



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(51) Int Cl⁷

(11) 320450

A 01 N 1/02

(13) B1

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20021864	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2000.10.17 PCT/EP00/10182
(22)	Inng.dag	2002.04.19	(85)	Videreføringsdag	2002.04.19
(24)	Løpedag	2000.10.17	(30)	Prioritet	1999.10.20, IT, MI99A002200
(41)	Alm.tilgj	2002.06.13			
(45)	Meddelt	2005.12.05			
(73)	Innehaver	Istituto Sperimentale Italiano "Lazzaro Spallanzani" , Via Capolago, 16, I-20133 Milano, IT			
(72)	Oppfinner	Riccardo Aleandri, Via Dessie, 4, I-00199 Roma, IT Andrea Galli, Via Pertini, 24, I-24035 Curno, IT			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS , Postboks 2003 Vikå, 0125 OSLO, NO			
(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for kryokonservering av Teleostei-sæd og fremgangsmåter der slik kryokonservering benyttes			
(56)	Anførte publikasjoner	Ingen			
(57)	Sammendrag				

Den foreliggende oppfinnelsen vedrører en industriell fremgangsmåte for kryokonservering av sæd fra Teleostein. Fremgangsmåten er basert på definisjonen og utnyttelsen av en frysekurve, som muliggjør reproduserbarheten av befruktningseffektiviteter oppnådd fra den frosne sæden ifølge den foreliggende oppfinnelsen. Et ytterligere aspekt ved den foreliggende oppfinnelsen vedrører anvendelsen av en slik fremgangsmåte og produkter i foredlingsprogrammer og genetiske utvelgelse for industriell foredling.

Den foreliggende oppfinnelsen vedrører en fremgangsmåte for kryokonservering av sæd fra Teleostei, samt fremgangsmåter innenfor oppdrett som omfatter den ovennevnte kryokonserveringsfremgangsmåten.

- 5 Fremgangsmåtene for kryokonservering som anvendes på forskjellige biologisk materiale (celler, vev, kjønnsceller) har lenge vært gjenstand for forskning både på industrielt- og vitenskapelig nivå også innenfor det dyretekniske område. Årsaken for denne interessen innenfor det dyretekniske feltet er spesielt tilsiktet konserveringen av germinale celler på grunn av den høyere tettheten av genetisk informasjon sammen-
- 10 lignet med hele dyret. Nyttan av slike fremgangsmåter er avhengig av muligheten for å favorisere å tillate bestemte fordelaktige utvelgelser eller kryssninger, som ellers ville være usannsynlige på grunn av miljøbegrensninger eller geografiske grenser.

Fordelen ved kryokonservering baseres på:

- 15 - muligheten for å konservere det genetiske materiale;
- muligheten for analyser og sammenligning av genetisk materiale, mellom forskjellige individer innenfor en art;
- lettelse å gjøre det lettere for overkryssninger, sammenlignet med overkryssninger hos dyr;
- 20 - muligheten for å velge ut den mest egnede kryssningen ifølge for eksempel miljømessige betingelser;
- muligheten for å sjekke fraværet av forurensing av smittsomme stoffer;
- fordelene ved å konservere reduserte væskevolumer, sammenlignet med opprettholdelsen av oppdrettsdyr.

- 25 Forskjellige fremgangsmåter er i dag tilgjengelige for kryokonserveringen av sæd avledet fra dyrearter med dyretekniske interesser, spesielt fisk av kommersielle interesser. En oversiktsartikkel er presentert i: G. Maisse et al. "INRA Pros. Anim."1988, 11:57-65.

- 30 Lahnsteiner et al., i "Aquaculture", 1996, 144: 265-274 presenterer en frysefremgangsmåte for konserveringen av fiskesæd. I dette tilfellet, så vel som i andre fremgangsmåter som er kjent innenfor fagområdet ligger hovedbegrensningene i den manglende standardiseringen av hele prosessen som er nødvendig for å garantere
- 35 storskala reproduserbarhet ved industrielle applikasjoner.

I P. Conget et al. "Aquaculture" 1996, 143:319-329 beskrives en fremgangsmåte for cryokonservering av regnbueørretsspermatozoa, som gjør bruk av programmerbare fryseenheter.

- 5 Babiak et al. "Aquacultur Research" 1999, 30:707-710, sammenligner forskjellige protokoller for kryokonservering basert på anvendelsen av programmerbare fryseenheter.

