หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

ทำการทดลองโดยนำไข่นกกระทา (Coturnix coturnix) จากฟาร์มคุณสุพัตรา สุขะ-วาสี ซอยยาสูบ 2 กรุงเทพฯ เข้าฟักในตู้ฟักที่ทำด้วยไม้ ชนิดใช้ไฟฟ้า ไม่มีพัดลมและไอน้ำของ บริษัทรวมทอง (ดังแผนภาพที่ 1) ซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 38.5 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 80 – 85 เปอร์เซนต์ เพื่อเพิ่มความชื้นในตู้ฟัก ภายในตู้มีถาดโลหะกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 25 เซนติเมตร ใส่น้ำสูงประมาณ 2 เซนติเมตร เมื่อถึงเวลาที่กำหนดจะศึกษา จึงนำไข่นกกระทาออกจากตู้ฟัก เพื่อดำเนินการทดลองขั้นต่อไป

สารทดลอง ใช้สารโซเดียมเบนโซเอทและโซเดียมซาลิซีเลท จากห้างบริษัทสัมพันธ์-โอสถ กรุงเทพฯ

I การใช้ความเข้มข้นของสารในการทดลอง

จากการทดลองดูผลของโซเดียมเบนโซเอท และโซเดียมซาลิซีเลท ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วง 2.5 ถึง 40.0 มิลลิกรัม ที่มีต่อการตาย การฟักเป็นตัวของเอมบริโอนกกระทาที่เลี้ยงในตู้ฟักไม้ในวันที่ 9 และวันที่ 17 (ดังตาราง ก. ในภาคผนวก) พบว่า ความเข้มข้นของสารทั้งสองที่ 10 มิลลิกรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่น 0.15 มิลลิลิตร มีความเหมาะสมในการนำศึกษาผล โดยพิจารณาประกอบกับการศึกษาการเจริญช่วงต้น ของเอมบริโอนกกระทาที่เลี้ยงในถุงพลาสติก (ดังตาราง ข. ในภาคผนวก) พบว่า ระดับความเข้มข้นดังกล่าวนี้ เอมบริโอมีจำนวนการตายที่พอควร และมีเอมบริโอที่รอดชีวิต สามารถนำมาศึกษาลักษณะต่าง ๆ ได้

II ศึกษาผลการเจริญเบื้องต้นโดยเลี้ยงเอมบริโอในถุงพลาสติก (อายุฟัก 1 – 4 วัน)

ก. การเลี้ยงเอมบริโอในถุงพลาสติก ดัดแปลงจากวิธีของ Schlesinger

(1966) โดยทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ ซึ่งได้ทำความสะอาด และฆ่าเชื้อโรคโดยการเปิดแสงอุลตราไวโอเล็ต ประมาณ 24 ชั่วโมง เครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ผ่านการทำความสะอาดฆ่าเชื้อโรคแล้ว

นำไข่นกกระทาที่เข้าฟักในตู้ไม้ จนถึงระยะเวลาที่กำหนดจะทดลองศึกษามาทำความสะอาดเปลือกไข่ โดยใช้แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์ เช็ดโดยรอบ วางไข่ไว้บนที่พัก จัดไข่นอนในแนวราบ ใช้กรรไกรปลายแหลมโค้งที่สะอาดเปิดเปลือกไข่โดยเริ่มจากด้านป้าน วนโดยรอบ ดังรูปวาด ก. ระวังอย่าให้ถูกไข่แดง เปิดเปลือกไข่ให้มีขนาดกว้างพอที่ไข่แดงผ่านได้ โดยไม่แตก ค่อย ๆ เทส่วนประกอบภายในไข่ทั้งหมดคือ ไข่ขาว ไข่แดง ลงในถุงพลาสติก โพลิเอททีลีน (polyethylene) ขนาด 4 " x 6 " ใช้ลวดขนาดเล็กที่มีความยาวประมาณ 5 นิ้ว พันรอบปากถุงโดยให้ภายในมีอากาศมากที่สุด วางถุงพลาสติกที่มีเอมบริโออยู่บนปากขวดขนาด 4.5

รูป ก.

กว้าง 4.5 ซม. x สูง 9.0 ซม.

