

บทปฏิบัติการที่ 5

เรื่อง การเจริญขั้นต้นของเอมบริโอไก่

บทนำ ไข่ไก่จัดอยู่ใน Heavily Telolecithal Egg มีการสะสมของอาหาร (yolk หรือไข่แดง) ภายในเซลล์มาก ทำให้ส่วนของนิวเคลียส และ cytoplasm ไปรวมเป็นบริเวณเล็ก ๆ ทางด้านบนของเซลล์ เรียกบริเวณ germinal disc

เซลล์ไข่ที่ ovulate จากรังไข่ อยู่ในระยะ metaphase ของ secondary oocyte ของการแบ่งตัวครั้งที่ 2 (second meiotic division) มีเยื่อ vitelline หุ้มรอบและจะเคลื่อนไปตามส่วนต่าง ๆ ของท่อนำไข่ (oviduct) เพื่อรอการวางไข่จากตัวแม่ที่ vagina of oviduct

ในระหว่างการเคลื่อนที่ไปตามส่วนของท่อนำไข่ ส่วนของไข่ขาว (egg albumen) เยื่อหุ้มไข่ชั้นใน และชั้นนอก (inner and outer shell membrane) รวมทั้งเปลือกไข่ (shell) จะถูกสร้างมาล้อมรอบเซลล์ เพื่อให้มีสภาพเหมาะสำหรับการเจริญของเอมบริโอภายในไข่จนฟักเป็นตัว

สเปิร์มที่เข้าผสม จะผสมกับเซลล์ไข่ที่ตำแหน่ง infundibulum ของท่อนำไข่ และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเซลล์ไข่ต่อไปเป็น mature ovum ที่มี female pronucleus และเกิดการรวมตัวกับ male pronucleus ของสเปิร์ม ได้เป็น fertilized egg หรือไซโกต

ไซโกตจะมีการเปลี่ยนแปลงในระยะต่อไป พร้อมกับการเคลื่อนที่ไปถึงตำแหน่ง vagina เพื่อรอการวางไข่จากตัวแม่ ซึ่งพบว่าเจริญถึงระยะบลาสตูลา

ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงของไซโกตเป็นดังนี้

ระยะคลีเวจ การแบ่งของไซโกตเกิดเฉพาะส่วนของ germinal disc ซึ่งเห็นเป็นบริเวณสีขาวเล็ก ๆ บนส่วนไข่แดงเท่านั้น ส่วนของ yolk (yolk mass) ไม่ได้เกี่ยวข้องกับการแบ่งของไซโกตเลย เรียกการแบ่งตัวชนิดนี้ว่า Partial หรือ Meroblastic หรือ Discoidal Cleavage

การแบ่งระยะคลีเวจ เกิดเมื่อไซโกตเคลื่อนมาถึงส่วน isthmus ของท่อนำไข่
การแบ่งครั้งแรก แนวการแบ่ง อยู่ตรงกลาง germinal disc ได้เป็นเอมบริโอ 2 บลาสโตเมอร์

การแบ่งครั้งที่สอง แนวการแบ่ง ตั้งฉากกับครั้งแรก ได้ 4 บลาสโตเมอร์

การแบ่งครั้งที่สาม แนวการแบ่ง ขนานกับแนวการแบ่งครั้งแรก และตั้งฉากกับแนวการแบ่งครั้งที่สอง เกิดเป็นรอยเล็ก ๆ ยาวเพียงสองในสามของรอยการแบ่งครั้งที่ 1 และ 2 ได้เป็น 8 บลาสโตเมอร์

การแบ่งครั้งต่อ ๆ ไป มีทิศทางไม่แน่นอน ขนาดรูปร่างของบลาสโตเมอร์ที่ได้จะแตกต่างกันไป ตั้งแต่เอมบริโอระยะ 32 เซลล์ และเอมบริโอจะเคลื่อนมาจนถึงส่วน shell gland ของท่อไข่

