

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว มีถิ่นกำเนิดอยู่บริเวณภาคเหนือของประเทศไทย คือ บ้านห้วยเท หรือบ้านกร่าง จังหวัดพิษณุโลก ลักษณะเด่นประจำพันธุ์ คือ เพศผู้ จะมีขนพื้นตัวสั้น แน่น ตั้งแต่บริเวณ หน้าคอถึงหน้าอก ขนบริเวณใต้ปีก ใต้อกแน่น ขนช่วงท้องเป็นปุย ขนสร้อยคอ สร้อยปีก สร้อยหลัง และระบ่ำเป็นขนละเอียด ปลายแหลมเส้นเล็ก ก้านแข็ง เป็นแผงสีเหลืองสด ขนสร้อยคอยาวประปรายเรียกว่า "สร้อยต่อ หรือ ระบ่ำ" ขนระย้ายาวประกัน ซึ่งขนสีเหลือง จะมี 3 เฉดสี คือ สีเหลืองแก่ เรียกเหลืองใหญ่ สีเหลืองกลาง เรียกเหลืองรวก และสีเหลืองอ่อน เรียกเหลืองดอกโสน ขนหางพัดมีสีดำ ขนกระสวยสีขาว พ่อพันธุ์มีน้ำหนักประมาณ 3.00-3.50 กิโลกรัม เพศเมีย มีขนพื้นตัวเป็นสีดำตลอด หรือบางตัวอาจมีจุดกระขาวอยู่ 5 หย่อม คือที่บริเวณหัว ปีกทั้งสองข้าง ข้อขาทั้งสองข้าง ปาก แข็ง ปุ่มเดือย เล็บ เกล็ด เป็นสีขาวอมเหลืองตลอดแบบสิ่งข้าง ปากมีรอน้ำ 2 ข้าง ปลายปากงุ้มเล็กน้อย ตาสีเหลืองอ่อนมีเส้นเลือดสีแดงในตาเห็นได้ชัดเจน แม่พันธุ์มีน้ำหนักประมาณ 2.00-2.50 กิโลกรัม โดยไก่พื้นเมืองนั้นเป็นสัตว์พื้นเมืองของไทย ที่มีความสำคัญต่อสังคมและเศรษฐกิจของคนไทย จุดประสงค์ของผู้เลี้ยงส่วนใหญ่เลี้ยงเพื่อบริโภค ในครอบครัว ส่วนที่เหลือจากการบริโภคจึงจำหน่าย สำหรับการเลี้ยงเพื่อการค่าน้ำมันน้อยมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากน้ำเชื้อไก่มีปริมาณน้อย แต่มีปริมาณความเข้มข้นสูง หากให้มีการผสมพันธุ์แบบธรรมชาติก็จะส่งผลให้การกระจายพันธุกรรมเกิดความล่าช้า นอกจากนี้อาจเนื่องมาจากเกิดการระบาดของโรคติดต่อในสัตว์ปีก และขาดการนำเทคโนโลยีที่เหมาะสมไปใช้ในฟาร์มเกษตรกร (บัญญัติ และคณะ, 2529 และ เชิดชัย และคณะ, 2530) ต่อมาจึงได้มีการคิดค้นเทคนิคการผสมเทียมโดยใช้สาร extender เจือจางน้ำเชื้อไก่เพื่อทำให้น้ำเชื้อเพิ่มขึ้น และสามารถนำน้ำเชื้อไปผสมเทียมให้กับแม่ไก่ได้มากกว่าการผสมแบบธรรมชาติ ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนในการเลี้ยงไก่พ่อพันธุ์ ลดปัญหาการเคลื่อนย้ายไก่พ่อพันธุ์ไปผสมกับแม่พันธุ์ ลดปัญหาการเกิดโรคระบาดในสัตว์ปีก และเป็นการกระจายพันธุกรรมของไก่พันธุ์ดีได้อย่างรวดเร็ว บางครั้งมีการขนส่งน้ำเชื้อไปบริการในถิ่นทุรกันดารซึ่งต้องใช้ระยะเวลาในการเดินทาง การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะสั้นโดยการเลือกใช้สาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว ก็จะสามารถช่วยรักษาคุณภาพน้ำเชื้อไว้ได้ ซึ่งการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะสั้นเป็นการเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ในตู้เย็น (4-5°C) โดยมีปัจจัยที่สำคัญ คือ สาร extender เป็นสารที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณน้ำเชื้อและไม่ทำให้น้ำเชื้อมีความเข้มข้นมากเกินไป อีกทั้งมีบทบาทในการยืดระยะเวลาการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ลดการใช้พลังงานของตัวอสุจิและเป็นแหล่งพลังงานให้กับตัวอสุจิ โดยชนิดของสาร extender ที่เลือกใช้นั้นควรมีค่า pH และค่าออสโมลาลิตีที่ใกล้เคียงกับ seminal fluid ของน้ำเชื้อสัตว์ที่ทำการศึกษา เนื่องจากค่า pH และค่าออสโมลาลิตีมีผลต่อการเคลื่อนที่และอัตราการเมทาบอลิซึมของตัวอสุจิ โดยสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาสัตว์ปีกควรมีค่า pH และค่าออสโมลาลิตีอยู่ในช่วง 6.0-8.0 และ 250-460 mOsm/kg ตามลำดับ (Siudzinska and Lukaszewicz, 2008) สาร extender ที่มีการใช้ในการเจือจางน้ำเชื้อไก่มีหลายชนิด ได้แก่ Beltville Poultry Semen Extender (BPSE), Egg yolk-Tris, Lake's diluent, Tselutin, Schramm, IGGKP, EK Tris-citric-acid-glucose medium (TCG) และ Egg yolk เป็นต้น (เทวินทร์ และยุพิน 2550, 2551; Tselutin et al., 1999; Pistenma et al., 1971; Chalah et al., 1999; พรจิต และคณะ 2554; Moreno et al., 2008; Gee et al., 1993; Seigneurin and Blesbois, 1994 และ Blesbois et al., 2008) ซึ่งที่ผ่านมาได้มีการศึกษาผลของสาร extender ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่ โดยเทวินทร์ และยุพิน (2550) ได้ศึกษาผลของสาร Lake's

