สมเกียรติ ศรีบุญ: การพัฒนาการแช่แข็งอัณฑะของปลากะพงขาว *(Lates calcarifer)* (DEVELOPMENT OF CRYOPRESERVATION OF TESTIS IN THE ASIAN SEA BASS *(LATES CALCARIFER)*) อาจารย์ที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ ดร. สุรินทร บุญอนันธนสาร, 66 หน้า.

คำสำคัญ: ปลากะพงขาว/การแช่แข็ง/การปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ *Lates calcarifer*

การวางแผนในการอนุรักษ์เป็นวิธีการหนึ่งในการเก็บรักษาทรัพยากรพันธุกรรมในปลาต่าง ๆ ซึ่งจะสามารถนำกลับมาใช้ ผลิตหรือผสมได้ในระยะยาว โดยทั่วไปวิธีการที่ใช้ในการอนุรักษ์สามารถทำได้โดยการรวมกันระหว่างวิธีการเก็บรักษาด้วยกระบวนการการแช่แข็งซึ่งเป็นการจัดเก็บเนื้อเยื่อและ (หรือ) เซลล์ และวิธีการปลูกถ่าย ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) เป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในด้านการค้าในกลุ่มของปลาทะเล การอนุรักษ์ทรัพยากรทางพันธุกรรมของปลากะพงขาวเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในอนาคต ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อวิธีการเก็บรักษาอัณฑะแบบแช่แข็งของปลากะพงขาว และการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ที่ผ่านการแช่แข็งของอัณฑะปลาแช่แข็งในปลาผู้รับ

การหาวิธีการแช่แข็งโดยการแช่แข็งแบบช้าที่เหมาะสมประกอบด้วยการหา cryomedium และอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายหลังการแช่แข็งที่เหมาะสม โดยสาร ในการศึกษาครั้งนี้ extender สามชนิดคือ Mounib NAM หรือ L-15 ทำงานร่วมกับ cryoprotectants สามชนิดคือ DMSO EG หรือ PG ในขั้นตอนถัดไป หาความเข้มข้นของ cryoprotectants ที่เหมาะสมที่ความเข้มข้น 7.5% 10% 12.5% หรือ 15.0% (v/v). การทดลองถัดไปเมื่อได้สภาวะแช่แข็งแล้ว ทำการศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการละลายหลังจากการแช่แข็งโดยอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองมี 2 อุณหภูมิ ได้แก่ 4 และ 10 องศาเซลเซียส ร่วมกับระยะเวลา 2 เวลา คือ 8 และ 10 นาที ในการศึกษาครั้งนี้ เซลล์ spermatogonia สามารถระบุได้จากสัณฐานวิทยา คือ มีขนาด 10 ไมโคเมตรและมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ การย้อมสีด้วย Trypan blue เพื่อประเมินเปอร์เซ็นต์ของอัณฑะหลังการแช่แข็งเมื่อเทียบกับอัณฑะสด เพื่อตรวจสอบอัตราการมีชีวิตของเซลล์ spermatogonia ที่เก็บรักษาด้วยการแช่แข็ง การวิเคราะห์ flow cytometric ด้วย ฟลูออเรสซินไดอะซิเตต (FDA) และ โพรพิเดียมไอโอไดด์ (PI) นอกจากนี้ การวิเคราะห์ apoptosis โดยใช้ FITC-Annexin V and PI ในการย้อมสี และเพื่อยืนยันการคุณสมบัติของการเป็นเซลล์สืบพันธุ์ การวิเคราะห์ in situ hybridizationด้วย vasa antisense RNA. ต่อมาการตรวจสอบเซลล์ testicular ที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งยังสามารถปลูกถ่ายได้หรือไม่ โดยอัณฑะสดและอัณฑะที่เก็บรักษาด้วยการแช่แข็งถูกนำมาย่อยเซลล์ และนำเซลล์ฉีดเข้าในช่องท้องของปลาผู้รับ ผลการศึกษาพบว่า cryomedium ประกอบด้วย L-15 และ DMSO ที่ความเข้มข้น 10% ให้ผลการรอดตายของเซลล์ spermatogonia เมื่ออัณฑะผ่านการแช่แข็งเท่ากับ 78.16%

+0.98% เมื่อเทียบกับอัณฑะสดที่ไม่ผ่านการแช่แข็งเท่ากับ 88.08%+0.58% การละลายอัณฑะแช่แข็งที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสที่ระยะเวลา 8 นาที มีอัตราการรอดตายสูง ในการทดลองถัดไป การย้อมสีด้วย FDA/PI อัตรารอดระหว่างเซลล์สด (81.63±0.92%) และเซลล์ที่ไม่ผ่าการแช่แข็ง (81.06 ±1.11%) ไม่แตกต่างกัน ในการวิเคราะห์ Apoptosis พบว่าการเกิด apoptotic ในอัณฑะที่ผ่านการแช่แข็งมีอัตราการเกิดท่าสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอัณฑะสด แสดงให้เห็นว่ากระบวนการหลังการละลายทำให้เกิดการตายของเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับอัณฑะสด การสังเกตผลที่เกิดขึ้นอาจบ่งชี้ว่า apoptosis เป็นกระบวนการศึกษาที่แบ่งเป็นระยะของการตายของเซลล์ที่เกิดขึ้นในการเก็บรักษาด้วยการแช่แข็งของอัณฑะ ในการใช้ in situ hybridization ทั้งเซลล์สดและเซลล์แช่แข็งพบแสดงออกของยีน vasa แสดงว่า spermatogonia ที่ผ่านการแช่แข็งยังมีคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิด และในการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์พบว่าเซลล์ testicular ทั้งเซลล์สดและเซลล์แช่แข็ง สามารถเคลื่อนที่และรวมตัวกันใน genital ridge ของปลาผู้รับเมื่อนำมาเชื่อมโยงกัน วิธีการแช่แข็งของอัณฑะของปลากะพงขาว และการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธ์ที่ผ่านการแช่แข็งแล้ว ได้ข้อเสนอว่า การทำงานร่วมกันของการแช่แข็งอวัยวะสืบพันธ์ ร่วมกับ การปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธ์จะทำให้กลายเป็นเครื่องมือที่ใช้ในการเก็บรักษาปลากะพงขาวได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางสัตว์ ลายมือชื่อนักศึกษา สมเกียง สยุมพู

ปีการศึกษา 2565 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ศิรินทร์

SOMKIAT SREEBUN : DEVELOPMENT OF CRYOPRESERVATION OF TESTIS IN THE ASIAN SEA BASS (*LATES CALCARIFER*). THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SURINTORN BOONANUNTANASAEN, Ph.D., 66 PP.

Keyword: ASIAN SEA BASS/*LATES CALCARIFER*/CRYOPRESERVATION/GERM CELL TRANSPLANTATION

Preservation strategy has provided a tool to maintain genetic resources in fish which could be restored for long-term uses. In general, a preservation tool could be achieved by combination of cryopreservation which is a process for frozen storage of tissues and/or cells and transplantation. The Asian sea bass (*Lates calcarifer*) has been economically important in the trade of marine fish which is needed to preserve their genetic resources for use in aquaculture in the future. Therefore, the objectives of this study are to determine suitable cryopreservation methods of whole testes in the Asian sea bass and to transplant the cryopreserved testicular cell in allogenic recipient.

To optimize the cryopreservation method using a slow freezing process, suitable cryomedium and thawing processes were determined. This study investigated cryomedium containing three types of extenders (Mounib, NAM or L-1) and three types of cryoprotectants (DMSO, EG, or PG). Next, two suitable cryoprotectants were determined for their optimal concentration including 7.5%, 10 %, 12.5%, or 15.0% (v/v). Subsequently, the best cryomedium was used to explore thawing conditions including temperatures at 4°C or 10°C and times for 4, 8, or 10 min. Through this study, spermatogonia-like cell was identified by its morphological characteristic including 10 µm diameter and large nucleus. Trypan blue staining was used to evaluate the percentage of spermatogonia of cryopreserved testes compared with fresh testes. To validate the viability rate of cryopreserved spermatogonia cell, flow cytometric analysis with fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI) were performed. In addition, apoptosis analysis was carried out using FITC-Annexin V and PI staining. To confirm the function of germ cell, in situ hybridization analysis was also performed using *vasa* antisense RNA. Moreover, to determine whether the cryopreserved testicular cell could exhibit transplantability, fresh and cryopreserved testes were dissociated and intraperitoneally microinjected

into allogenic recipient larvae. Our results showed that suitable cryomedium containing L-15 and 10% DMSO at 10% could gave the viability rate of spermatogonia obtained from cryopreserved testes (78.16%±0.98%) comparing with that obtained from fresh testes (88.08%±0.58%). Thawing conditions at 10°C for 8 min resulted in the highest viability rate. Using FDA/PI staining, a similar viability rate between fresh (81.63±0.92%) and cryopreserved cells (81.06±1.11%) was detectable. Apoptosis analysis showed early apoptotic cell in cryopreserved testes was significantly higher than that obtained from the fresh testes, demonstrating that the post-thaw process induced apoptosis compared to fresh testes. This observation could suggest that apoptosis, which is a process of programmed cell death, occurred in cryopreservation of whole testes. Using in situ hybridization, spermatogonial cell obtained from both fresh and cryopreserved testes showed positive *vasa* expression, suggesting its spermatogonia stem cell characteristic. Our results showed that testicular cells obtained from cryopreserved testes could migrate and incorporate into the genital ridge of recipient fry. Taken together, the cryopreservation method for whole testes of the Asian sea bass was demonstrated, and the cryopreserved testicular cell exhibit transplantability, suggesting that cryopreservation when combined with transplantation would make it possible to become preservation tool.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Animal Technology and Innovation Student's Signature Somkiat Sreetan
Academic Year 2022 Advisor's Signature