เรียกบริเวณ germinal disc ที่มีการแบ่งเซลล์เกิดขึ้น และเปลี่ยนแปลงไปว่า บลาสโตเดิร์ม (blastoderm)

การศึกษาการเจริญของเอมบริโอไก่ ทำได้โดยแยกเฉพาะส่วนของบลาสโตเดิร์ม การเปลี่ยนแปลงทุกอย่างเกิดเฉพาะส่วนของบลาสโตเดิร์มเกือบทั้งสิ้น ส่วนของไข่แดงที่อยู่ด้านล่างเป็นแหล่งให้พลังงานในการเจริญ โดยมีการเกิดของเส้นเลือดกระจายทั่วไข่แดง

เมื่อศึกษาส่วนของบลาสโตเดิร์ม ในตอนท้ายระยะคลีเวล สามารถแยกได้เป็น 2 บริเวณของบลาสโตเมอร์

บริเวณตรงกลางเรียกกลุ่ม central blastomere มีขนาดเล็ก ขอบเขตของแต่ละเซลล์แยกจากกันเห็นได้ชัด และแยกจากไข่แดงที่อยู่ข้างใต้ที่ช่อง subgerminal cavity

บริเวณรอบนอก เรียกกลุ่ม marginal blastomere มีขนาดใหญ่กว่า central blastomere ขอบเขตของเซลล์เห็นได้ไม่ชัด และข้างใต้ติดกับไข่แดง

และพบว่า central blastomere มีจำนวนชั้นของเซลล์มากกว่าหนึ่งชั้น เพราะเกิดการแบ่งของเซลล์ในแนวนอน (horizontal plane) ด้วย

ต่อมาเอมบริโอ เจริญถึงระยะบลาสตูลา เอมบริโอบนไข่แดง มีลักษณะเป็นแผ่นกลม (disc) เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-4 มิลลิเมตร ประกอบด้วยเซลล์หลายชั้นซ้อนกันบนไข่แดง โดยแยกจากไข่แดงตรง subgerminal cavity ระยะนี้ บลาสโตเดิร์ม ที่แยกออกมาเห็นเป็น 2 ส่วนชัดเจน คือ

บริเวณตรงกลาง ค่อนข้างใส เรียกบริเวณ area pellucida

บริเวณรอบนอก ติดกับไข่แดง ค่อนข้างทึบแสงเรียกบริเวณ area opaca

ต่อมาส่วนของ area pellucida เจริญแยกได้เป็นกลุ่มเซลล์สองชั้น กลุ่มเซลล์ชั้นบน คือชั้น epiblast จะเจริญเป็นเนื้อเยื่อชั้น ectoderm และชั้น mesoderm กลุ่มเซลล์ชั้นล่าง คือชั้น hypoblast จะเจริญเป็นเนื้อเยื่อชั้น endoderm

ไข่ที่ผูกผสม จะวางออกมาในระยะที่มีการสร้างชั้น epiblast และ hypoblast นี้ ในการเจริญขึ้นต่อไป ต้องอาศัยการฟัก (incubation) จากตัวแม่ หรือจากตู้ฟักซึ่งมีอุณหภูมิเหมาะสม สำหรับการเจริญของเอมบริโอ ประมาณ 100 องศาฟาเรนไฮต์ หรือ 38 องศาเซลเซียส

ในการศึกษาการเจริญของเอมบริโอไก่ สามารถติดตามการเจริญระยะต่าง ๆ ได้ ตามระยะเวลาที่ไข่ได้รับการฟัก หลังจากไข่ถูกวางออกมาจากแม่ (laying หรือ oviposition)

ไข่ไก่ถ้าอยู่ในสภาพที่อุณหภูมิเหมาะสม เอมบริโอภายในจะเจริญเข้าสู่ระยะแกสตรูลา

ระยะที่มีการสร้างเนื้อเยื่อชั้นต่าง ๆ โดยกลุ่มเซลล์ epiblast เริ่มมีการเคลื่อนตัวไปรวมกันทางด้านท้าย (posterior end) ของบลาสโตเดอรัมเกิดเป็นบริเวณที่มีลักษณะเป็นแนวยาวตามแนวของ area pellucida เรียกบริเวณ primitive streak

