ดวงจันทร์ ดอกพอง : การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด Small scale mud carp, *Cirrhinus microlepis* แบบระยะสั้นและแบบระยะยาว (SHORT-TERM AND LONG-TERM STORAGE OF SMALL SCALE MUD CARP, *Cirrhinus microlepis* SPERM) อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร.สมร พรชื่นชูวงศ์, 113 หน้า.

การศึกษาความเป็นไปได้ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดได้ทำการศึกษาทั้งการเก็บรักษาแบบระยะสั้นและการเก็บรักษาแบบระยะยาว แบ่งการศึกษาออกเป็น 3 การทดลอง โดยการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะสั้นได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อยดังนี้ (1.1) ผลของสาร extender และระยะเวลาการเก็บต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะสั้นของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด (1.2) ผลของอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะยาวได้แบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อยดังนี้ (2.1) ผลของชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง (2.2) ผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง และการทดลองที่ 3 ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ ของน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด

การศึกษาผลของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น โดยใช้สาร extender 10 ชนิด (Kurokura medium-KU, modified cortland solution-MC, Calcium-Free Hanks' balanced salt solution-C-F HBSS, modified fish ringer's solution-MFR, 0.9% NaCl, Hanks' balanced salt solution-HBSS, sperm motility inhibiting saline medium-SM, Immobilizing Saad solution-Saad, 350 mM glucose and Immobilizing solution-IM) ทำการเจือจางน้ำเชื้อในสาร extender แต่ละชนิด และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นทำการทดสอบผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต ที่ระยะเวลาการเก็บ 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 และ 120 ชั่วโมง พบว่าการเก็บที่ระยะเวลา 6-24 ชั่วโมง การใช้สาร extender ทั้ง 10 ชนิด ไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต ($P>0.05$) ยกเว้นการใช้ Saad และ SM ที่ระยะเวลาการเก็บ 12 และ 24 ชั่วโมง มีอัตราการมีชีวิตต่ำกว่าการใช้สาร extender ชนิดอื่น ๆ และเมื่อทำการเก็บในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้นที่ 48-96 ชั่วโมง พบว่าการใช้ MC และ IM ยังมีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่า 50% และสูงกว่าสาร extender ชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อนำสาร extender ทั้ง 10 ชนิด มาทำการทดสอบอัตราการปฏิสนธิที่ระยะเวลาการเก็บ ณ เวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการใช้สาร extender 3 ชนิด (HBSS, MC และ KU) ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด และให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด ($P>0.05$) จากนั้นนำสาร

extender ทั้ง 3 ชนิด ดังกล่าว (HBSS, MC และ KU) มาทำการทดสอบอัตราการปฏิสนธิ ณ เวลาการเก็บที่ 72 ชั่วโมง พบว่าการใช้ HBSS ให้ผลอัตราการปฏิสนธิสูงสุด 28.39±3.44% (55% ของน้ำเชื้อสด) จากนั้นนำสาร extender ที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 1.1 (HBSS) มาศึกษาอัตราการเจือจางที่อัตราส่วนต่าง ๆ คือ 1: 3, 1: 5, 1: 10 และ 1: 15 ที่ระยะเวลาการเก็บ 0, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าการใช้อัตราการเจือจางที่อัตราส่วน 1: 3, 1: 5, 1: 10 และ 1: 15 ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ และให้ผลไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (undiluted sperm, $P>0.05$) ที่ระยะเวลาการเก็บเริ่มต้น (0 ชั่วโมง) และพบว่าเมื่อระยะเวลาการเก็บเพิ่มขึ้นเป็น 48 ชั่วโมง และเพิ่มอัตราการเจือจางเป็น 1: 10 และ 1: 15 ส่งผลให้มีอัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ ต่ำกว่าการใช้อัตราการเจือจาง 1: 3 และ 1: 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

การศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้สาร cryoprotectant 4 ชนิด (dimethyl sulfoxide-DMSO, dimethyl acetamide-DMA, glycerol and methanol-MeOH) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15% และใช้ HBSS เป็นสาร extender พบว่าการใช้ 5% glycerol มีอัตราการปฏิสนธิสูงสุด 64.97±1.82% (74% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งสูงกว่าทรีทเมนต์อื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) จากนั้นเลือกสาร cryoprotectant ที่ให้ผลดีที่สุด คือ 5% glycerol ร่วมกับ HBSS มาทำการศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้วิธีอัตราการลดอุณหภูมิ 3 แบบ (One-step, Two-steps และ Three-steps) พบว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step และ Two-steps มีอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการมีชีวิตสูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ Three-steps อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

การศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิทั้งในน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด ในน้ำเชื้อสดพบว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อ 1×10^6: 1 และ 1.5×10^6: 1 ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ ($P<0.05$) ส่วนในน้ำเชื้อแช่แข็งพบว่าเมื่อใช้จำนวน sperm: egg ratio ที่อัตราส่วน 1.30×10^6:1, 1.95×10^6: 1 และ 2.60×10^6: 1 ส่งผลให้มีอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) แต่เมื่อมีการเพิ่มหรือลดจำนวน sperm: egg ratio ทั้งในน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็ง มีผลทำให้อัตราการปฏิสนธิลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

DUANGCHAN DOKPONG : SHORT-TERM AND LONG-TERM STORAGE OF SMALL SCALE MUD CARP, *Cirrhinus microlepis* SPERM. THESIS ADVISOR : SAMORN PONCHUNCHOOVONG, Ph.D., 113 PP.

SHORT-TERM STORAGE/LONG-TERM STORAGE/FREEZING RATE/ SPERM: EGG RATIO/SPERM/*Cirrhinus microlepis*

This study examined the feasibility of short-term and long-term storage of small scale mud carp, *Cirrhinus microlepis* sperm. Three major experiments were carried out. The first experiment was subdivided into two parts for short-term storage: (1.1) the effect of extenders and times storage on short term storage of *C. microlepis* sperm, (1.2) the effect of dilution ratios (sperm: extender) and times storage on short-term storage of *C. microlepis* sperm. The second experiment was also divided into two parts for long-term storage: (2.1) the effect of cryoprotectants and their concentrations on cryopreservation of *C. microlepis* sperm, (2.2) and the effect of freezing procedures on cryopreservation of *C. microlepis* sperm. The third experiment was to investigate the effects of fresh and cryopreserved sperm on fertilization rates of *C. microlepis*.

The effects of ten extenders (Kurokura medium-KU, modified cortland solution-MC, Calcium-Free Hanks' balanced salt solution-C-F HBSS, modified fish ringer's solution-MFR, 0.9% NaCl, Hanks' balanced salt solution-HBSS, sperm motility inhibiting saline medium-SM, Immobilizing Saad solution-Saad, 350 mM glucose and Immobilizing solution-IM) on the short term storage of *C. microlepis* sperm were investigated. Sperm samples were diluted with each extender and stored for 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 and 120 h at 4°C, motility and viability rates were assessed. Ten of the extenders

used did not affect motility and viability rates after storage for 6-24 h ($P>0.05$), except Saad and SM diluents in which viability rates were significantly lower than other extenders after storage for 12 and 24 h. With increasing storage time from 48 to 96 h, the sperm diluted with MC and IM retained motility rate more than 50%, and was significantly higher than the other extenders ($P<0.05$). After storage for 48 h, the effects of ten extenders on the fertilization rate were investigated. Three extenders (HBSS, MC and KU) did not affect the fertilization rates of *C. microlepis* sperm and produced no significant difference from the control ($P>0.05$). These three extenders (KU, MC and HBSS) were used to investigate the fertilization rate, at 72 h of storage. The highest fertilization rate 28.39±3.44% (55% of control) resulted from HBSS diluent. The best extender from the experiment 1.1 (HBSS) was used to evaluate the effects of four dilution ratios (sperm: extender) at 1:3, 1:5, 1:10 and 1:15 and times storage at 0, 48 and 72 h. At the beginning of the time storage (0 h), dilution ratios among 1:3, 1:5, 1:10 and 1:15 did not affect the percentages of fertilization, viability and motility. These results were not significantly different from the control treatment (undiluted sperm, $P>0.05$). Increasing dilution ratios up to 1:10 and 1:15 resulted in lower fertilization, viability and motility rates than those of 1:3 and 1:5 ratios ($P<0.05$), when stored for 48 h.

The effects of four cryoprotectants (dimethyl sulfoxide-DMSO, dimethyl acetamide-DMA, glycerol and methanol-MeOH) at three concentrations (5, 10 and 15%) on the cryopreservation of *C. microlepis* sperm were investigated. HBSS diluent was used as an extender. The highest fertilization rate 64.97±1.82% (74% of control) was achieved with 5% glycerol. This had a significantly higher result than the other treatments ($P<0.05$). Since the combination of 5% glycerol and HBSS yielded the best

fertilization percentage, it was chosen to investigate the effect of three freezing procedures (one-step, two-steps and three-steps) on the cryopreservation of *C. microlepis* sperm. The percentage of fertilization and viability of frozen sperm resulting from one-step and two-step freezing procedures yielded a higher rate of fertilization and viability than that of the three-step freezing procedures ($P<0.05$).

The optimal sperm: egg ratios for fresh and cryopreserved sperm of *C. microlepis* were determined. The sperm: egg ratios of 1×10^6: 1 and 1.5×10^6 did not affect the fertilization rates of fresh sperm ($P>0.05$). In frozen sperm, the fertilization rates obtained from the sperm: egg ratios of 1.30×10^6: 1, 1.95×10^6: 1 and 2.60×10^6: 1 were not significantly different ($P>0.05$). Both excessive and insufficient sperm concentrations from both fresh and frozen sperm resulted in reduced fertilization rates of *C. microlepis* sperm ($P<0.05$).

School of Animal Production Technology
Academic Year 2010

Student's Signature_____
Advisor's Signature_____
Co-advisor's Signature_____