สุพรรณี ไก่นิล : ผลของสาร extenders สาร cryoprotectants และอัตราการลดอุณหภูมิต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะ (*Pangasius bocourti*) โดยวิธีการแช่แข็ง (EFFECT OF EXTENDERS, CRYOPROTECTANTS AND FREEZING RATES ON THE CRYOPRESERVATION OF MEKONG CATFISH, *Pangasius bocourti* SPERM) อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร.สมร พรชื่นชูวงศ์, 75 หน้า.

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบผลของสาร extenders สาร cryoprotectants และอัตราการลดอุณหภูมิที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะ (*Pangasius bocourti*) โดยวิธีการแช่แข็ง โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง (1) เพื่อศึกษาผลของสาร extenders และสาร cryoprotectants ต่อเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาเผาะ (*P. bocourti*) (2) ศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ ที่มีผลต่อกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง และ (3) เพื่อผลิตปลาลูกผสม (hybrid species) โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งปลาเผาะผสมกับไข่ปลาสวาย

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของสาร extender 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, Calcium Free Hanks' Balance Salt Solution-C-F HBSS และ 0.9% Sodium chloride-NaCl) ร่วมกับสาร cryoprotectant 4 ชนิด (dimethyl sulfoxide-DMSO, dimethyl acetamide-DMA, methanol-MeOH และ glycerol) ที่ 3 ระดับความเข้มข้น (5, 10 และ 15%) ที่มีผลต่อกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง ใช้ Freezer control (CL 3300) เป็นตัวควบคุมการลดอุณหภูมิ โดยการบรรจุน้ำเชื้อใน straws ขนาด 250 ไมโครลิตร และเก็บรักษาน้ำเชื้อในไนโตรเจนเหลว เป็นระยะเวลา 2 วัน จากนั้นนำน้ำเชื้อมาละลายที่อุณหภูมิห้อง และประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งจากเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต จากการศึกษาพบว่าเมื่อใช้ 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุดเท่ากับ 75.33±2.50% (93% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้น้ำเชื้อสด ($P>0.05$) การใช้ DMA เป็นสาร cryoprotectant ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ (60% หรือ 78% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งสูงกว่าการใช้ MeOH (55% หรือ 74% ของน้ำเชื้อสด) และ glycerol (45% หรือ 63% ของน้ำเชื้อสด) อีกทั้งผลของการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (Correlation) พบว่าเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต มีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกัน นอกจากนี้พบว่าระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ทั้ง 3 ระดับ (5, 10 และ 15%) มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ ($P<0.05$) ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง

การทดลองที่ 2 ตรวจสอบผลของอัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ (One-step โดยการลดอุณหภูมิที่อัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที, Two-steps โดยการลดอุณหภูมิที่อัตรา 4 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก 3 ถึง -4 องศาเซลเซียส ตามด้วย 11 องศาเซลเซียสต่อนาทีจาก -4 องศาเซลเซียสถึง -80 องศาเซลเซียส และ

Three-steps โดยการลดอุณหภูมิที่อัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก 2 ถึง -7 องศาเซลเซียส ตามด้วย 3 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก -7 องศาเซลเซียส ถึง -30 องศาเซลเซียส และ 2 องศาเซลเซียสต่อนาทีจาก -30 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส) ร่วมกับการใช้ 10% DMSO+C-F HBSS ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง พบว่าที่อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step freezing procedure (10 องศาเซลเซียสต่อนาที) ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ (61% หรือ 90% ของน้ำเชื้อสด) และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต (65% หรือ 82% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งสูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ Two-steps หรือ Three-steps freezing procedures ($P<0.05$)

การทดลองที่ 3 ผลิตปลาลูกผสม (hybrid species) โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งปลาเผาะผสมกับไข่ปลาสวาย โดยนำผลการศึกษาที่ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุดในแต่ละชนิดของสาร cryoprotectant จากการทดลองที่ 1 (10% DMSO+C-F HBSS, 10% DMA+C-F HBSS, 5% MeOH+0.9% NaCl และ 10% glycerol+Ginzburg fish ringer) ร่วมกับอัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step freezing procedure (10 องศาเซลเซียสต่อนาที) เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง นำน้ำเชื้อเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลา 2 วัน จากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิห้อง และนำมาผสมกับไข่ปลาสวาย ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อจากเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การการฟัก โดยพบว่าการใช้ 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ (73% หรือ 93% ของน้ำเชื้อสด) และเปอร์เซ็นต์การฟัก (33% หรือ 71% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งสูงกว่าทรีตเมนต์อื่น ๆ แต่ต่ำกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำเชื้อสด ($P<0.05$)

