

Abstract of thesis presented to the Senate of Universiti Malaysia Terengganu in fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science

**THE DEVELOPMENT OF SPERM CRYOPRESERVATION PROTOCOL
FOR PATIN BUAH, *Pangasius nasutus* (Bleeker, 1863)**

WAN NURIZZATI BINTI W IDRIS

JULY 2024

Main Supervisor : Assoc. Prof. Ivan Koh Chong Chu, Ph.D

Co-Supervisor : Prof. Abol Munafi Ambok Bolong, PhD

Abduh Muhammad Yazed, PhD

School/Institute : Institute of Tropical Aquaculture and Fisheries

The development of sperm cryopreservation for Patin Buah, *Pangasius nasutus* is necessary to meet the increasing demand through artificial fertilization. Firstly, the suitable diluent for cool storage was determined by evaluating three types of diluents which were 0.9% sodium chloride (NaCl), Calcium-free Hanks' Balance salt solution (CF-HBSS) and ringer solution. 0.9% NaCl solution was the best performing diluent with motility of $8.33 \pm 1.67\%$ at 48 hours. Then, the basic protocol of sperm cryopreservation was established by identifying the optimal condition for cryodiluents, extender, freezing condition and dilution ratio. Evaluation of nine different cryodiluents, developed from three cryoprotectants (dimethyl sulfoxide, Me₂SO; Methanol, MeOH and dimethyl acetamide, DMA) at three different concentrations (5, 10 and 15%), followed by evaluation of three types of extenders (0.9% NaCl, CF-HBSS and ringer solution) were investigated. Optimal cooling rate was evaluated by investigating four different cooling rates (11.98, 10.57, 9.23 and 6.25 °C min⁻¹) obtained by manipulating the cooling height of the straw. For optimal ratios, various dilution ratios (1:9, 1:19 and 1:49) were evaluated. The optimal protocol was developed where 10% MeOH with 0.9% NaCl as extender was a suitable cryodiluent.

Cooling rates at $9.23\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ was optimal and dilution ratios from 1:9 to 1:49 can be used to cryopreserve the sperm. Further evaluation on the viability and applicability of the developed protocol was investigated. For long-term storage, there was no significant change in PTM and motility duration during 12 months of storage. Fertilization and deformity trials were conducted at different sperm to egg ratios. Fresh and cryopreserved sperm showed no significant differences at sperm to egg ratio of 100,000:1, except for hatching rate. Higher sperm to egg ratio for cryopreserved sperm resulted in increased fertilization rates, with hatching rates significantly higher at ratio of 300,000:1 compared to 150,000:1. There was no significant difference in deformity rates for fresh and cryopreserved at sperm to egg ratio of 300,000:1. In conclusion, this study has developed a suitable protocol for *P. nasutus* sperm cryopreservation and demonstrated that this protocol is viable for up to 12 months and greatly assist in seed production.

Abstrak tesis yang dikemukakan kepada Senat Universiti Malaysia Terengganu
sebagai memenuhi keperluan untuk Ijazah Sarjana Sains

**PEMBANGUNAN PROTOKOL KRIOAWETAN SPERMA UNTUK PATIN
BUAH, *Pangasius nasutus* (Bleeker, 1863)**

WAN NURIZZATI BINTI W IDRIS

JULAI 2024

Penyelia : Prof. Madya Ivan Koh Chong Chu, Ph.D

Penyelia Bersama : Prof. Abol Munafi Ambok Bolong, PhD

Abduh Muhammad Yazed, PhD

Pusat Pengajian/Institut : Institut Akuakultur Tropikal dan Perikanan

Pembangunan krioawetan sperma untuk Patin Buah, *Pangasius nasutus* adalah perlu bagi memenuhi permintaan yang semakin meningkat melalui persenyawaan aruhan. Pertama, pelarut yang sesuai untuk penyimpanan sejuk ditentukan dengan menilai tiga jenis pelarut iaitu 0.9% Sodium Chloride (NaCl), Calcium-free Hanks' Balance salt solution (CF-HBSS) dan larutan ringer. Larutan 0.9% NaCl adalah pencair berprestasi terbaik dengan motiliti $8.33 \pm 1.67\%$ pada 48 jam. Kemudian, protokol asas krioawetan telah ditubuhkan dengan mengenal pasti keadaan optimum untuk *cryoprotectants*, *extender*, kadar penyejukan dan nisbah pencairan. Penilaian sembilan *cryoprotectants* berbeza, dibangunkan daripada tiga kriopelindung (dimethyl sulfoxide, Me₂SO; Methanol, MeOH dan dimethyl acetamide (DMA) daripada tiga kepekatan berbeza (5, 10 dan 15%), diikuti dengan penilaian tiga jenis daripada *extender* (0.9% NaCl, CF-HBSS dan larutan ringer) telah dikaji. Kadar penyejukan optimum dinilai dengan menyiasat empat kadar penyejukan berbeza (11.98, 10.57, 9.23 dan 6.25 °C min⁻¹) yang diperolehi dengan memanipulasi ketinggian penyejukan straw. Untuk nisbah optimum, pelbagai nisbah pencairan (1:9, 1:19 dan 1:49) telah dinilai. Protokol optimum telah dibangunkan di mana 10% MeOH dengan 0.9% NaCl

sebagai *extender* adalah *cryoprotectants* yang sesuai. Kadar penyejukan pada $9.23\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ adalah optimum dan nisbah pencairan dari 1:9 hingga 1:49 boleh digunakan untuk mengawetkan sperma. Penilaian lanjut mengenai daya saing dan kebolegunaan protokol yang dibangunkan telah dkaji. Untuk penyimpanan jangka panjang, tiada perubahan ketara dalam PTM dan tempoh motiliti selama 12 bulan penyimpanan. Percubaan persenyawaan dan kecacatan telah dijalankan pada nisbah sperma kepada telur yang berbeza. Sperma segar dan krioawetan tidak menunjukkan perbezaan yang ketara pada nisbah sperma kepada telur 100,000:1, kecuali kadar penetasan. Nisbah sperma kepada telur yang lebih tinggi untuk krioawetan sperma menyebabkan kadar persenyawaan meningkat, dengan kadar penetasan jauh lebih tinggi pada nisbah 300,000:1 berbanding 150,000:1. Tiada perbezaan ketara dalam kadar kecacatan bagi sperma segar dan krioawetan sperma pada nisbah sperma kepada telur 300,000:1. Kesimpulannya, kajian ini telah membangunkan protokol yang sesuai untuk krioawetan sperma *P. nasutus* dan menunjukkan bahawa protokol ini berdaya saing sehingga 12 bulan dan sangat membantu dalam pengeluaran benih.