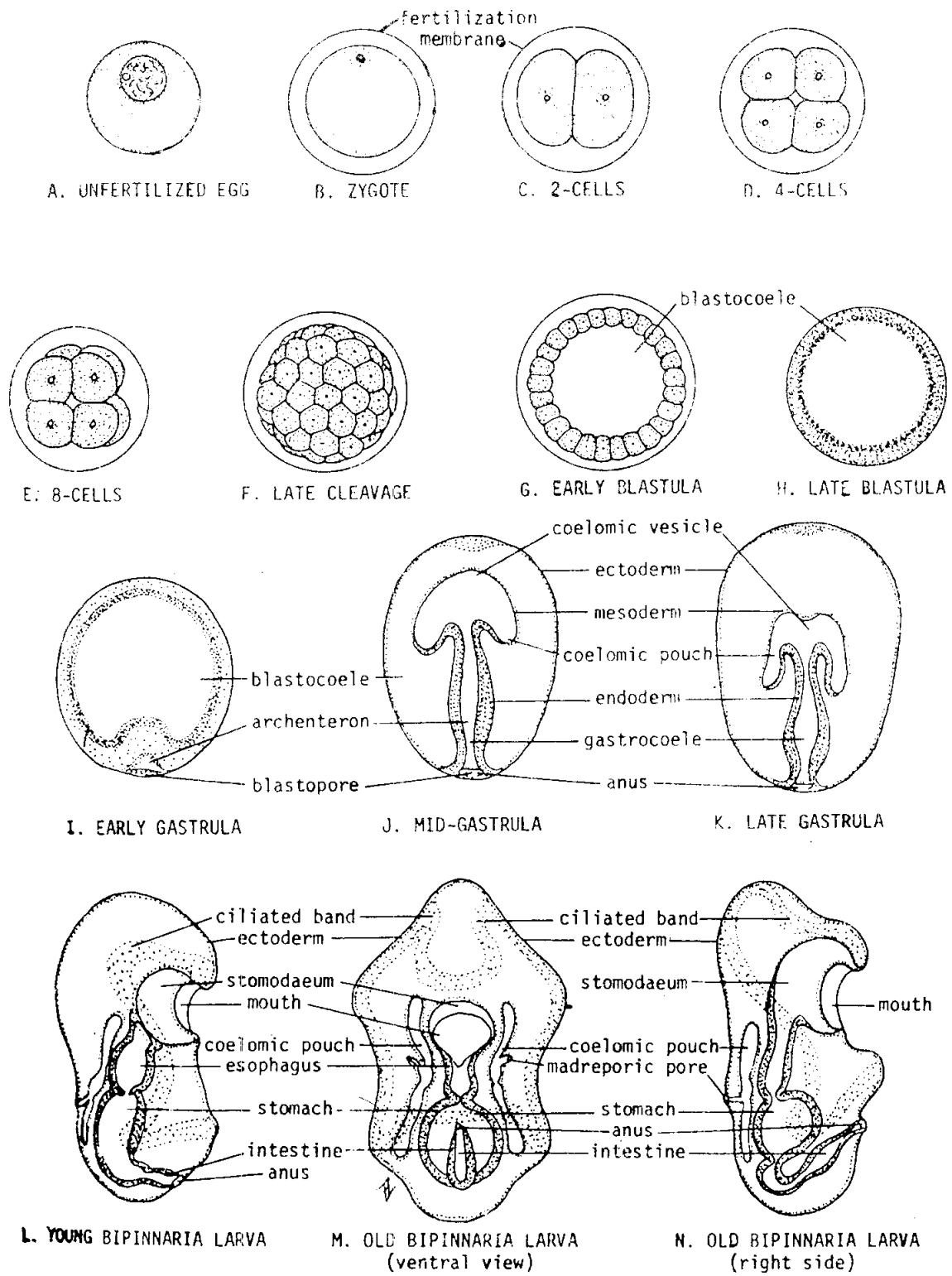


Generalized schematic presentation of fertilization.

ภาพที่ 2.1 แสดงเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นในการปฏิสนธิ  
(จาก Eichler, 1978)