ตอนหน้าสุดของ primitive streak มีกลุ่มเซลล์หนาแน่นกว่าบริเวณอื่นเรียก primitive knot หรือ Hensen's node และมีร่องลึกตรงกลางกลุ่มเซลล์คือ primitive pit

ต่อมา กลุ่ม epiblast ที่มารวมกันนี้ จะเคลื่อนตัวต่อไปผ่านแนวกลางของ primitive streak ไปอยู่เป็นเนื้อเยื่อชั้นกลางระหว่าง epiblast กับ hypoblast เจริญเป็นเนื้อเยื่อชั้นกลาง (mesoderm) ที่จะเจริญเป็นโครงสร้างอวัยวะต่าง ๆ ต่อไป โดยจะม้วนตัว (involute) ผ่านแนวกลางของ primitive streak แล้วกระจายออกทางด้านข้างทั้งสองและขึ้นไปทางด้านหน้า การเคลื่อนที่เช่นนี้ทำให้เห็นเป็นสัน primitive fold 2 ข้าง และมีร่อง primitive groove ตรงกลางตลอดตามความยาวของ primitive streak

กลุ่ม mesoderm ที่เคลื่อนผ่านตำแหน่ง primitive knot ไปทางด้านหน้าเห็นเป็นแท่งยาว เรียก notochord หรือ head process เพื่อเจริญเป็นแกนของลำตัวเอมบริโอ อาจเรียกกระยะนี้ว่า notochordal process stage หรือ head process stage

กลุ่ม mesoderm ที่กระจายไปทางด้านข้าง ก่อนไปทางข้างหน้า จะไปจัดเรียงอยู่สองข้างของแท่ง notochord ได้แก่ dorsal mesoderm, intermediate mesoderm และ lateral mesoderm

กลุ่ม epiblast ที่ไม่ได้เคลื่อนผ่าน primitive streak จะเจริญอยู่บน area pellucida กลุ่ม notochord และ mesoderm ที่อยู่ข้างใต้ จัดเป็นเนื้อเยื่อชั้น ectoderm

ชั้น hypoblast ที่อยู่ข้างใต้ เจริญเป็นเนื้อเยื่อชั้น endoderm

ไข่ไก่ที่ได้รับการฟักประมาณ 16-18 ชั่วโมง เมื่อแยกส่วนบลาสโตเดอรัมมาศึกษา ลักษณะภายนอกทั้งตัว (whole mount) พบว่ามีการเจริญเป็นดังนี้

primitive streak เห็นได้ชัดเจน สังเกตส่วนของ primitive knot, primitive pit, primitive fold และ primitive groove

แนว notochord อยู่ทางตอนหน้าของ primitive knot เห็นได้ชัดเจน

ตอนหน้าสุดของ area pellucida เห็นเป็นบริเวณใสกว่าบริเวณข้างเคียง เรียก proamnion เป็นบริเวณที่เนื้อเยื่อ mesoderm เคลื่อนจาก primitive streak ไปไม่ถึง

ในระยะต่อมาทางด้านหน้าของตัวเอมบริโอ กลุ่มเนื้อเยื่อ ectoderm เกิดการเจริญอย่างรวดเร็ว เห็นเป็นแผ่นหนา เรียก neural plate หรือ medullary plate ซึ่งเป็นส่วนเริ่มต้นของการเจริญในระบบประสาท

การเกิดของเพลทนี้ ทำให้เห็นคล้ายส่วนหัว (head) ยกขึ้นจากส่วนบลาสโตเดอรัม อาจเรียกระยะนี้ว่า head-folded stage