Oppfinnelsen tilveiebringer en meget standardisert fremgangsmåte for konservering av sædvæsken av Teleostein, nemlig fisk, basert på definisjonen og anvendelsen av en reproduserbar frysekurve.

Fremgangsmåten er spesielt anvendbar ved genetisk avl og kommersiell oppdrett av forskjellige fiskearter, fortrinnsvis salmonider, helst *Salmo Salar*, *Onchorynchus mykiss*, og kan også benyttes for *Thymallus thymallus* og *Hucho hucho*.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen muliggjør kryokonserveringen i industriell skala, på spermprøver som opprettholder fortreffelig befruktningseffektivitet etter fryseprosessen og påfølgende opptining.

20

Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer en reproduserbar fryseprosess for kryokonserveringen av sæden hos Teleostein arter, som fortrinnsvis tilhører familien salmonider, helst *Salmo salar* og *Onchoryncus mykiss*, kan også benyttes på andre salmonider arter slik som *Thymallus thymallus* og *Hucho hucho*, basert på definisjonen og anvendelsen av en frysekurve, som tilsvarer en kjøle hastighet av prøvene på 30°-40°C/min, fra +2-+6°C til -110°C.

25

Fremgangsmåten (fryseprosessen) ifølge oppfinnelsen omfatter de følgende trinnene:

- 30 a) fremskaffelse av sæd fra utvalgte individer;
- b) fortynning av sæden i et fortynningsmiddel ved et sæd/fortynningsmiddelvolum forhold på mellom 1:3 og 1:5, der det nevnte fortynningsmidlet er en isotonisk løsning som omfatter: NaCl, Hepes ved en konsentrasjon på mellom 10 mM og 35 mM, KCl ved en konsentrasjon på mellom 20 mM og 60 mM, metanol ved en konsentrasjon på mellom 6,5% - 13,5% (volum/volum), Bovine Serum Albumin (BSA) ved en konsentrasjon på mellom 1%-2% (volum/volum), eggeplomme ved en konsentrasjon på mellom 6% og 8% (vekt/volum), sukrose i en konsentrasjon på mellom 0,25% og

35

0,75%, og som har en pH-verdi på mellom 7,2 og 8,2 og en osmolaritet på mellom 250-350 mOsm;

c) likevekt av den fortynnede sæden ved en temperatur på mellom 2°C og 6°C i en tidsperiode på mindre enn 15 minutter, og oppdeling av den fortynnede sædløsningen i

5 0,5 ml "paljetter";

d) frysing ved avkjøling av alikvotene ved en hastighet på 30°C-40°C/minutt fra 4°C til -110°C,

der avkjølingen utføres ved en programmerbar fryseenhet.

- 10 Ifølge en foretrukket utførelsesform av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen omfatter fortynningsmidlet videre CaCl_2 ved en konsentrasjon på mellom 0,5 mM og 1,5 mM og MgSO_4 på en konsentrasjon mellom 0,5 mM og 1,2 mM.

Et enda mer foretrukket fortynningsmiddel omfatter: 20 mM Hepes, pH 7,8, 40 mM

- 15 KCl, 1 mM CaCl_2 , 0,8 mM MgSO_4 , 10% metanol, 103 mM NaCl, 1,5% bovint serum albumin; 7% eggeplomme; 0,5% sukrose og har en osmolaritetsverdi på 300 mOsm.

Fremgangsmåten er standardisert til 0,5 ml paljetter, som indikert i trinn c) ifølge fremgangsmåten. Slike rør fremstilles med syntetisk materiale, slik som for eksempel

- 20 PETG eller SURLINE slik som I.M.V. "paljetter" (L'Aigle Cedex, France) som er vanlig å benytte til formål som flytende prøvelagring. Andre rør med lignende dimensjoner og egenskaper kan benyttes med kun rutinemessige justeringer ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen, utført ved en fagmann på området.

- 25 Kjølehastigheten (frysekurven) i trinn d) ifølge fremgangsmåten, oppnås med en programmerbar fryseenhet, slik som digitcool 5300® eller andre enheter med de samme tekniske karakteristika for programmering.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er med hell anvendt ved frysing av sæd fra

- 30 oppdrettsfisk som tilhører salmonidefamilien. Spesielt er det en særlig fordelaktig ved frysing av regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) og laks (*Salmo salar*) sæd og kan på en nyttig måte også anvendes på andre salmonidearter slik som harr (*Thymallus thymallus*) og Donau laks (*Hucho hucho*).