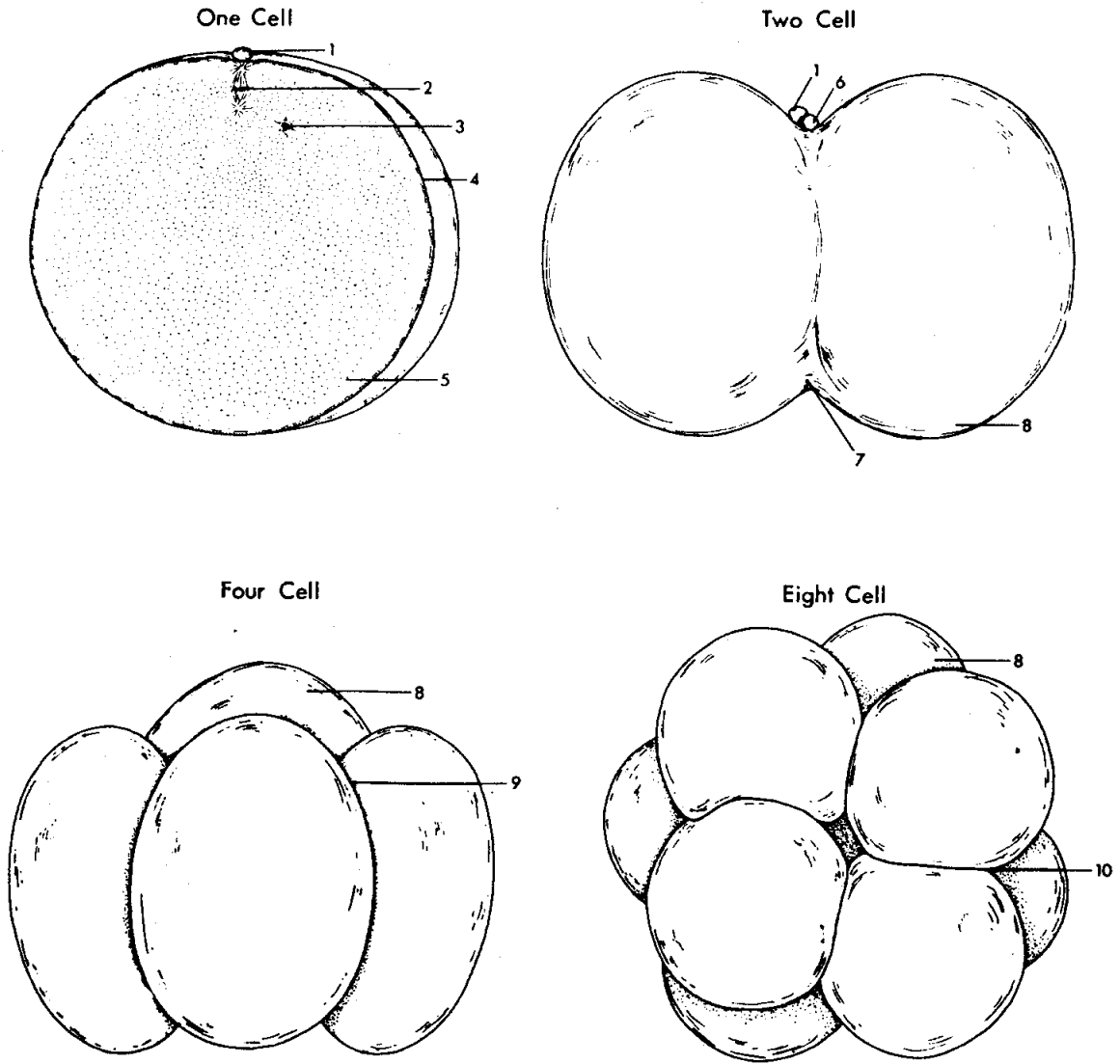
ภาพที่ 2.2 แสดงลำดับการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในเซลล์ไข่ เมื่อมีการปฏิสนธิ  
(จาก Spratt, 1971)



ภาพที่ 2.3 แสดงขั้นตอนการเจริญของดาวทะเล  
(จาก Lehman, 1977)

# STARFISH DEVELOPMENT 1.

## Cleavage



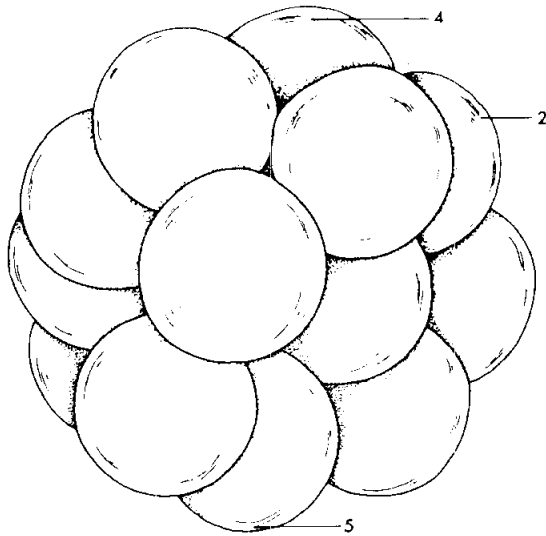
- 1. Polar body 1
- 2. Maturation spindle
- 3. Sperm nucleus
- 4. Cortex
- 5. Cytoplasm

- 6. Polar body 2
- 7. Cleavage furrow 1
- 8. Blastomere
- 9. Cleavage furrow 2
- 10. Cleavage furrow 3