วัตถุประสงค์ บทปฏิบัติการนี้ มีวัตถุประสงค์ให้นักศึกษา

1. อธิบายขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในการเจริญขึ้นต้นของเอมบริโอไก่ ตั้งแต่การสร้างเซลล์ไข่ การปฏิสนธิ การเจริญเปลี่ยนแปลงของไซโกต การสร้างเนื้อเยื่อชั้นต่าง ๆ ในระยะแกสตรูลา ตลอดถึงการสร้างส่วนหัวได้โดยการศึกษาจากลักษณะภายนอกของเอมบริโอทั้งตัว

2. เปรียบเทียบการเจริญขึ้นต้นของเอมบริโอไก่ กับดาวทะเล เม่นทะเล และกบ ที่ได้ศึกษาในบทปฏิบัติการก่อน ๆ ได้

วัสดุอุปกรณ์

1. ไข่ไก่ที่ยังไม่มีการปฏิสนธิ
2. สไลด์ถาวรและภาพ แสดงเอมบริโอไก่ ระยะ head process และระยะ head-folded ทั้งตัว
3. กล้องจุลทรรศน์

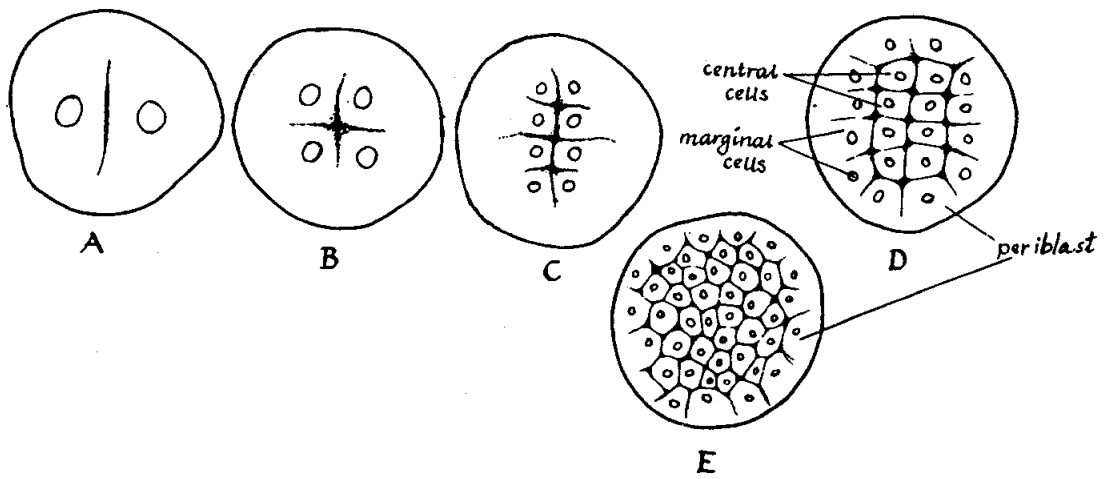
การศึกษา

1. ศึกษาไข่ไก่ ที่ยังไม่มีการปฏิสนธิ สังเกตส่วนต่าง ๆ ต่อไปนี้
 - เปลือกไข่ (shell)
 - เยื่อหุ้มไข่ขาว ชั้นใน และชั้นนอก (inner and outer shell membrane)
 - ไข่ขาว (egg albumen)
 - ช่องอากาศ (air space)
 - ไข่แดง (yolk)
 - germinal disc
 - vitelline membrane
2. ศึกษาการเจริญขึ้นต้น ของเอมบริโอไก่ จากสไลด์ถาวร และภาพ ดังนี้
 - 2.1 เอมบริโอระยะ head process ทั้งตัว สังเกต
 - area pellucida
 - area opaca
 - notochord (head process)
 - primitive streak
 - primitive fold
 - primitive groove
 - primitive knot (Hensen's node)
 - primitive pit

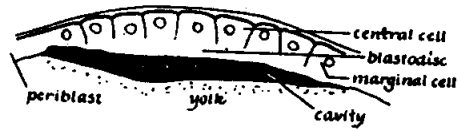
- border of mesoderm
- proamnion

2.2 เอ็มบริโอ ระยะ head-folded ทั้งตัว สังเกต

- proamnion
- primitive knot
- head fold of the body
- primitive streak
- neural plate (medullary plate)
- area opaca
- area pellucida
- notochord
- somite