ที่มีน้ำหล่อลื่นอยู่เกือบเต็ม (ภาพที่ 2 ก) ให้น้ำยาแก่เอมบริโอในถุงพลาสติก โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 1.0 มิลลิลิตร เจาะด้านข้างถุงพลาสติก* แล้วหยดสารละลายปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร ลงบนบริเวณบลาสโตดิสก์ ซึ่งจะเป็นบริเวณสีขาวจาง ๆ ตัดกับสีเหลืองเข้มของไข่แดง ปิดช่องที่ให้น้ำยาด้วยสก๊อตเทปใส ความยาว 1.5 เซนติเมตร นำเอมบริโอในถุงพลาสติกที่วางบนขวดดังกล่าว ไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเชื้อ (incubator) Forma Scientific, Model 329 (ดังภาพที่ 2 ข) ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 38.5 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 90 เปอร์เซนต์ เพื่อศึกษาผลการเจริญในช่วงอายุ 1,2,3 และ 4 วัน โดยแบ่งกลุ่มการทดลอง ดังนี้

---

* ตามวิธีของ Schlesinger ให้น้ำยาโดยตรงบนบลาสโตดิสก์ ก่อนจะปิดถุงพลาสติก แต่ในที่นี้ได้ดัดแปลงการให้น้ำยาโดยปิดถุงแล้ว จึงให้น้ำยาโดยตรง เพราะสดวกกว่าในการให้น้ำยาแก่เอมบริโอจำนวนมาก

กลุ่มที่ 1 ให้น้ำยาทดลอง เมื่อเอมบริโอมีอายุฟักได้ 5 ชั่วโมง (ระยะพรีมิทีฟ สตรีก)

สารทดลองต่อไข่ 1 ใบ	จำนวนไข่	แยกเอมบริโอเมื่ออายุฟัก	ศึกษาผล
กลุ่มควบคุมโดยให้น้ำกลั่น	60 ใบ	–	บันทึกผลการตายอยู่รอดของเอมบริโอทุกวัน
0.15 มิลลิลิตร	30 ใบ	1 วัน	*15 ตัว สำหรับศึกษาขนาดของบลาสโตเดอร์มและจำนวนโซไมท์
		(24 ชั่วโมง)	10 ตัว สำหรับศึกษาลักษณะภายนอก
			5 ตัว สำหรับศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อวิทยา
	15 ใบ	2 วัน	10 ตัว สำหรับศึกษาลักษณะภายนอก
		(48 ชั่วโมง)	5 ตัว สำหรับศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อวิทยา
	15 ใบ	3 วัน	10 ตัว สำหรับศึกษาลักษณะภายนอก
		(72 ชั่วโมง)	5 ตัว สำหรับศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อวิทยา
	30 ใบ	4 วัน	*15 ตัว สำหรับชั่งน้ำหนักตัวเปียก และน้ำหนักตัวหลังจากอบ 3 วัน
		(96 ชั่วโมง)	10 ตัว สำหรับศึกษาลักษณะภายนอก
			5 ตัว สำหรับศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อวิทยา
ให้สารละลายโซเดียม	60 ใบ	–	บันทึกผลการตาย อยู่รอดของเอมบริโอทุกวัน
	30 ใบ	1 วัน	* 15 ตัว สำหรับศึกษาขนาดของบลาสโตเดอร์ม และจำนวนโซไมท์
		(24 ชั่วโมง)	10 ตัว สำหรับศึกษาลักษณะภายนอก