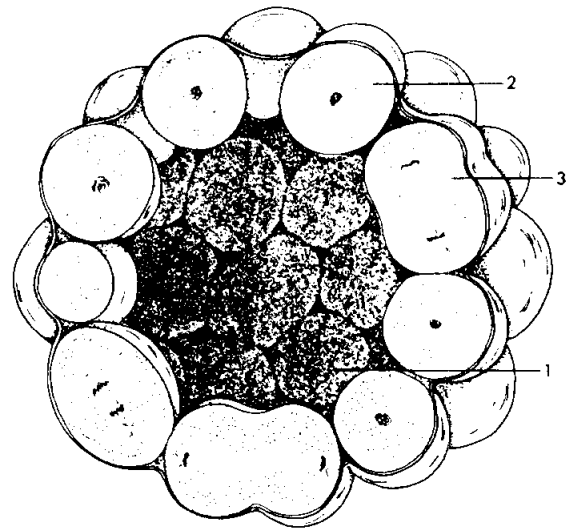


## STARFISH DEVELOPMENT 2.

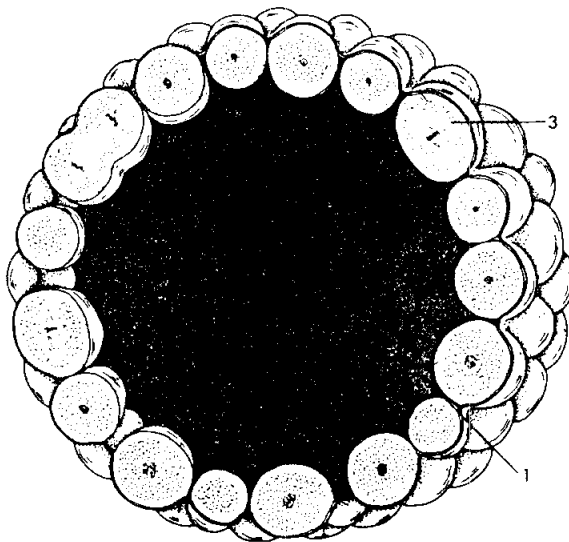
Sixteen Cell



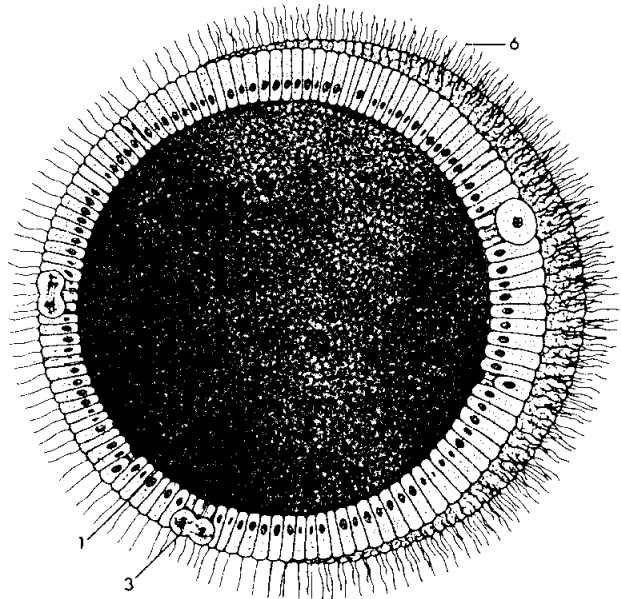
Thirty-two Cell



Early Blastula



Late Blastula



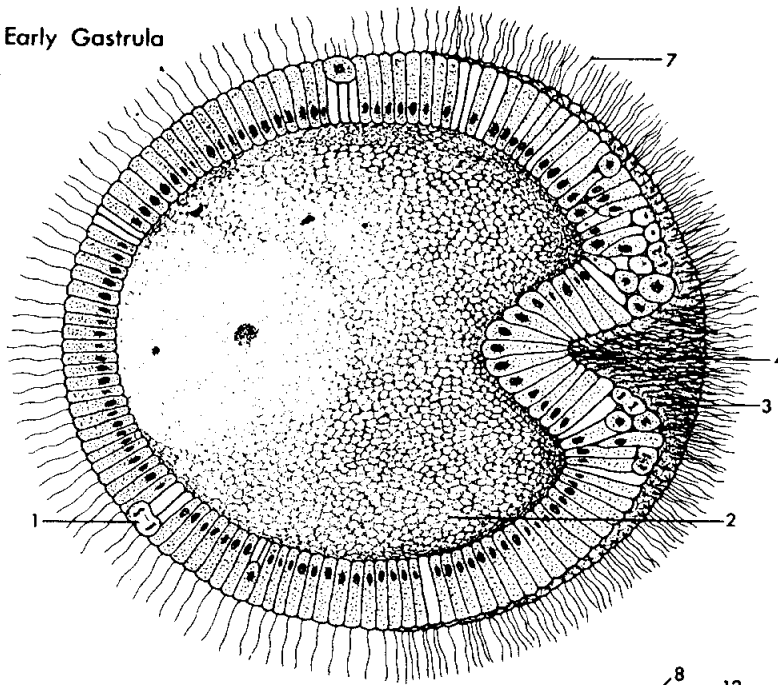
1. Blastocoel
2. Blastomere
3. Blastomere in mitosis