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

SUPANNEE KAININ : EFFECT OF EXTENDERS, CRYOPROTECTANTS AND FREEZING RATES ON THE CRYOPRESERVATION OF MEKONG CATFISH, *Pangasius bocourti* SPERM. THESIS ADVISOR : SAMORN PONCHUNCHOOVONG, Ph.D., 75 PP.

EXTENDER/CRYOPROTECTANT/FREEZING RATE/*Pangasius bocourti*/SPERM

The present study aimed to investigate the effect of extenders, cryoprotectants and freezing rates on the cryopreservation of Mekong catfish, *Pangasius bocourti* sperm. Three experiments were carried out : (1) the effect of extenders and cryoprotectants on fertilization, motility and viability of *P. bocourti* sperm, (2) the effect of freezing procedures on the cryopreservation of *P. bocourti* sperm; and (3) the production of hybrid species using frozen sperm from *P. bocourti* fertilized with eggs from *P. hypophthalmus*.

The first experiment was to investigate the effect of three extenders (Ginzburg fish ringer, Calcium Free Hanks' Balance Salt Solution-C-F HBSS and 0.9% Sodium chloride-NaCl) four cryoprotectants (dimethyl sulfoxide-DMSO, dimethyl acetamide-DMA, methanol-MeOH and glycerol) at three concentrations of 5, 10 and 15% on the cryopreservation of *P. bocourti* sperm. Sperm samples were frozen using a controlled-rate freezer (CL 3300) in 250 μL straws and stored for two days in a liquid nitrogen container. They were then thawed at room temperature, and fertilization, motility and viability rates were assessed. The highest fertilization rate of 75.33±2.50% (93% of control) was achieved with a combination of 10% DMSO and C-F HBSS. This was not significantly different from the control (fresh sperm; $P>0.05$). Dimethyl acetamide (DMA) as cryoprotectant had a higher fertilization rate (60% or 78% of the control) than either methanol (55% or 74% of the control) or glycerol (45% or 63% of the control). There were positive correlations between the fertilization, motility and viability rates. In addition, the three concentrations used (5, 10

and 15%) affected fertilization rates after the cryopreservation with each cryoprotectant $P<0.05$.

The second experiment was to investigate the effect of three freezing procedures (one-step, 10°C min^{-1}, two-steps, 4°C min^{-1} from 3 to -4°C followed by 11°C min^{-1} from -4°C to -80°C and three-steps freezing procedures, 5°C min^{-1} from 2 to -7°C, followed by 3°C min^{-1} from -7°C to -30°C and 2°C min^{-1} from -30°C to -80°C) on the cryopreservation of *P. bocourti* sperm. The combination of 10% DMSO and C-F HBSS was used for cryopreservation of *P. bocourti* sperm. A one-step freezing procedure (10°C min^{-1}) yielded a higher fertilization rate 61% or 90% of control and viability rate 65% or 82% of control than that of the two-steps or three-step freezing procedures ($P<0.05$).

The third experiment was to produce hybrid species using frozen sperm from *P. bocourti* to fertilize eggs from *P. hypophthalmus*. The highest fertilization rate in each cryoprotectant from the first experiment (10% DMSO+C-F HBSS, 10% DMA+C-F HBSS, 5% MeOH+0.9% NaCl and 10% glycerol+Ginzburg fish ringer) with the one-step freezing procedure (10°C min^{-1}) were used for cryopreservation of *P. bocourti* sperm. After being stored for two days in a liquid nitrogen container, sperm samples were thawed at room temperature and fertilized with eggs from *P. hypophthalmus*. Fertilization and hatching rates of hybrid species were assessed. The highest fertilization rate was 73% or 93% of control and the hatching rate 33% or 71% of control was achieved with a combination of 10% DMSO and C-F HBSS. These were significantly higher than other treatments, but lower than the control (fresh sperm; $P<0.05$).

School of Animal Production Technology — Student's Signature _____

Academic Year 2010 — Advisor's Signature _____

Co-advisor's Signature_____