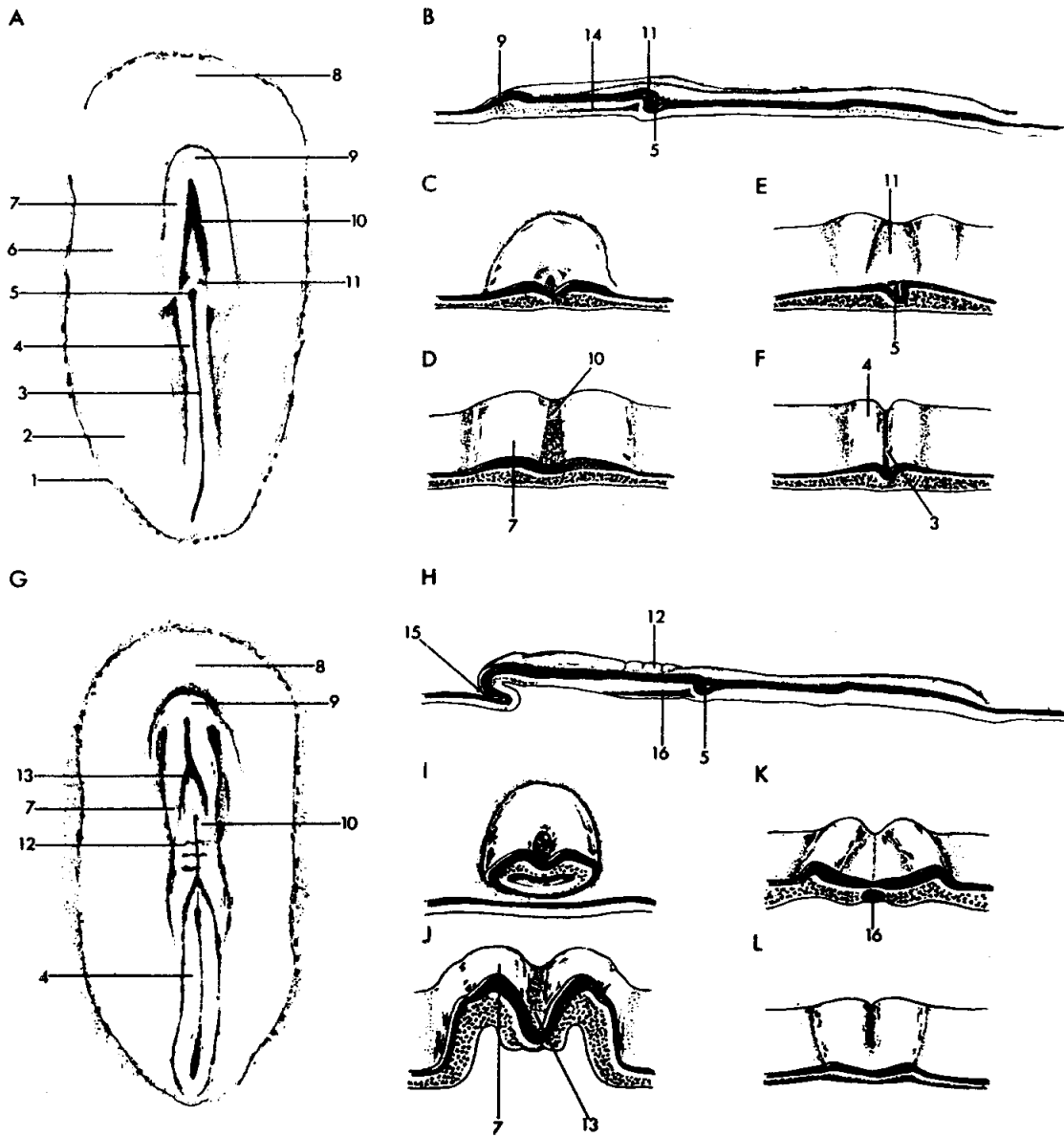


ภาพที่ 5.1 แสดงการแบ่งเซลล์ (Meroblastic หรือ Discoidal Cleavage) ในไฮสตร์บีก
(จาก Spratt, 1971)