4. Animal pole
5. Vegetal pole
6. Cilia

# STARFISH DEVELOPMENT 3.

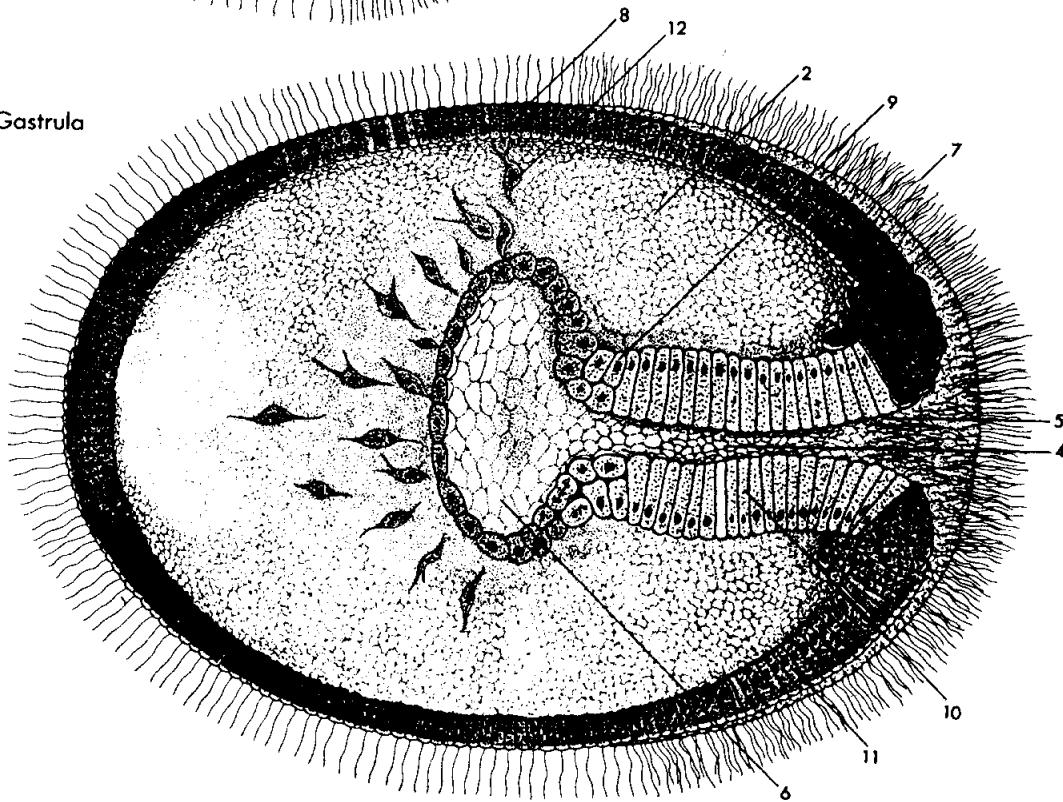
## Gastrula

Early Gastrula



1. Blastomere in Mitosis
2. Blastocoel
3. Early invagination
4. Archenteron
5. Blastopore
6. Archenteric vesicle
7. Cilia
8. Prospective oral region
9. Zone of mitotic activity
10. Endoderm
11. Ectoderm
12. Mesenchyme (mesoderm)

Late Gastrula



ภาพที่ 2.4 แสดงการเจริญขั้นต้นของดาวทะเล

A เอ็มบริโอ ระยะ 4 เซลล์

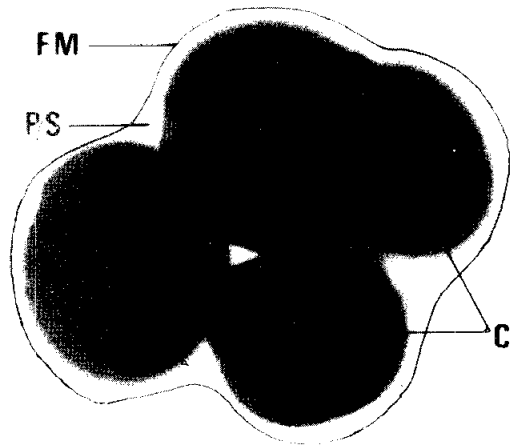
B เอ็มบริโอ ระยะคลื่นเวจช่วงต้น

คำอธิบายประกอบภาพ

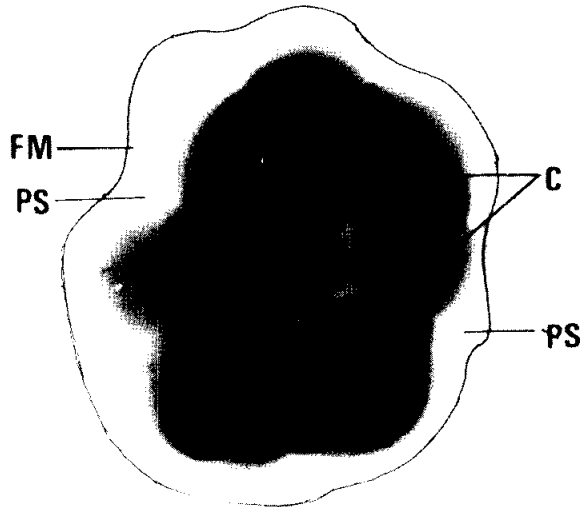
C cleavage cell (blastomere)

FM fertilization membrane

PS perivitelline space



A



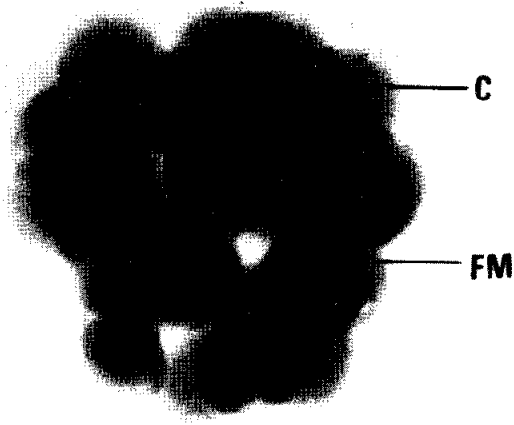
B

**ภาพที่ 2.5** แสดงการเจริญขั้นต้นของดาวทะเล

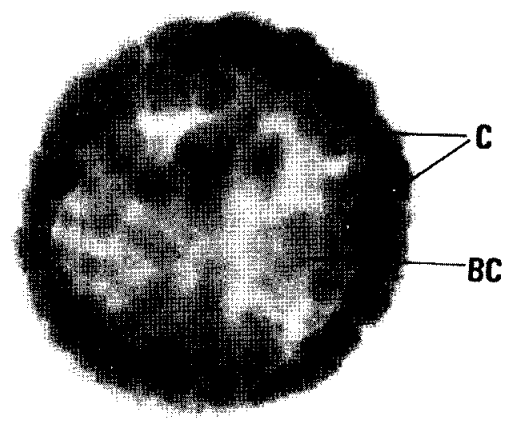
- C เอ็มบริโอ ระยะคลีเวจช่วงหลัง (morula)
- D เอ็มบริโอ ระยะบลาสตูลาช่วงต้น
- E เอ็มบริโอ ระยะบลาสตูลาช่วงหลัง

**คำอธิบายประกอบภาพ**

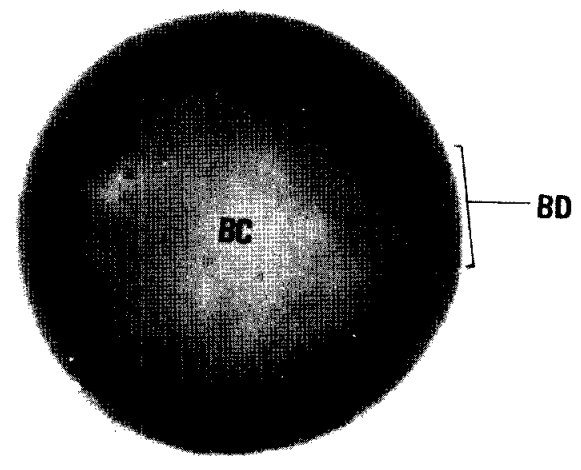
- BC blastocoel
- BD blastoderm
- C cleavage cell (blastomere)
- FM fertilization membrane



