วสันต์ ป้อมเสมา. 2551. **ผลของสาร cryoprotectant ชนิดต่างๆต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งปลาดุกเทศ.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ดร.ศักดิ์ศิริ ศิริเสถียร

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งปลาดุกเทศ (*Clarias gariepinus*) วางแผนการทดลองแบบแฟคตอเรียลร่วมกับกลุ่มควบคุม (augmented factorial experiments) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ทำให้ได้ 10 ทรีทเมนท์รวมกับกลุ่มควบคุม ((3 x 3)+ 1) สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้ได้แก่ เมธานอล (Met) ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) และกลีเซอรอล (Gly) โดยแต่ละชนิดใช้ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 10.0 12.5 และ 15.0 เปอร์เซ็นต์ ในสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็ง ซึ่งสารเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งนี้ ประกอบด้วย 75 mmol/l NaCl, 70 mmol/l KCl, 2 mmol/l $CaCl_2$, l mmol/l $MgSO_4$, 20 mmol/l Tris และ 67 mmol/l glycine ทำการฆ่าปลาดุกเทศเพศผู้ที่มีน้ำหนัก 3 กก.ขึ้นไปอายุ 3 ปี หลังจากนั้นคัดเลือกถุงน้ำเชื้อที่สมบูรณ์ จำนวน 40 ถุงในแต่ละซ้ำของการทดลองบรรจุในถุงพลาสติกเก็บในน้ำแข็งเป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง รีดน้ำเชื้อออกจากถุงด้วยมือและกรองด้วยผ้ากอซได้น้ำเชื้อสดรวมผสมน้ำเชื้อกับสารเจือจางน้ำเชื้อแต่ละสูตรในอัตราส่วน 1:3ทำการบ่มน้ำเชื้อที่ละลายแล้วที่ 4 °ซ นาน 5 นาที บรรจุน้ำเชื้อลงหลอดเก็บน้ำเชื้อขนาด 0.5 มล ปิดหลอดเก็บน้ำเชื้อด้วยดินน้ำมันสีเพื่อบ่งชี้ชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ระดับต่างๆกัน วางหลอดน้ำเชื้อที่ได้บนที่ตั้งหลอดทดลอง เหนือไอของไนโตรเจนเหลวที่บรรจุในกล่องโฟมที่ระดับความสูง 4 ซม เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทหลอดน้ำเชื้อแช่แข็งลงในไนโตรเจนเหลว หลังจากเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว 1 สัปดาห์ ทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยนำหลอดเก็บน้ำเชื้อแช่ลงในน้ำ 25 °ซ นาน 20 วินาทีและในน้ำ 35 °ซ นาน 15 วินาที นำน้ำเชื้อที่ละลายแล้วผสมกับไข่ปลาดุกเทศเป็นเวลา 2 นาที ใส่น้ำกลั่นพอท่วมเพื่อกระตุ้นการปฏิสนธิ เทน้ำใสทิ้ง นำไข่ไปเลี้ยงไว้ในสารละลาย Holtfreter's solution บันทึกผลการปฏิสนธิภายใต้กล้อง เสตอริโอไมโครสโคป จากการศึกษาพบว่าการใช้สาร DMSO ทุกระดับความเข้มข้น ได้ผลการปฏิสนธิ (81.92%) สูงกว่ากลุ่มที่ใช้ Met, Gly และน้ำเชื้อสด (61.22, 51.28 และ 69.70% ตามลำดับ) ($p<0.01$) การพัฒนาของไข่ในระยะที่มีการแบ่งเซลล์จาก 2 - 64 เซลล์หรือระยะแรกของบลาสตูลา พบมากที่สุดในกลุ่มที่ใช้สาร DMSO ทุกระดับ (88.27%) สูงกว่าน้ำเชื้อสด (82.87%) ($p<0.05$) และสูงกว่ากลุ่ม Met และ Gly (65.87 และ56.46%) ($p<0.01$) การพัฒนาของตัวอ่อนในระยะท้ายของบลาสตูลาพบการแบ่งเซลล์