ภาพที่ 5.2 แสดงเซกชันตามขวาง ผ่านบลาสโตเดิร์มของไฮสตร์บีก ระยะเซลล์เวจ
(จาก Spratt, 1971)

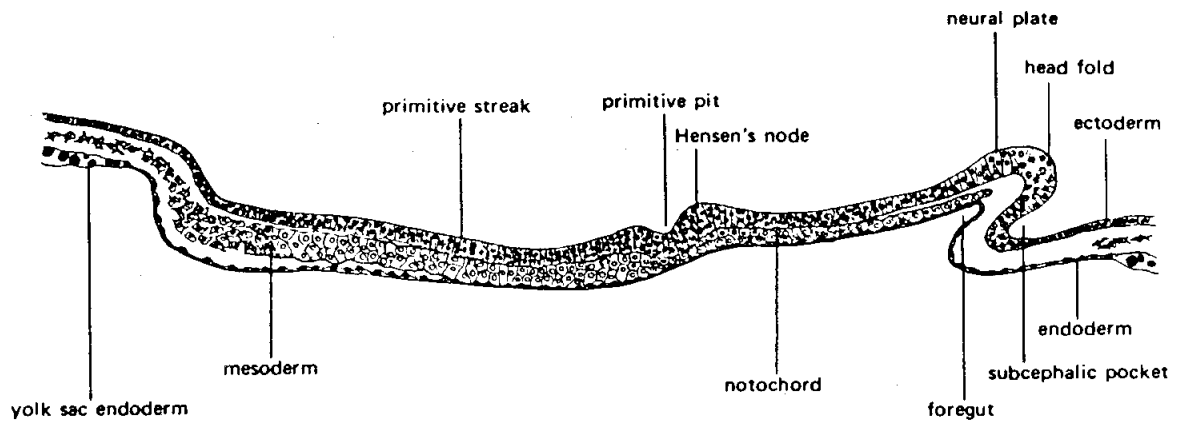
CHICK DEVELOPMENT



- A. Eighteen hour embryo, dorsal
- B. Embryo, median sagittal sec.
- C. Head fold, cross sec.
- D. Medullary fold, cross sec.
- E. Primitive pit, cross sec.
- F. Primitive streak, cross sec.
- G. Twenty hour embryo, dorsal
- H. Embryo, median sagittal sec.
- I. Head fold, cross sec.
- J. Neural fold, cross sec.