C



D



E

ภาพที่ 2.6 แสดงการเจริญขั้นต้นของดาวทะเล

F เอ็มบริโอ ระยะแกสตรูลาช่วงต้น

G เอ็มบริโอ ระยะแกสตรูลาช่วงหลัง (ตัวอ่อน bipinnaria ช่วงต้น)

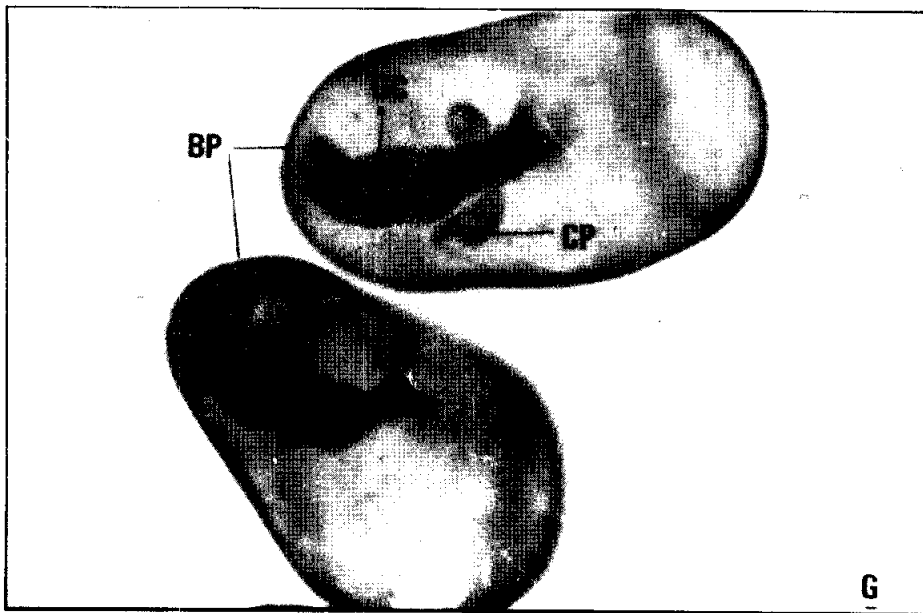
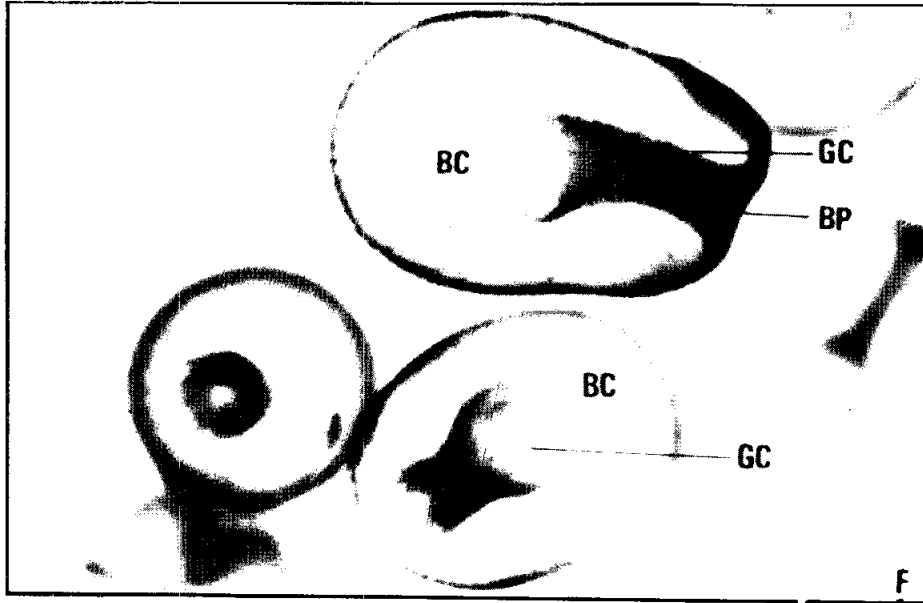
คำอธิบายประกอบภาพ

BC blastocoel

BP blastopore

CP coelomic pouch

GC gastrocoel (primitive gut, archenteron)





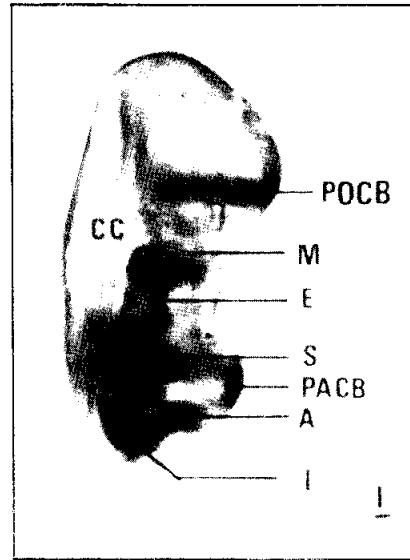
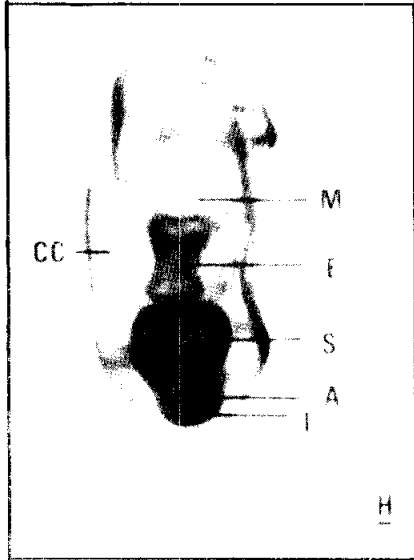
**ภาพที่ 2.7** แสดงการเจริญขั้นต้นของดาวทะเล