- 35 Det kan oppnås kryokonservert sæd ved fremgangsmåten som er beskrevet over. Hovedkarakteristikaene er at: produktet er avledet fra utvalgte individer, foretrukket er det genetisk evaluert og rangert, og foretrukket er det fritt for kjente patogener (ifølge

loven 91/67/CEE). Videre transporteres den lett hvor som helst (under kontrollerte temperturbetingelser), uten vesentlig geografisk grense for anvendelsesstedet; når det benyttes ved *In vitro* befruktnings (IVF) prosedyrer, gir en reproducerbare befruktningseffektiviteter; dens anvendelse blir fordelaktig utvidet, det vil si for å
 5 opprettholde den genetiske arven av vill fisk, for å realisere inter- eller intraarts-overkryssninger, for å utføre utvelgelsesskjemaer og for foredlingen av genetisk forbedrede etterkommere.

Ved en ytterligere utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for *in vitro* befruktning (IVF) som omfatter kryokonserveringsfremgangsmåten med trinnene
 10 a)-d) ifølge den ovenfor beskrevne fremgangsmåte, og som videre omfatter trinnene:
 e) opptining av sæden ved inkubasjon i et vannbad ved en temperatur på mellom 20°C og 30°C i en periode på mindre enn 1 minutt;
 f) fortynning av den opptinede sæden i et områdeforhold på mellom 1:1 og 1:5
 15 (volum/volum) med en befruktningsbuffer;
 g) tilsetning av den fortynnete sæden til Teleostein egg under forsiktig blanding;
 h) inkubasjon av blandingen i en periode på mellom 2 minutter og 5 minutter og ved en temperatur på mellom +2°C og +6°C
 i) fortynning av blandingen med ferskvann til 30-60 ml for 100-200 egg,
 20 j) inkubasjon av den fortynnete blandingen ved en temperatur på mellom 4°C og 13°C i ikke mindre enn 20 dager.

Befruktningshastigheten som oppnås ved fremgangsmåten ifølge denne ytterligere utførelsesformen ifølge oppfinnelsen er standardisert, og strekker seg fra 90% til 30%,
 25 fortrinnsvis fra 80% til 50% og er oppnådd i industriell skala.

Fremgangsmåten ifølge de forskjellige utførelsesformene ifølge oppfinnelsen er spesielt fordelaktige innenfor det dyretekniske feltet, spesielt innenfor aquakultur for standardisert forplantning av oppdretts Teleostein og spesielt ved foredlingen av
 30 genetisk forbedrede etterkommere, som tilhører familien Salmonider, hvor i blant *Oncorhyncus*, *Salmo*, *Thymallus* og *Hucho* slektene fortrinnsvis velges. Mest foretrukket er *Oncorhyncus* og *Salmo* slektene.

Fryse- og *in vitro* befruktningsprosessene ifølge oppfinnelsen benyttes med suksess i
 35 industrielle og forskningsprosesser for å konservere den genetiske arven av disse dyreartene eller benyttes i utvelgelsesskjemaer for å designe foredlinger som resulterer i individer med kvaliteter som er nyttige ved forbedring av arter i oppdrett ved en hver

aquakultur tilstand (foredling av genetisk forbedrede etterkommere). Vanligvis blir kvaliteter slik som gjennomsnittlig daglig vektøkning (ADG), overlevelsrate (SR), normal etterkommerrate (NPR), positivt utvalgt til en hvilken som helst akvakulturhensikt. Andre positivt utvalgte kvaliteter representeres ved den individuelle vekten (IW), lengde (L) eller glans (B). Negativ utvelgelse benyttes for eksempel i antallet av abnorme etterkommere (NAF). Evaluering av den genetiske komponenten av slike egenskaper positivt utvalgt individene og i deres genetiske materiale (den frosne sæden) utføres ved statistisk analyse ved fremgangsmåter som er velkjente innenfor fagområdet (S. Searle, 1987. "Linear models for unbalanced data" John Wiley & Sons Inc. Edit. New York NY-USA; L.D. Van Vleck, 1993, "Selection index and introduction to mixed model methods". CRC Press Inc. Edit, Boca Raton, FL-USA; C.R. Henderson, 1975, "Comparison of alternative sire evaluation methods", J. Animal Science, 41:760) for eksempel ved den såkalte BLUP modellen, slik som "stamfar modellen", eller "dyremodellen" eller andre lineære modeller som tillater evaluering av effektene av variablene som er definert over i den hensikt å gi en genetisk rangering av verdiene av frossen sæd. Denne verdien tas i betraktning ved utforming av nye foredlingsskjemaer for å oppnå utvalgte etterkommene, for spesielle akvakulturtilpassede betingelser eller ifølge forskjellige retningslinjer det vil si innenfor feltet forskning eller på grunn av markedsorienterte årsaker.