ของ บลาสโตเมียร์เป็นระเบียบมากกว่า 500 เซลล์โดยในกลุ่มที่ใช้สาร DMSO ทุกระดับ (83.45%) สูงกว่ากลุ่มที่ใช้ Met, Gly และน้ำเชื้อสด (47.92, 64.90 และ 68.51% ตามลำดับ) ($p<0.01$) ระยะแกสตรูเลชั่นพบตัวอ่อนเป็นรูปตัว C มีจำนวนที่พบไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่ใช้สาร DMSO ทุกระดับ (82.51%) และน้ำเชื้อสด (86.51%) แต่ให้ผลสูงกว่ากลุ่มที่ใช้ Met และ Gly (44.00 และ 44.90%) ($p<0.01$) ระยะโซไมท์ พบมัดกล้ามเนื้อพัฒนาดีที่สุดในกลุ่มที่ใช้สาร DMSO ทุกระดับ (82.32%) และให้ผลสูงกว่ากลุ่มที่ใช้ Met, Gly และน้ำเชื้อสด (48.17, 54.40 และ 49.02% ตามลำดับ) ($p<0.01$) เมื่อศึกษาในระยะฟักออกเป็นตัว DMSO ทุกระดับ (78.26%) และน้ำเชื้อสด (71.38%) ให้ผลไม่ต่างกันแต่สูงกว่า Met (38.39%) และ Gly (42.76%) ($p<0.01$) ดังนั้นในการใช้สาร DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ระดับ 10.0-15.0เปอร์เซ็นต์ ให้ผลดีต่อการทำน้ำเชื้อแช่แข็งปลาดุกเทศ

Wasun Pomsema. 2008. **Effect of Cryoprotectants on Quality of African Catfish (*Clarias gariepinus*) Deep Frozen Semen.** Master of Science Thesis in Theriogenology, Graduate School, Khon Kaen University.

Thesis Advisor: Dr. Saksiri Sirisathien

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the effect of cryoprotectants on quality of african catfish (*Clarias gariepinus*) deep frozen semen. The experimental design used was the augmented factorial experiment with control ((3x3) +1, 3 replication).Three concentrations (10.0,12.5 and 15.5%v/v) of 3 cryoprotectants, namely methanol (Met), dimethyl sulfoxide (DMSO) and glycerol (Gly) were added to a basal fish semen extender to make 9 treated and 1 control group. The extender was composed of 75 mmol/l NaCl, 70 mmol/l KCl, 2 mmol/l $CaCl_2$, 1 mmol/l $MgSO_4$, 20 mmol/l Tris and 67 mmol/l glycine. African catfish males with 3 kg body weight and over 3 years of age were killed, and their testicles with high quality were collected, protected from water within the plastic bags, and preserved in ice for 4-6 hr. In the laboratory, 40 sacks of testicles in each replication were crushed, filtrated and collected to make pooled-semen and diluted in a semen extender at 4 ^{o}C at the ratio of 1:3 (semen : extender).After 5 min equilibration, diluted semen were loaded into 0.5 ml straws with specific color–clay marker. The straws were pre-cooled by exposing them to nitrogen vapor by placing them on a metal rack at 4 cm above the surface of liquid nitrogen in a Styrofoam box for 10 min and then plunged into the liquid nitrogen. After 1 week in liquid nitrogen, frozen-semen were thawed at 25 ^{o}C for 20 sec followed by 35 ^{o}C for 15 sec and then mixed with stripped ova for 2 min .Fertilization process was activated by adding excess sterile water into the mixture. The supernatant was rinsed out and replaced by Holtfreter's solution, which was used as a culture medium throughout the experiment. The result showed that the highest fertilization rates were obtained in the DMSO group (81.92%) compared to the Met, Gly and fresh semen groups (61.22, 51.28 and 69.70%, respectively) The development of embryos at cleavage stage from 2 - 64 cells or early blastula stage in DMSO group was the highest result (88.27%), of which higher than fresh semen group (82.87%) ($p<0.05$) and also higher than all groups of Met and Gly (65.87 and 56.46% respectively)

($p<0.01$). In late stage of blastulation,compact blastomeres much more than 500 cells were observed, usage of DMSO in all concentration showed the highest result (83.45%) in development when compared with all Met Gly and fresh semen groups (47.92, 64.90 and 68.51%, respectively) ($p<0.01$). In gastrulation stage the developmental stage of embryos were not significantly difference between all concentrations of DMSO and fresh semen group (82.51 and 86.51%),but highly significant when compared with all Met and Gly groups (44.00 and 44.90%) ($p<0.01$). In the somite stage DMSO in all concentration showed the highest result (82.32%) in development, of which higher than all Met Gly and fresh semen groups. (48.17, 54.40 and 49.02% respectively) ($p<0.01$). In hatching stage DMSO supplementation in all concentrations (78.26%) and fresh semen group (71.38%) were not significantly difference but highly significant when compared with all Met and Gly groups (38.39 and 42.76%) ($p<0.01$).Hence, DMSO supplementation in all concentrations (10 – 15%) as a cryoprotectant in this experiment was proved suitable for cryopreservation of african catfish semen.