H, I ตัวอ่อน bipinnaria

J ดาวทะเลวัยรุ่น (young starfish)

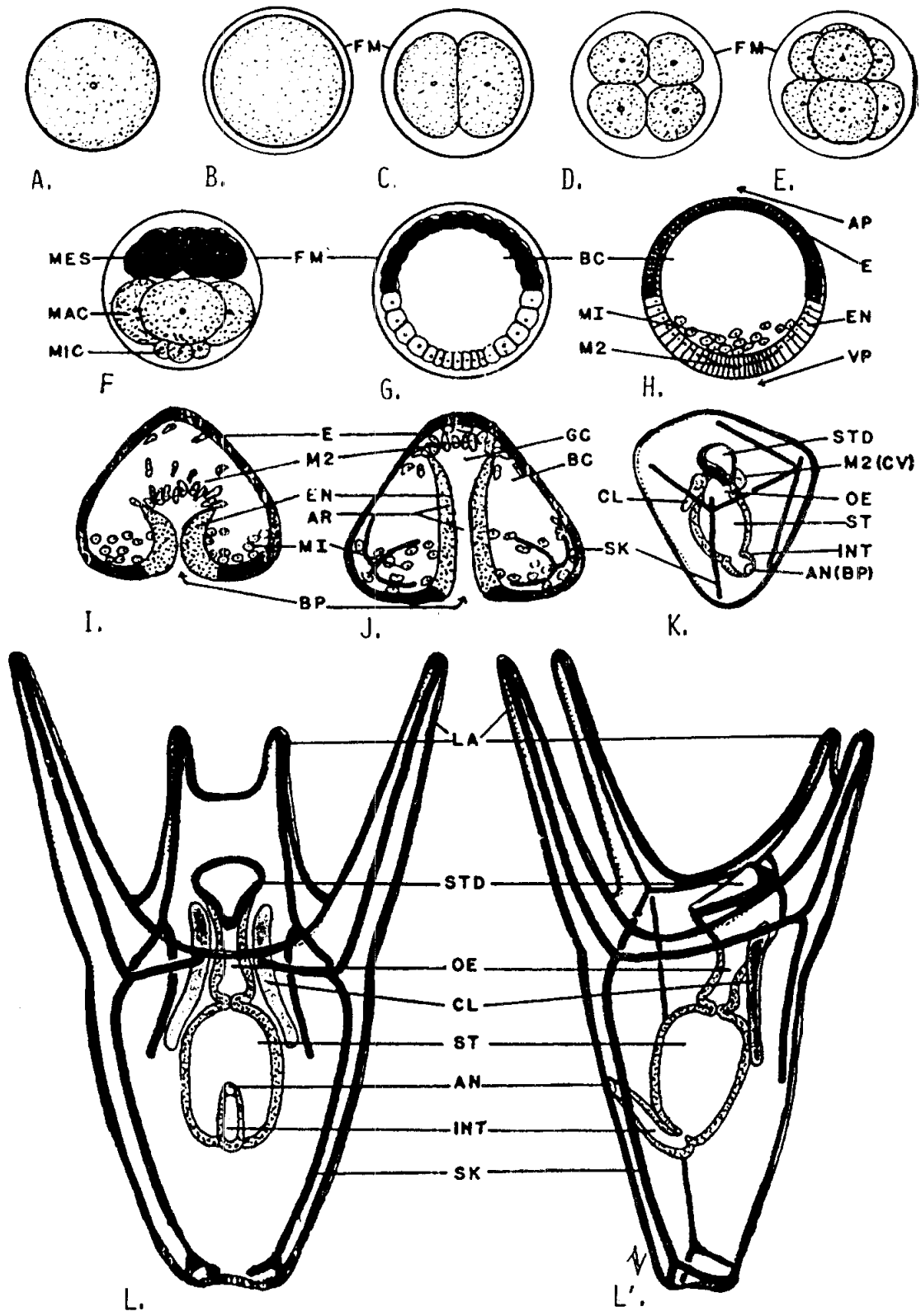
**คำอธิบายประกอบภาพ**

A	anus
CC	coelomic cavity
E	esophagus
I	intestine
M	mouth
PACB	preanal ciliated band
POCB	preoral ciliated band
S	stomach



คำอธิบายประกอบภาพที่ 2.8

A	Unfertilized egg	I	Early gastrula
B	Fertilized egg	J	Late gastrula with triradiate spicules
C,D,E	2,4,8 cell stages	K	Prism stage
F	16 cell stage with micromeres	L	Pluteus, ventral view
G	Prehatching blastula	L'	Pluteus, left side
H	Mesenchyme blastula		
AN	anus	LA	larval arms
AP	animal pole (anterior)	MI	primary mesoderm
AR	archenteron	M2	secondary mesoderm
BC	blastocoele	MAC	macromeres (mesentoblasts)
BP	blastopore	MES	mesomeres (ectoblasts)
CL	coelom	MIC	micromeres (primary mesoblasts)
CV	coelomic vesicle	OE	esophagus
E	ectoderm	SK	skeletal rods
EN	endoderm	ST	stomach
FM	fertilization membrane	STD	stomodaeum
GC	gastrocoele	VP	vegetal pole (posterior)
INT	intestine		