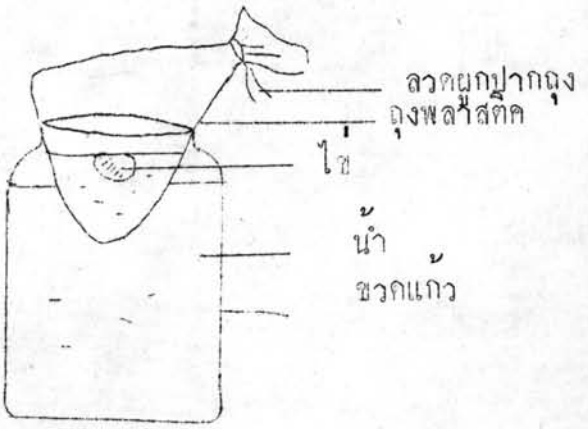
สารทดลองต่อไข่ 1 ใบ	จำนวนไข่	แยกเอมบริโอเมื่ออายุฟัก	ศึกษาผล
เบนโซเอท 0.15 มิลลิลิตร (10 มิลลิกรัม)	15 ใบ	2 วัน (~~48~~ ชั่วโมง)	5 ตัว สำหรับศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อวิทยา 10 ตัว สำหรับศึกษาลักษณะภายนอก 5 ตัว สำหรับศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อวิทยา
	15 ใบ	3 วัน (72 ชั่วโมง)	10 ตัว สำหรับศึกษาลักษณะภายนอก 5 ตัว สำหรับศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อวิทยา
	30 ใบ	4 วัน (96 ชั่วโมง)	* 15 ตัว สำหรับชั่งน้ำหนักตัวเปียก และน้ำหนักตัวหลังจากอบ 3 วัน 10 ตัว สำหรับศึกษาลักษณะภายนอก 5 ตัว สำหรับศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อวิทยา
ให้สารละลายเซเดียมซาลิซีเลท 0.15 มิลลิลิตร (10 มิลลิกรัม)	60 ใบ	–	บันทึกผลการตาย อยู่รอดของเอมบริโอทุกวัน
	30 ใบ	1 วัน (24 ชั่วโมง)	* 15 ตัว สำหรับศึกษาขนาดของบลาสโตเดอร์ม และจำนวนโซไมท์ 10 ตัว สำหรับศึกษาลักษณะภายนอก 5 ตัว สำหรับศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อวิทยา
	15 ใบ	2 วัน (48 ชั่วโมง)	10 ตัว สำหรับศึกษาลักษณะภายนอก 5 ตัว สำหรับศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อวิทยา

สารทดลองต่อไข่ 1 ใบ	จำนวนไข่	แยกเอมบริโอเมื่ออายุพัก	ศึกษาผล
	15 ใบ	3 วัน (72 ชั่วโมง)	10 ตัว สำหรับศึกษาลักษณะภายนอก 5 ตัว สำหรับศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อวิทยา
	30 ใบ	4 วัน (96 ชั่วโมง)	*15 ตัว สำหรับชั่งน้ำหนักตัวเปียก และน้ำหนักตัวหลังจากอบ 3 วัน 10 ตัว สำหรับศึกษาลักษณะภายนอก 5 ตัว สำหรับศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อวิทยา

กลุ่มที่ 2 แบ่งการทดลองเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1 แต่ให้น้ำยาทดลอง เมื่อเอมบริโอมีอายุฟักได้ 15 ชั่วโมง (ระยะเริ่มเกิดโซไมท์)

* ทำการทดลอง 2 ครั้ง

แผนภาพที่ ๑ แสดงตู้พักไม้สำหรับฟักไข่นกกระทา



แผนภาพที่ ๒ ก แสดงไข่นกกระทาที่แยกมาเลี้ยงในถุงพลาสติกวางบนขวดแก้วที่มีน้ำบรรจุ

ข แสดงการเลี้ยงเอมบริโอที่อยู่ในถุงพลาสติกในตู้เลี้ยงเชื้อ

ข. การแยกเอมบริโอที่เลี้ยงในถุงพลาสติกสำหรับศึกษาการเจริญ

เมื่อถึงกำหนดระยะเวลาที่ต้องการ นำเอาเอมบริโอที่เลี้ยงในตู้เลี้ยงเชื้อออก คลายลวดที่ผูกปากถุงพลาสติก ค่อย ๆ เทไข่ขาว ไข่แดงภายในถุงลงใน petri dish ที่มีน้ำยาริงเกอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคแล้ว พยายามให้ส่วนของเอมบริโอลอยอยู่ตอนบนของไข่แดง ใช้กระดาษกรองเบอร์ 42 ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 1.0 x 1.0 ถึง 1.5x1.5 เซนติเมตร^2 แล้วแต่ขนาดเอมบริโอ ตรงกลางเจาะเป็นรูปสี่เหลี่ยม นำกระดาษกรองที่ตัดนี้ วางบนไข่แดงโดยให้บริเวณที่เป็นเอมบริโออยู่ตรงกลางของกระดาษกรองที่ตัดออก หยด fixative FAA (ฟอร์มาลิน- กรดอะซิติก-แอลกอฮอล์) ประมาณ 2 - 3 หยดลงบนเอมบริโอ ทิ้งไว้ประมาณครึ่งนาที ใช้กรรไกรปลายแหลมตัด Vitelline membrane รอบ ๆ กระดาษกรอง เพื่อแยกส่วนของเอมบริโอจากไข่แดง (ตามวิธีของ Humerson 1957) ใช้ปากคีมแหลมยกเอาส่วนของกระดาษกรองที่มีเอมบริโอติดอยู่ล้างไข่แดงที่หลงเหลือในกระจกนาฬิกาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร ที่มีน้ำยาริงเกอร์อยู่จนกระทั่งไข่แดงออกหมด นำเอมบริโอที่ติดบนกระดาษกรองไปแช่ใน FAA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์ เพื่อศึกษาลักษณะภายนอกและลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา

สำหรับเอมบริโอที่มีอายุมากได้ 4 วัน มีขนาดใหญ่พอที่จะแยกมาศึกษาโดยไม่ใช้กระดาษกรองติด แต่ใช้กรรไกปลายแหลมตัดแยก vitelline membrane และตัดบริเวณ yolk sac ให้ติดเอมบริโอให้มากที่สุด แยกเอมบริโอมาอยู่ในริงเกอร์ภายใต้กล้อง Stereozoom ใช้เข็มปลายแหลมรวยเขี่ยเอาส่วนของถุงน้ำคร่ำ ถุงอะลันทอยส์ออก ได้เอมบริโอที่ใช้ศึกษาลักษณะภายนอกและเนื้อเยื่อวิทยา โดยนำไป fix ใน FAA 24 ชั่วโมง เก็บในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์ ส่วนเอมบริโอสำหรับศึกษาน้ำหนักตัวเปียก และน้ำหนักตัวหลังจากอบ 3 วัน อยู่ในน้ำยาริงเกอร์ ซึ่งจะได้กล่าวต่อไป

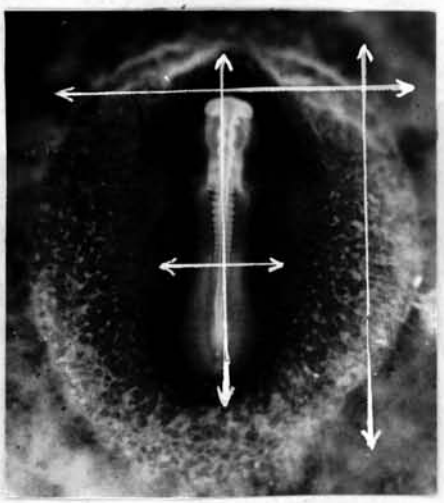
ค. การศึกษาขนาดของบลาสโตเดอร์มและจำนวนโซไมท์

เอมบริโอที่มีชีวิตอายุได้ 1 วัน (24 ชั่วโมง) จากการทดลองกลุ่มละ 15 ตัว ศึกษาขนาดของบลาสโตเดอร์ม โดยวัดพื้นที่ของบลาสโตเดอร์ม (area blastoderm) และ

วาสคูโลซา (area vasculosa) ตามวิธีของ Billet, Collini และ Hamilton 1965 และนับจำนวนโซไมท์ด้วยคู่กันไป

อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาคือ ไมโครมิเตอร์ที่ละเอียดถึง 0.5 มิลลิเมตร และกล้อง Stereozoom

การวัดพื้นที่บลาสโตเดอร์มของเอมบริโอใช้หลักที่ว่า บลาสโตเดอร์มซึ่งเป็นรูปวงรี บรรจุอยู่ในพื้นที่รูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ซึ่งคำนวณได้โดยประมาณจากความยาว และความกว้างของรูปสี่เหลี่ยมนั้น ความยาวของรูปสี่เหลี่ยมวัดได้จากขอบของบลาสโตเดอร์มในแนวที่ขนานกับแกน (axis) ของเอมบริโอไปจดขอบอีกด้าน ความกว้างวัดจากขอบของบลาสโตเดอร์มในแนวตั้งฉากกับแนวแรก โดยวัดจากช่องกว้างที่สุด พื้นที่เพลลูซิดาก็อบริเวณใส ๆ รอบเอมบริโอซึ่งคำนวณพื้นที่จากความกว้าง และความยาวของรูปสี่เหลี่ยมใส ๆ รอบเอมบริโอเช่นเดียวกับบลาสโตเดอร์ม ดังรูป ง.