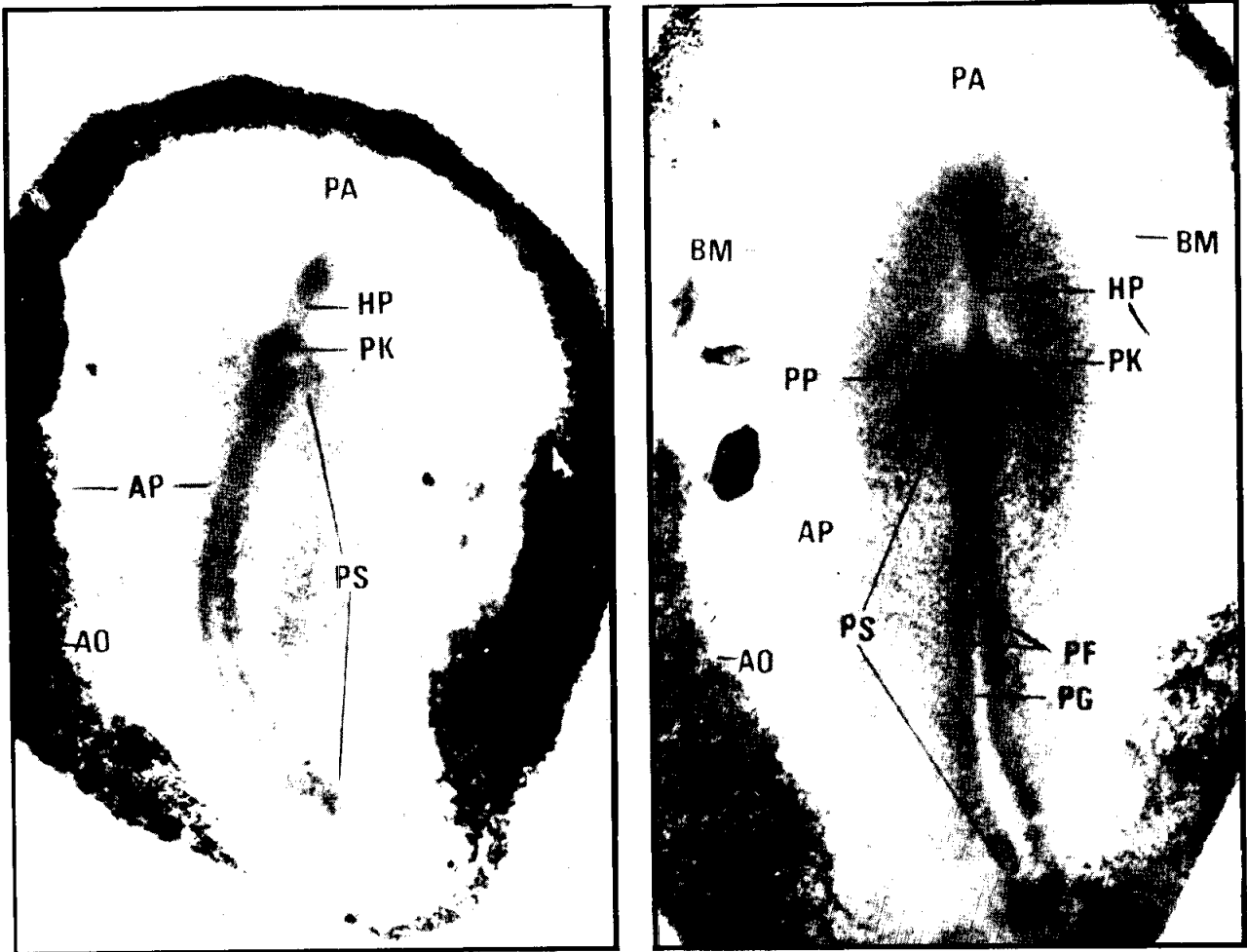
- K. Medullary plate, cross sec.
- L. Primitive streak, cross sec.
- 1. Opaque area
- 2. Pellucid area
- 3. Primitive groove
- 4. Primitive streak
- 5. Primitive pit
- 6. Lateral mesoderm

- 7. Neural fold
- 8. Proamnion
- 9. Head fold
- 10. Medullary plate
- 11. Hensen's node
- 12. Somite
- 13. Neural groove
- 14. Axial mesoderm
- 15. Subcephalic pocket
- 16. Notochord



ภาพที่ 5.3 แสดงเอ็มบริโอไก่ ระยะเวลา head process ตัดตามยาวกลางลำตัว
(จาก Rugh, 1977)