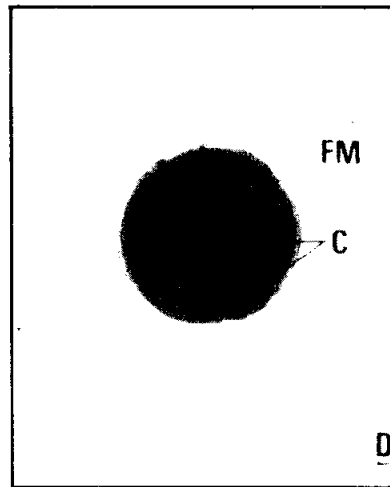
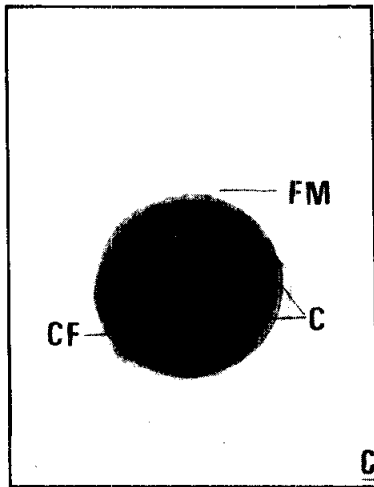
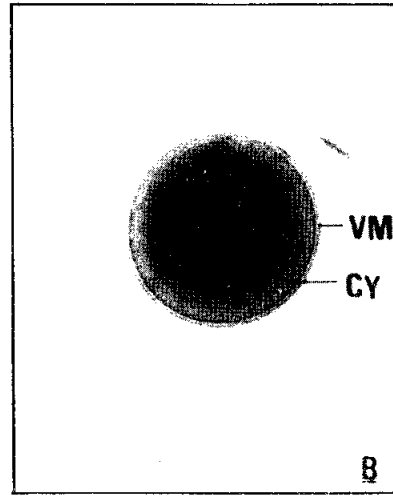
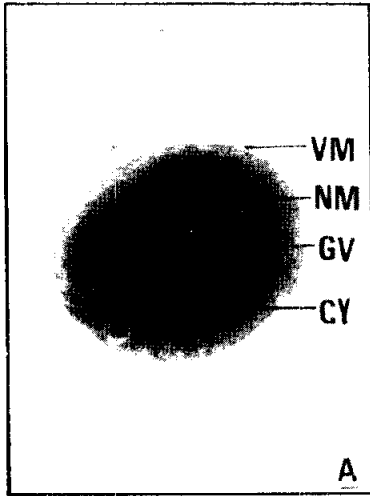
ภาพที่ 2.8 แสดงขั้นตอนการเจริญของเม่นทะเล (จาก Lehman, 1977)  
 คำอธิบายประกอบภาพด้านซ้ายมือ

**ภาพที่ 2.9** แสดงการเจริญขั้นต้นของเม่นทะเล

- A เซลล์ไข่ระยะ primary oocyte
- B เซลล์ไข่ระยะ germinal vesicle breakdown
- C เอ็มบริโอระยะคลีเวจช่วงต้น (ระยะสองเซลล์)
- D เอ็มบริโอ ระยะคลีเวจ ช่วงหลัง

**คำอธิบายประกอบภาพ**

- C cleavage cell (blastomere)
- CF cleavage furrow
- CY cytoplasm
- FM fertilization membrane
- GV germinal vesicle (nucleus)
- NM nuclear membrane
- VM vitelline membrane

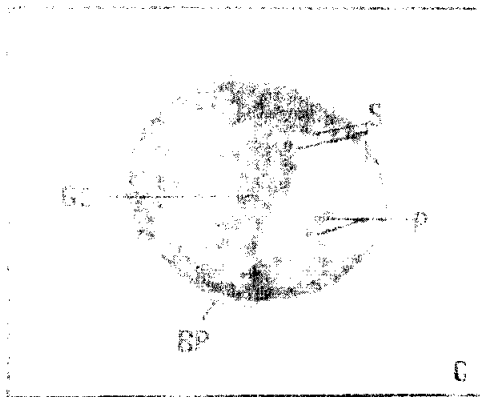
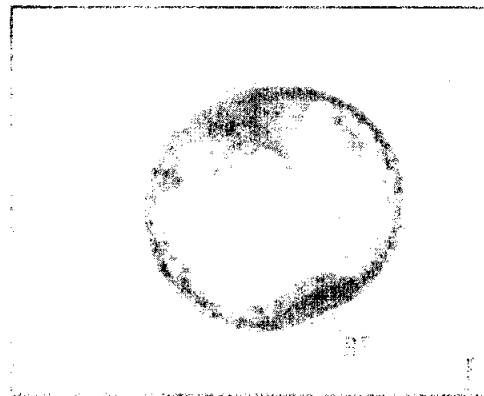
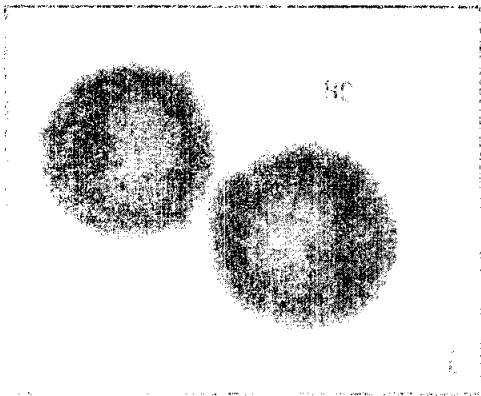