รูป ง.

พื้นที่ของบลาสโตเดอร์ม = ก × ข ตารางมิลลิเมตร
พื้นที่ของเพลลูซิดา = ก × ง "
พื้นที่ของวาสคูโลซา = พื้นที่ของบลาสโตเดอร์ม
−พื้นที่ของเพลลูซิดา

จากแต่ละกลุ่มการทดลอง หาพื้นที่ของบลาสโตเดอร์ม วาสคูโลซาและนับจำนวนโซไมท์ของเอมบริโอจำนวน 15 ตัว แล้วหาค่าเฉลี่ย ± SD ของทุกกลุ่ม (ทำการทดลอง 2 ครั้ง)

ง. <u>การชั่งน้ำหนักตัวเปียกและน้ำหนักตัวหลังจากอบ 3 วัน</u>

เอมบริโอที่มีอายุได้ 4 วัน ที่แยกออกจากถุงพลาสติก โดยเขี่ยเอาส่วนของถุงน้ำคร่ำอะลันทอยส์ออกแล้ว อยู่ในน้ำยาริงเกอร์ ชั่งน้ำหนักเอมบริโอโดยใช้ช้อนพลาสติกขนาดเล็ก ตักเอมบริโอขึ้นมาทีละตัวให้ติดน้ำยาน้อยที่สุด ใช้กระดาษกรองซับเป็นสามเหลี่ยมชายของเล็ก ๆ แตะ

ซับน้ำตามบริเวณเอมบริโอออก นำเอมบริโอวางบนกระดาษไขแห้งที่ได้ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียด และลงรายการบันทึก (label) ไว้แล้ว ชั่งน้ำหนักเอมบริโอ (ครั้งละ 1 ตัว)และกระดาษ คำนวณหาน้ำหนักที่แท้จริงของเอมบริโอบันทึกผล นำกระดาษไขที่มีเอมบริโออยู่เข้าตู้อบ (oven) เป็นเวลา 3 วัน นำมาชั่งน้ำหนัก ค่าน้ำหนักที่ได้ ลบด้วยน้ำหนักกระดาษไขตั้งแต่แรก จะเป็นค่าของน้ำหนักตัวหลังจากอบ 3 วัน ของเอมบริโอ

จากแต่ละกลุ่มการทดลอง ชั่งน้ำหนักตัวเปียกและน้ำหนักตัวหลังจากอบ 3 วัน ของเอมบริโอ จำนวน 15 ตัว แล้วหาค่าเฉลี่ย $\pm$ SD. ของทุกกลุ่ม (ทำการทดลอง 2 ครั้ง)

จ. <u>การศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา</u>

เอมบริโอที่ใช้สำหรับศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อวิทยา ที่เก็บในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์ หลังจากดองเพื่อรักษาสภาพเนื้อเยื่อด้วยฟอร์มาลิน–กรดอะซีติก–แอลกอฮอล์ นำไป dehydrate ในแอลกอฮอล์ 80,90 เปอร์เซนต์ บิวทานอล ทำให้ใสด้วยน้ำยาไซลอลและฝังพาราฟลาส (Arther, H : Thomas) ตัดเนื้อเยื่อตามขวาง ขนาด 8 ไมครอน ศึกษาโดยการย้อมสีฮีมาโตซีลีนและอีโอซีน (Haematoxylin & Eosin)

III <u>ศึกษาผลการเจริญช่วงหลังและระยะพัก โดยการฉีดสารละลายเข้าทางช่องอากาศของไข่</u>

เนื่องจากการเลี้ยงเอมบริโอในถุงพลาสติก เอมบริโอทั้งกลุ่มควบคุมและที่ได้รับสารทดลองมีอายุอยู่ไม่นาน เพื่อศึกษาผลการเจริญของเอมบริโอนกกระทาในระยะหลังและระยะพัก จึงใช้วิธีการฉีดสารละลายเข้าทางช่องอากาศของไข่ ตามวิธีของ Zaretsky และ Hanan (อ้างตาม Freerick 1963) ดำเนินการทดลอง โดยนำไข่นกกระทาเข้าฟักในตู้ฟักไข่ ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 38.5 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธประมาณ 80 – 85 เปอร์เซนต์ เมื่อถึงระยะเวลาที่ต้องการศึกษา ก็อเมื่ออายุ 3 วัน นำไข่นกกระทาออกจากตู้ฟักไข่ มาทำความสะอาดโดยใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์ เช็ดรอบเปลือกไข่ วางไข่บนที่พักทิ้งไว้สักครู่ ใช้เข็มปลายแหลมเจาะทางด้านป้านของไข่เป็น