ภาพที่ 5.4 แสดงเอ็มบริโอไก่ ระยะเวลา head process (notochordal process) ทั้งตัว

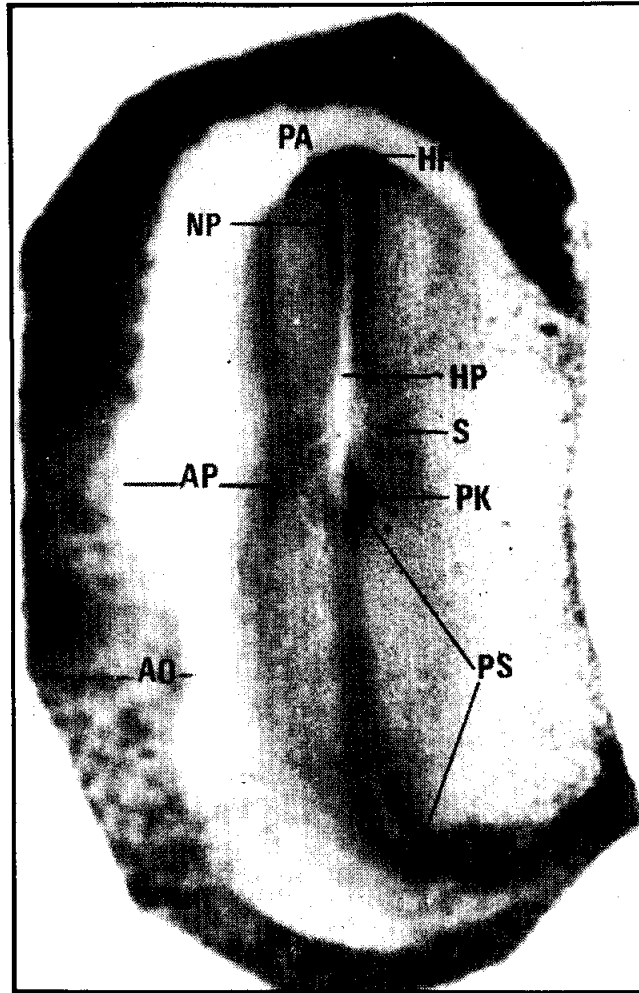


คำอธิบายประกอบภาพ

AO area opaca
 AP area pellucida
 BM border of mesoderm
 HP head process (notochord)
 PA proamnion

PF primitive fold
 PG primitive groove
 PK primitive knot
 PP primitive pit
 PS primitive streak

ภาพที่ 5.5 แสดงเอมบริโอไก่ ระยะเวลา head-folded ทั้งตัว



คำอธิบายประกอบภาพ

AP	area pellucida	PA	proamnion
AO	area opaca	PS	primitive streak
HF	head fold of the body	PK	primitive knot
HP	head process (notochord)	S	somite
NP	neural plate (medullary plate)		

ภาพที่ 5.6 แสดงเอมบริโอไก่ ระยะ head-folded ทั้งตัว



คำอธิบายประกอบภาพ

AO	area opaca	HF	head fold of the body
AP	area pellucida	NF	neural fold
B	boundary of blastoderm	Y	yolk

ตำราอ่านประกอบ

1. Adamstone, F.B. and Shumway, W. 1967. *A Laboratory Manual of Vertebrate Embryology*. 3rd ed. New York : John Wiley & Sons.
2. Arey, L.B. 1974. *Developmental Anatomy*. Rev. 7th ed. Philadelphia : Saunders.
3. Balinsky, B.I. 1976. *An Introduction to Embryology*. 4th ed. Philadelphia: Saunders.
4. Brookbank, J.W. 1978. *Developmental Biology* New York : Harper & Row.
5. Eichler, V.B.1978. *Atlas of Comparative Embryology*. Saint Louis : C.V. Mosby.
6. Freeman, W.H. and Bracegirdle, B. 1975. *An Atlas of Embryology*. 3rd ed. London : Heinemann Educational Books.
7. Lehman, H.E. 1977. *Chordate Development*. Winston-Salem: Hunter.
8. Mathews, W.W. 1978. *Laboratory Studies in Animal Development* New York : Macmillan.
9. _____, 1982. *Atlas of Descriptive Embryology*. 3rd ed. New York : Macmillan.
10. Rugh, R. 1962. *Experimental Embryology*. 3rd ed. Minneapolis : Burgess.
11. _____, 1977. *A Guide to Vertebrate Development*. 7th ed. Minneapolis : Burgess.
12. Spratt, N.T. 1971. *Developmental Biology*. California : Wadsworth.
13. Watterson, R.L., Schoenwolf, G.C. and Sweeney, R.M. 1979. *Laboratory Studies of Chick, Pig and Frog Embryos*. 4th ed. Minneapolis : Burgess.