diluted, Tselutin, Schramm, BPSE และ IGGKP ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่ 3 สายพันธุ์ คือ เหลืองหางขาว, คละสี และโรดไอส์แลนด์เรด ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 1, 3 และ 6 ชั่วโมง โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 41°C พบว่า BPSE และ IGGKP ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวและคละสี ($P>0.05$) ส่วนในไก่โรดไอส์แลนด์เรด IGGKP ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิตสูงสุด และยังพบว่า Lake's diluted, Tselutin, Schramm, BPSE และ IGGKP ให้ผลอัตราการผสมติดไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) เมื่อใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวและคละสีรวมกัน และ Pistenma et al. (1971) ได้ศึกษาผลของสาร Egg-yolk medium และ Modified Kreb's solution ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พันธุ์ White Leghorn ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 2 ชั่วโมงพบว่า Modified Kreb's solution (80%) ให้ผลอัตราการผสมติดสูงกว่าการใช้ Egg-yolk medium (9.1%) เนื่องจากที่ผ่านมาการศึกษาในไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวยังมีการศึกษาที่ค่อนข้างน้อย จึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่าสาร extender ชนิดใดเหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการใช้สาร extender ต่อการเก็บรักษาไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว

การเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีการแช่แข็งเป็นการเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ในถังที่มีไนโตรเจนเหลว (-196°C) ซึ่งจะเป็นการเก็บรักษาน้ำเชื้อในรูปแบบของ sperm bank เพื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ใช้ในอนาคต ซึ่งประเทศไทยนั้นยังมีการรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งของไก่พื้นเมืองไทยน้อย และผลการศึกษาค่อนข้างแปรปรวน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปัญหาเกี่ยวกับการเลือกใช้สารเคมีต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแช่แข็ง เช่น สาร extender สาร cryoprotectant และนอกจากนี้ยังมีสาเหตุมาจากการเลือกใช้เทคนิคการลดอุณหภูมิที่มีผลทำให้เซลล์อสุจิเกิดการถูกทำลายได้เช่นกัน สาร cryoprotectant เป็นสารที่สำคัญในกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่โดยวิธีการแช่แข็ง ซึ่งมีหน้าที่ปกป้องเซลล์ไม่ให้ถูกทำลายระหว่างกระบวนการแช่แข็งและการละลาย ซึ่งสาร cryoprotectant แต่ละชนิดจะต้องมีความเข้มข้น และระยะเวลา (equilibration time) ที่เหมาะสม เพื่อที่จะออกฤทธิ์และป้องกันการเซลล์ถูกทำลาย โดยสาร cryoprotectant ที่มีการนำมาใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่ ได้แก่ glycerol, Dimethyl sulfoxide (DMSO), Dimethyl acetamide (DMA), Dimethyl formamide (DMF) เป็นต้น และที่ผ่านมามีการศึกษาค้นคว้าของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่ โดย Tselutin et al. (1999) ได้ศึกษาการใช้สาร glycerol, DMA และ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 4, 6, 8 และ 11% ร่วมกับ Lake's diluted ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่สายพันธุ์ทางการค้า (type I99 roosters) พบว่าการใช้ glycerol (72-76%), DMA (62-68%) และ DMSO (20-27%) ให้ผลอัตราการมีชีวิตต่ำกว่าน้ำเชื้อสด (92-94%) และเมื่อนำสาร 