ช่องเล็ก ๆ 2 ช่อง ห่างกันประมาณ 3 มิลลิเมตร ค่อย ๆ ฉีดสารละลายปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร เข้าทางช่องใดช่องหนึ่งที่เจาะไว้ ปิด 2 ช่องดังกล่าวด้วยสก๊อตเทปใส นำไข่นกดังกล่าวกลับเข้าฟักในตู้ไข่ดังเดิม ทำการพลิกกลับไข่นกดังกล่าวทุกวัน วันละ 2 ครั้ง (เช้าและเย็น) จนกระทั่งถึงวันที่ต้องการศึกษาผลการทดลอง

ในการศึกษาผลของโซเดียมเบนโซเอท และโซเดียมซาลิซีเลทครั้งนี้ดูผลที่มีต่อการเจริญของเอมบริโอ เมื่ออายุได้ 9 วัน ซึ่งระยะนี้เอมบริโอเพิ่งปรากฏแนวของขน และอายุ 17 วันซึ่งเป็นวันฟัก โดยแบ่งกลุ่มการทดลองดังนี้

สารทดลองต่อไข่ 1 ใบ	ทำการทดลองเมื่ออายุฟัก	จำนวนไข่**	ศึกษาผล
กลุ่มควบคุมโดยให้น้ำกลั่น 0.15 มิลลิลิตร	3 วัน	25 ใบ	ตรวจดูผลวันที่ 9 โดยศึกษา - เปอร์เซนต์การตาย การอยู่รอด - ศึกษาลักษณะภายนอกของเอมบริโอ - ชั่งน้ำหนักตัวเปียกและน้ำหนักหลังจากอบ 3 วัน จากเอมบริโอ 4 ตัว
	005715	25 ใบ	ตรวจดูผลวันที่ 17 โดยศึกษา - เปอร์เซนต์การตาย การฟักเป็นตัว - ศึกษาลักษณะภายนอกของเอมบริโอ
ให้สารละลายโซเดียมเบนโซเอท 0.15 มิลลิลิตร (10 มิลลิกรัม)	3 วัน	25 ใบ	ตรวจดูผลวันที่ 9 โดยศึกษา - เปอร์เซนต์การตาย การอยู่รอด - ศึกษาลักษณะภายนอกของเอมบริโอ - ชั่งน้ำหนักตัวเปียกและน้ำหนักหลังจาก

17946104

สารทดลองต่อไข่ 1 ใบ	ทำการทดลองเมื่ออายุฟัก	จำนวนไข่**	ศึกษาผล
		25 ใบ	อบ 3 วัน จากเอมบริโอ 4 ตัว ตรวจดูผลวันที่ 17 โดย ศึกษา - เปอร์เซนต์การตาย การฟักเป็นตัว - ศึกษาลักษณะภายนอกของเอมบริโอ
ให้สารละลายโซเดียมซาลิซีเลท 0.15 มิลลิลิตร (10 มิลลิกรัม)	3 วัน	25 ใบ	ตรวจดูผลวันที่ 9 โดยศึกษา - เปอร์เซนต์การตาย การอยู่รอด - ศึกษาลักษณะภายนอกของเอมบริโอ - ชั่งน้ำหนักตัวเปียกและน้ำหนักหลังจากอบ 3 วัน จากเอมบริโอ 4 ตัว
		25 ใบ	ตรวจดูผลในวันที่ 17 โดยศึกษา - เปอร์เซนต์การตาย การฟักเป็นตัว - ศึกษาลักษณะภายนอกของเอมบริโอ

** หลังจากเปิดไข่ ศึกษาผล จำนวนไข่จะลดลงจาก 25 ใบ เพราะมีไข่ที่ไม่ผสมอยู่ด้วย และไม่สามารถตรวจพบได้ในขั้นแรกนี้จากภายนอก เพราะสีเปลือกไข่ขัดขวาง