ภาพที่ 2.10 แสดงการเจริญขึ้นต้นของเม่นทะเล

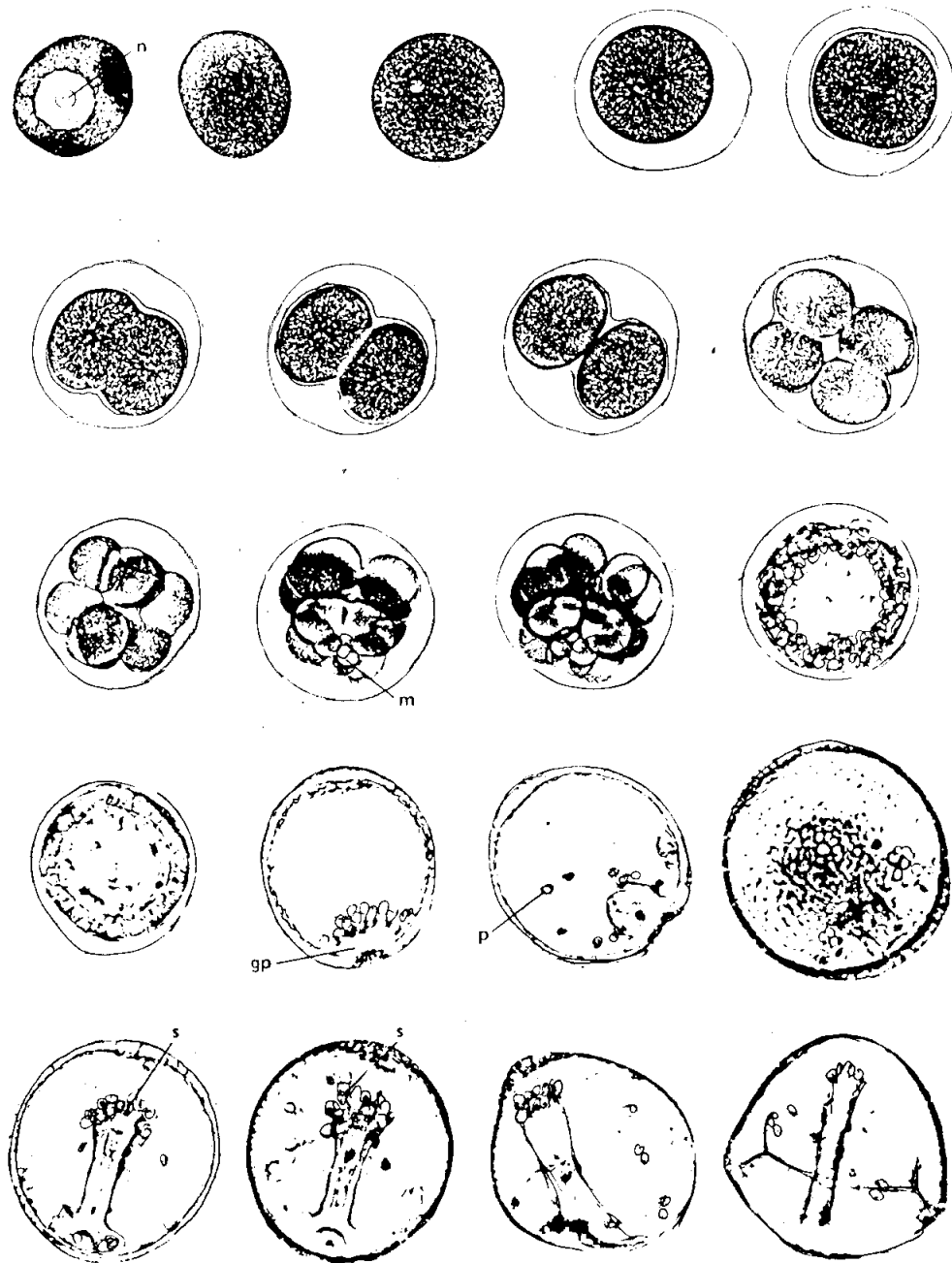
- E เอมบริโอระยะบลาสตูลา
- F เอมบริโอระยะแกสตรูลาช่วงต้น
- G เอมบริโอระยะแกสตรูลาช่วงหลัง
- H ตัวอ่อน pluteus

คำอธิบายประกอบภาพ

- BC blastocoel
- BP blastopore
- GC gastrocoel
- LA larva arm
- P primary mesenchyme
- S secondary mesenchyme
- ST stomach







ภาพที่ 2.11 แสดงขั้นตอนการเจริญของดาวทะเล ตั้งแต่ระยะ primary oocyte, mature egg,

fertilized egg, cleavage, blastula, gastrula, prism stage

gp - gastropore    m - micromere    n - nucleoli

p - primary mesenchyme    s - secondary mesenchyme

(จาก Brookbank, 1978)

## ตำราอ่านประกอบ

1. Balinsky, B.I. 1976. *An Introduction to Embryology*. 4th ed. Philadelphia : Saunders.
2. Brookbank, J.W. 1978. *Developmental Biology*. New York : Harper & Row.
3. Eichler, V.B. 1978. *Atlas of Comparative Embryology*. Saint Louis : CV Mosby.
4. Lehman, H.E. 1977. *Chordate Development*. Winston-Salem : Hunter.
5. Mathews, W.W. 1978. *Laboratory Studies in Animal Development*. New York : Macmillan.
6. \_\_\_\_\_, 1982. *Atlas of Descriptive Embryology*. 3rd ed. New York : Macmillan.
7. Rugh, R. 1977. *A Guide to Vertebrate Development*. 7th ed. Minneapolis : Burgess.
8. Spratt, N.T. 1971. *Developmental Biology California* : Wadsworth.
9. Wodsedalek, J.E. and Lytle, C.F. 1971 *General Zoology Laboratory Guide*. 6th ed. W.M.C. Brown: Dubuque.