11% glycerol และ 6% DMA ร่วมกับ Lake's diluent ไปศึกษาอัตราการผสมติด พบว่าการใช้ 6% DMA (84.1%) ที่มีการลดอุณหภูมิด้วยวิธี Pellet method ให้ผลอัตราการผสมติดไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสด (94.7%) ($P>0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chalah et al. (1999) ที่พบว่าการใช้ 6% DMA ร่วมกับ Lake's diluent (88%) ที่มีการลดอุณหภูมิด้วยวิธี Pellet method ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่สายพันธุ์ทางการค้า (Shaver Starbro) ให้ผลอัตราการผสมติดไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสด (93%) นอกจากนี้จากการศึกษาของ เทวินทร์ และยุพิน (2551) ได้ศึกษาการใช้ 2% DMSO และ 2% Ethylene glycol (EG) ร่วมกับ BPSE ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพบว่าการใช้ 2% DMSO (74.29%) และ 2% EG (59.28%) ให้ผลอัตราการผสมติดไม่แตกต่างกัน และให้ผลอัตราการผสมติดต่ำกว่าน้ำเชื้อสด (96.61%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) Moreno et al. (2008) ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่ *Capra pyrenaica* โดยวิธีการแช่แข็งโดยใช้ Tris-citric acid glucose medium (TCG)

เป็นสาร extender ร่วมกับ 6%chicken egg yolk และ 6%quail egg yolk โดยใช้วิธีการลดอุณหภูมิแบบอั้งไอโนโตรเจนเหลวโดยวางตัวอย่างเนื้อไอโนโตรเจนเหลวที่ระดับ 5 เซนติเมตร นาน 10 นาที พบว่า 6%chicken egg yolk (63.3%) ให้ผลอัตราการผสมติดสูงกว่าการใช้ 6% quail egg yolk (36.4%) ($P<0.05$) นอกจากนี้ Gee et al. (1993) ได้เก็บรักษาน้ำเชื้อไก่ American kestrel โดยวิธีการแช่แข็งโดยใช้ BPSE ร่วมกับ 4, 6, 8 และ 10% DMSO และใช้ freezer control ในการควบคุมการลดอุณหภูมิ พบว่า 6%DMSO (62%) ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่า 10%DMSO (44%) ($P<0.05$) จากผลการศึกษาเกี่ยวกับสาร cryoprotectant ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พบว่า การเลือกใช้สาร cryoprotectant ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ไก่ ระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant และชนิดของสาร extender สำหรับการศึกษาผลของสาร cryoprotectant ในไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวยังมีการศึกษาค่อนข้างน้อย จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าสาร cryoprotectant ชนิดใดและระดับความเข้มข้นใดที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการใช้สาร cryoprotectant ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว

ความสำเร็จของการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่โดยวิธีการแช่แข็งไม่เพียงแต่ขึ้นอยู่กับชนิดของสาร cryoprotectant และสาร extender ที่เหมาะสมเท่านั้น แต่ยังขึ้นอยู่กับอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในการแช่แข็งด้วย ซึ่งหากมีการลดอุณหภูมิช้าเกินไปจะทำให้มีการสูญเสียน้ำจากภายในเซลล์ออกสู่ภายนอกเซลล์ในปริมาณที่มาก ส่งผลให้เกิดภาวะเซลล์เหี่ยวและอาจทำให้ความเข้มข้นของตัวทำละลายทั้งในสารละลายและในตัวสุจิสูงเกินไป เมื่อตัวสุจิสัมผัสอยู่กับสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงเป็นเวลานาน ก็จะทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์สุจิได้ และหากมีการลดอุณหภูมิเร็วเกินไปจะทำให้ภายในเซลล์เคลื่อนที่ออกสู่ภายนอกเซลล์ได้น้อย ส่งผลให้เกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ ซึ่งอาจทำให้เซลล์และอแกเนลถูกผลึกน้ำแข็งทิ่มแทงได้ โดยวิธีการลดอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่โดยวิธีการแช่แข็งมี 3 วิธี คือ 1). การอั้งไอโนโตรเจนเหลว (LN_2 vapour) โดยจะมีตะแกรงสำหรับวางหลอดน้ำเชื้อเหนือระดับไอโนโตรเจนเหลวที่บรรจุอยู่ในภาชนะ (กล่องโฟม) และสามารถปรับระดับตะแกรงสำหรับวางหลอดน้ำเชื้อขึ้นลงได้ตามระดับที่ต้องการ ซึ่งวิธีนี้มีข้อเสีย คือ ในกรณีที่มัตตัวอย่างมากเกินไปอาจทำให้การกระจายของไอโนโตรเจนเหลวไม่ทั่วถึง ซึ่งจะทำให้ น้ำเชื้อที่เก็บรักษานั้นมีคุณภาพต่ำ 2). การใช้ Freezer control วิธีนี้มีหลักการ คือ การพ่นไอของไนโตรเจนเหลวเข้าไปในห้องเล็กๆ (chamber) ที่มีฉนวนอยู่โดยรอบ อัตราการพ่นไอของไนโตรเจนเหลวเข้าไปขึ้นอยู่กับอัตราการลดอุณหภูมิที่ต้องการ ซึ่งการใช้ freezer control จะสามารถควบคุมอัตราการลดอุณหภูมิได้ดีกว่าการลดอุณหภูมิด้วยวิธีอื่นๆ 3). การลดอุณหภูมิด้วยวิธี Pellet method ทำได้โดยหยดตัวอย่างลงบนภาชนะมีลักษณะเป็นถาดหลุม ที่วางอยู่บนน้ำแข็งแห้ง ($-79^{\circ}C$) ตัวอย่างจะแข็งตัวมีลักษณะเป็นเม็ด และนำเม็दन้ำแข็งนั้นไปเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว ($-196^{\circ}C$) ที่ผ่านมาได้ มีการรายงานการศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่โดยวิธีการแช่แข็ง โดยสุนทร และคณะ (2552) ได้ศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิโดยใช้วิธีการอั้งไอโนโตรเจนเหลวที่ระดับ 11 และ 5 เซนติเมตร นาน 5, 10 และ 15 นาที โดยใช้ 10%glycerol และ 6%DMF ร่วมกับ Schramm ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว พบว่า การใช้ 10%glycerol (60%) ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่า 6%DMF (42.8%) ($P<0.05$) ขณะที่การใช้ 10%glycerol และ 6%DMF ให้ผลอัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) เมื่อพิจารณาผลอัตราการผสมติดพบว่าการใช้ 6%DMF ให้ผลอัตราการผสมติดเพียง 22.80% สำหรับ 10% glycerol ไม่ทำให้เกิดการผสมติด จากการศึกษาของ Tselutin et al. (1999) ได้ทำการศึกษาระบบรักษาน้ำเชื้อไก่สายพันธุ์ type I 99 โดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้การลดอุณหภูมิ 2 วิธีคือ 1) ใช้ freezer control ที่อัตราการลดอุณหภูมิที่ $7^{\circ}C$ /นาที จากอุณหภูมิ $5^{\circ}C$ ถึง $-35^{\circ}C$ และใช้

อัตราการลดอุณหภูมิ 20°C/นาทิจากอุณหภูมิ -35°C ถึง -140°C 2) การลดอุณหภูมิด้วยวิธี Pellet method โดยใช้ Dry ice (-80°C) ซึ่งใช้ Lake's diluent เป็นสาร extender ร่วมกับ Glycerol, DMSO และ DMA ที่ระดับความเข้มข้น 4, 6, 8, 11% พบว่าเมื่อใช้ Glycerol ให้ผลอัตราการมีชีวิตอยู่ในช่วง 72-76% ซึ่งให้ผลอัตราการมีชีวิตสูงกว่า DMA (62-68%) และการใช้ DMSO (20-27%) ให้ผลอัตราการมีชีวิตต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่าหากต้องการลดอุณหภูมิด้วยวิธี Pellet method ควรเลือกใช้สาร DMA เป็นสาร cryoprotectant แต่หากใช้การลดอุณหภูมิด้วย freezer control นั้นควรใช้ Glycerol เป็นสาร cryoprotectant และยังพบว่า DMSO เป็นพิษต่อเซลล์อสุจิมากที่สุด ขณะที่ glycerol เป็นพิษต่อเซลล์อสุจิน้อยที่สุด และจากการศึกษาของ Seigneurin and Blesbois (1994) ได้ทำการศึกษาเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่ (SASSO, Sabrcs, France) โดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้ Freezer control ในการควบคุมการลดอุณหภูมิและเปรียบเทียบอัตราการลดอุณหภูมิที่ 5°C/นาทีก, 7°C/นาทีก และ 10°C/นาทีก จากอุณหภูมิ 5°C ถึง -90°C พบว่าที่อัตราการลดอุณหภูมิ 7°C/นาทีก ให้ผลอัตราการผสมติดสูงกว่าอัตราการลดอุณหภูมิที่ 5°C/นาทีก และ 10°C/นาทีก แต่ให้ผลอัตราการผสมติดต่ำกว่าน้ำเชื้อสด ($P < 0.05$) จากการรวบรวมเอกสารพบว่าการเลือกใช้อัตราการลดอุณหภูมิ ขึ้นอยู่กับชนิดของสาร cryoprotectant แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาในไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวยังมีค่อนข้างน้อย จึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเลือกใช้อัตราการลดอุณหภูมิต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว