บทคัดย่อ

จากการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็งโดยใช้สาร cryoprotectant (dimethyl sulfoxide-DMSO, dimethyl acetamide-DMA, methanol-MeOH, and ethylene glycol-EG) สาร extenders (Calcium- Free Hanks' Balanced Salt Solution-C-F HBSS, Hanks' Balanced Salt Solution-HBSS and Sodium Chloride-NaCl) และอัตราการลดอุณหภูมิที่ one-step freezing rate (10 $^{\circ}$C/min) และ Two-step freezing rates (4 $^{\circ}$C/min จาก 3 $^{\circ}$C ถึง -4 $^{\circ}$C และ 11°C/min จาก -4 $^{\circ}$C ถึง -80°C) ซึ่งใช้ French straw ขนาด 250 µl เป็นตัวเก็บรักษาน้ำเชื้อ โดยใช้ Freezer control (CL 863) และ Cryogenesis Version 4 เป็นตัวควบคุมการลดอุณหภูมิระหว่างขบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวาย นำน้ำเชื้อปลาเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (-196°C) นาน 2 สัปดาห์ จากนั้นนำน้ำเชื้อปลาแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิห้องเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสาร cryoprotectants, extenders และอัตราการลดอุณหภูมิที่ one-step และ two-step ที่มีต่ออัตราการปฏิสนธิ การเคลื่อนที่ และ การมีชีวิตรอด ของน้ำเชื้อปลาแช่แข็ง ผลการศึกษาพบว่าอัตราการปฏิสนธิสูงสุด 41% (81% ของน้ำเชื้อสด) เมื่อใช้ DMSO (12%) + 0.9% NaCl ที่อัตราการลดอุณหภูมิที่ one-step รองลงมาคือ อัตราการปฏิสนธิ 30% (51% ของน้ำเชื้อสด) เมื่อใช้ DMA (10%) + C-F HBSS ส่วนเมื่อทดสอบด้วย MeOH (5%)+ 0.9% NaCl ให้อัตราการปฏิสนธิสูงสุดเพียง 18% (38% ของน้ำเชื้อสด) และเมื่อทดสอบด้วย EG (10%)+ C-F HBSS ให้อัตราการปฏิสนธิเพียงแค่ 8% (12% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งต่ำที่สุดในกลุ่มสาร cryoprotectant ที่ใช้ในการศึกษา นอกจากนี้พบว่าไม่มีความแตกต่างของสาร extender ทั้ง 3 ชนิด (C-F HBSS, 0.9% NaCl และ HBSS) เมื่อทดสอบด้วยสาร cryoprotectant แต่ละชนิด และพบว่าความเข้มข้นของสาร cryoprotectant แต่ละชนิด และอัตราการลดอุณหภูมิที่ one-step และ Two-step ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ การเคลื่อนที่ และ การมีชีวิตรอด อย่างไรก็ตามในการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า อัตราการลดอุณหภูมิที่ one-step โดยใช้ DMSO หรือ DMA เป็นสาร cryoprotectant และ C-F HBSS หรือ 0.9% NaCl เป็นสาร extender มีความเหมาะสมที่จะใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้กับกลุ่ม *Pangasius* ชนิดอื่นๆ

นำผลการศึกษาที่ให้อัตราการปฏิสนธิ สูงสุดในแต่ละ Treatment ของการทดลองที่ 1 (DMSO (12%) + 0.9% NaCl, DMA (10%) + C-F HBSS และ MeOH (5%)+ 0.9% NaCl) มาศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมที่สามารถเก็บน้ำเชื้อก่อนขบวนการแช่แข็ง ณ ระยะเวลาต่าง (5, 10, 20 และ 40 นาที) และขณะเดียวกันนำน้ำเชื้อที่เก็บในระยะเวลาต่างๆ ดังกล่าว ไปศึกษาการถูกทำลายของเซลล์อสุจิโดยใช้ SEM จากการศึกษาพบว่า ระยะเวลาที่ 5 ถึง40 นาที สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายก่อนการแช่แข็งได้ เมื่อทดสอบด้วย DMSO หรือ DMA อย่างไรก็ตามเวลาที่เพิ่มขึ้นเป็น 40 นาที ไม่เหมาะสมเมื่อ

ทดสอบด้วย MeOH และเมื่อศึกษาเซลล์อสุจิถูกทำลายโดยใช้ SEM พบว่า เมื่อทดสอบด้วย MeOH สภาพเซลล์อสุจิถูกทำลาย (ส่วนหัวแยกออกจากส่วนหาง) มากกว่าเมื่อใช้ DMSO หรือ DMA

ABSTRACT

This present study examined the feasibility of cryopreservation of striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* sperm. Two studies were carried out: (1) the effects of extenders, cryoprotectants and freezing rates on fertilization, motility and viability of *P. hypophthalmus* sperm, (2) the effects of equilibration time (5, 10, 20 and 40 min) on fertilization, motility and viability rates, and (3) the use of Scanning Electron Microscope (SEM) to evaluate the cryodamage at different time (5, 10, 20 and 40 min). Effects of four cryoprotectants (dimethyl sulfoxide-DMSO, dimethyl acetamide-DMA, methanol-MeOH, and ethylene glycol-EG), three extenders (Calcium-Free Hanks' Balanced Salt Solution-C-F HBSS, Hanks' Balanced Salt Solution-HBSS and Sodium Chloride-NaCl), and two different freezing procedures (one-step and two-step) on the cryopreservation of striped catfish (*P. hypophthalmus*) sperm were investigated. Sperm were frozen using a controlled-rate freezer in 250 μL straws and stored for two weeks in a liquid nitrogen container. They were then airthawed at room temperature, and fertilization, motility and viability were assessed. The highest fertilization rate 41% (81% of control) was achieved with the combination of 12% DMSO and 0.9% NaCl using a one-step freezing procedure (10 ^{o}C min^{-1}). Dimethyl acetamide (DMA) resulted in a higher fertilization rate (30% or 51% of the control) than MeOH (18% or 38% of the control) or EG (8% or 12% of the control). In addition, the three extenders used did not affect fertilization rates after cryopreservation with each cryoprotectant. Fertilization, motility and viability rates were not significantly different among the three cryoprotectant concentrations and between one-step and two-step freezing procedures. However, fertilization rates of cryopreserved sperm were significantly lower than those of the controls. There was no correlation among fertilization, motility and viability rates. The results of this study indicated that high fertilization rates of striped catfish eggs can be achieved using cryopreserved sperm when frozen at 10 ^{o}C min^{-1} in DMSO or DMA with either 0.9% NaCl or C-F HBSS.

The highest fertilization rates from three cryoprotectants in the first study (12% DMSO+ 0.9% NaCl, 10% DMA+ C-F HBSS and 5% MeOH+ 0.9% NaCl) were used to assess the equilibration time at various times (5, 10, 20 and 40 min) on fertilization, motility and viability rates and also assessed the physical damage using SEM. Sperm samples from 5 successive steps fresh sperm and frozen sperm at various times (5, 10, 20 and 40 min) were evaluated. The equilibration

time during 5 to 40 min can be used to storage sperm before cryopreservation process when using DMSO or DMA treatment. However, with MeOH treatment a longer time storage at 40 min resulted in low fertilization rate. Ruptured plasma membranes and the loss of flagellum were commonly found in frozen sperm. Frequency of physically damaged spermatozoa diluted with the combination of 0.9% NaCl and 5% MeOH appeared to be higher than the other treatments (DMSO or DMA).