I et ytterligere aspekt vedrører oppfinnelsen således en fremgangsmåte for konservering av den genetiske arv hos utvalgte dyr som er karakterisert ved at den ovenfor beskrevne kryokonserveringsfremgangsmåten benyttes.

Oppfinnelsen vedrører også de følgende fremgangsmåtene:

- fremgangsmåte for å utforme foredlinger,
 - fremgangsmåte for forbedring av oppdrettsarter i akvakultur,
 - fremgangsmåte for foredling av genetisk forbedrede arter, og
 - fremgangsmåte for evaluering av den genetiske verdi av den individuelle fisken,
- som alle er karakterisert ved at den ovenfor beskrevne kryokonserveringsfremgangsmåten benyttes.

Fremgangsmåten ifølge alle eller bestemte utførelsesformer ifølge oppfinnelsen er også nyttig i industrielle og forskningsprosesser som krever;

- konservering av det genetiske materiale hos "ville" prøveeksemplarer som er brakt i fare av ekstreme miljøbetingelser (forurensning etc.);
- genetiske analyser av prøveeksemplarer med spesielle egenskaper;

- lettelsen og utformingen av krysningsavl, med hensyn på avl av de komplette dyrene;
 - utvelgelsen av den mest egnede foredlingen ifølge forskjellige miljøbetingelser;
 - sikkerheten ved foredling ved kontroll av forurensning av smittefarlige midler;
- reduksjonen av vedlikeholdskostnader av levende prøveeksemplarer for reproduksjon.

5

Oppfinnelsen er detaljert i de følgende eksperimentelle eksemplene.

Eksempel 1:

Oppsamling og frysing av regnbueørret (*Onchorhynchus mykiss*) og laks (*Salmo salar*) sæd.

10

Sæden ble oppsamlet ved bukmassasje fra tidligere rolige reproduktive individer av *Onchorhynchus mykiss* og *Salmo salar* artene.

15 Volumet av væsken som ble oppsamlet ble fastslått ved mikropipette; en hver forurenset prøve ble kastet.

~

Synlige bevegelse (VM) ble fastslått ved observasjon gjennom et 20 x fasemikroskop, etter aktivering av sædcellen (utført i en Makler celle) ved 4°C, fortynnet 1:10 i en
20 befruktningsløsning bestående av: 60 mM NaHCO₃; 20 mM glysin, 5 mM teofylin; 50 mM triss, pH 9.

Fryseprosessen ble utført som følger: Sæden ble fortynnet ved et sæd:
fortynningsmiddelforhold på mellom 1:3 og 1:5 (som indikert i tabellen) med en
25 bufferløsning som inneholdt: 103 mM NaCl, 40 mM KCl; 1 mM CaCl₂, 0,8 mM MgSO₄, 20 mM hepes, pH 7,8, 10% metanol, 1,5% bovinserumalbumin; 7% eggeplomme; 0,5% sakkarose.

Den fortynnede sædprøven ble deretter oppdelt i 0,5 ml alikvoter i "paljetter", brakt i
30 likevekt ved 4°C i 10 min. og frosset i flytende nitrogen ved avkjøling ved en hastighet på 30°C/min. fra +4°C til -110°C, ved å bestemme frysekurven på den digitkul 5300® programmerbare fryseenheten. "paljetter" ble deretter nedsenket i flytende nitrogen.

Den synlige bevegelsen (VM) av sæden ble fastslått etter oppsamling og etter fryse-
35 opptiningsprosedyren som ble utført ved inkubasjon av paljettene i et termostatisk bad ved 25°C i 30 sekunder.

Data relatert til den synlige bevegelsen (VM) for regnbueørretsædprøven (serie T) er angitt i tabell 1, mens data relatert til laksesæd VM før og etter behandling (kryokonservering ifølge oppfinnelsen) er vist i tabell 2.

Tabell 1 – synlige bevegelse (VM) data for serier T (regnbueørret).

batch/ Stamfar kode	Volum(ml) sæd oppsamlet	VM (%) sæd	Fortynnings- forhold	VM (%) etter behandling	Nr. fremstilte "paljetter"
1/1T	1,5	80-90	1:5	5-10	12
1/2T	1,2	80	1:5	25	7
1/3T	3	90-95	1:5	15-20	17
1/4T	1,5	90-95	1:5	5-10	14
1/5T	8	90-95	1:5	5-10	20
1/6T	1,7	90	1:5	10-15	15
1/7T	1,6	85-90	1:5	5-10	14
1/8T	1,9	95	1:5	10-15	17
1/9T	2	85	1:5	5-10	17
1/10T	2	85-90	1:5	25	14
1/11T	2	90	1:5	5-10	18
2/1T	1,5	90	1:3	10	9
2/2T	1	90	1:5	10	9
2/3T	3	85	1:3	5-10	19
2/4T	2	80	1:3	10	12
2/5T	2,5	85	1:5	15	20
2/6T	1,2	90	1:4	10-15	8
2/7T	4,5	50	1:3	15-20	12
2/8T	1,2	90	1:3	15	7
2/9T	2	70	1:3	15-20	12
2/10T	5	85-90	1:3	10	29
2/11T	1,3	90	1:3	20	7
3/1T	1	75	1:3	10	7
3/2T	1,6	70	1:3	15-20	9
3/3T	2	70	1:3	20-25	13
3/5T	1,5	80	1:3	25-30	9
3/6T	2	90	1:3	5-10	12
3/8T	1,7	85	1:3	10-15	10
3/11T	1,7	85	1:3	5-10	11

Tabell 2 – Synlig bevegelighet (VM) data for series S (laks).

Batch/stamfar	Vol (ml) melke	Vol. (ml) benyttet melke	Vol. (%) melke	Fortynnings- forhold (melke:ekstender)	VM (%) etter opptining	Nr. fremstilte strå
1/1S	3	3	90	1:3	15	14
1/2S	4	3	65	1:3	25	17
1/3S	3	3	75	1:3	50	11
1/4S	5	3	80	1:3	30	23
1/5S	3	3	70	1:3	20	15
1/6S	3	3	80	1:3	30	25
1/7S	3	3	70	1:3	15	18
1/8S	3	3	50	1:3	10	22
1/9S	2	2	80	1:3	30	9
1/10S	8	3	75	1:3	15	20
2/1S	6	1	70	1:3	30	5
2/2S	4	3	65	1:3	25	17
2/3S	3	3	85	1:3	20	27
2/4S	10	3	90	1:3	16	19
2/5S	9	3	85	1:3	35	29
2/6S	3	3	80	1:3	15	10
2/7S	5	3	75	1:3	35	10
2/8S	4	3	85	1:3	25	20
2/9S	4	3	95	1:3	30	15
2/10S	3	3	95	1:3	10	26

5 **Eksempel 2: Bestemmelse av befruktningseffektiviteten i T serieprøvene.**

30 kjønnsmoden hunner, ikke bundet av familietilknytninger, av lignende gjennomsnittlig størrelse som hannene som ble benyttet ved sædoppsamling, ble tatt prøver av, merket og isolert frem til tidspunktet for uttrykkelse av eggene.

10

10 hunner ble benyttet som eggdonorer i befruktningstesten og 20 i fremstillingen av etterkommergruppene. Til denne hensikt ble eggene som var skaffet fra alle 20 hunnene samlet i et enkelt basseng og oppdelt i alikvoter av passende størrelse for hvert

eksperiment. Slike hunner stammet fra fiskerier som offisielt var erklært frie for infeksjon eller sykdom. De frosne sædprøvene ble brakt til fiskeriene for befruktingen av eggene og evalueringen av befruktningseffektiviteten på stedet (etterkommerproduksjon). Alle sædprøvene som ble benyttet hadde en synlig
5 bevegelse, målt som beskrevet i det tidligere eksemplet, og ikke mindre enn 10%.

Omtrent 2000 egg ble benyttet i produksjonen av oppdrettsetterkommere og omtrent 150 i befruktnings testen. I begge tilfellene ble eggene overført til et beger og fortynnet 1:2 med befruktningsløsningen som omfattet: 60 mM NaHCO₃; 20 mM glysin; 5 mM
10 teofilin; 50 mM tris, pH 9.

De frosne sædprøvene ble opptint som beskrevet over, fortynnet med befruktningsløsningen og plassert sammen med eggene (1 "paljett" inneholdt 0,5 ml sæd/150 egg) og ble forsiktig blandet.

15 Etter 3 minutter med inkubasjon ved 4°C, ble springvann tilsatt (50 ml/150 egg) og eggene ble vasket og innkubert i strømningsutklekningsanlegg ved en temperatur på 11°C. Utviklingen av embryoer ble oppnådd i ferskvann og befruktnings suksess prosenten ble vurdert etter 30 dager ved å måle prosenten av embryoer med øye.

20 Dataene vedrørende prosenten av egg som var befruktet etter fryse- og opptiningsbehandlingen er vist i tabell 3.

Tabell 3 – Evaluering av fryseprosessen: resultater av befruktningstesten.

Hann		Nr.	% befruktete egg
Serie	Kode		
T	1	3	65,0
T	2	3	74,0
T	3	3	72,0
T	4	3	48,0
T	5	3	48,0
T	6	3	78,0
T	7	3	59,0
T	8	3	70,0
T	9	3	71,0
T	10	3	60,0
T	11	3	68,0
gjennomsnitt			64,0

n = antall gjentakelser av eksperimenter

- 5 Eksperimentet ble gjentatt under oppdrettsbetingelser i fiskerier for å evaluere reproduserbarheten ved det industrielle nivået innen aquakultur.

Tabell 5 viser resultatene av befruktningseksperimentene utført ved det industrielle nivået.

10

Etterkommergruppene som var avledet fra hver hann ble holdt i separate tanker (to tanker for hver etterkommergruppe) frem til tidspunktet da fisken var på tilstrekkelig størrelse til å kunne merkes.

Tabell 4 – Akvaoppdrettsbefruktningsresultater

Hann		Befrukningseffektiviteter	
		Test 1	Test 2
Serie	Kode	Befruktede egg (%)	Befruktede egg (%)
T	1	37,9	48,0
T	2	60,0	50,0
T	3	72,0	63,0
T	4	40,0	21,1
T	5	15,0	29,0
T	6	28,0	23,0
T	7	28,0	42,0
T	8	20,0	62,0
T	9	49,0	48,0
T	10	36,0	58,0
T	11	64,0	53,0
Total		40,0	48,0

- 5 Gjennomsnittene for befrukningseffektivitetene som ble oppnådd ved akvaoppdrett, som er presentert i tabell 4, er lignende med de som ble oppnådd ved individuelle laboratorieutførte tester, som er presentert i tabell 3. Disse resultatene viser at for regnbueørreten tilpasses den standardiserte protokollen, som er oppnådd ved anvendelsen av frossen sæd, godt til aquakultur ved oppdrettsbetingelser uten tap av effektivitet.

Eksempel 3.

Evaluerer av befruktningskapasiteten på S seriesæden etter fryse-opptiningsbehandlingen (*Salmo salar*).

- 15 En eksperimentell prosedyre lignende med den som ble benyttet i eksempel 1 og 2 ble benyttet på *Salmo salar* egg for å evaluere befruktningshastigheten med frossen sæd.

- 20 10 kjønnsmodne hunner, ikke bundet av familietilknytning, av lignende gjennomsnittlig størrelse som hannene som ble benyttet ved sædoppsamling, ble tatt prøver av, merket og isolert frem til tidspunktet for uttrykkelse av eggene.

5 hunner ble benyttet som eggdonorer ved befruktningstesten og 5 ved produksjonen i etterkommergruppene. I denne hensikten ble eggene som ble tatt fra alle 5 hunnene samlet i et enkelt basseng og oppdelt i alikvoter på egnet størrelse for hvert eksperiment. Slike hunner stammet fra fiskerier som var offisielt erklært fri for infeksjon eller sykdom.

De frosne sædprøvene ble brakt til fiskeriene for befruktning av eggene og evaluering av befruktningseffektivitet på stedet (etterkommerproduksjon). Alle sædprøvene som ble benyttet hadde en synlig bevegelse, målt som beskrevet i det tidligere eksemplet, på ikke mindre enn 10%.

Omtrent 2000 egg ble benyttet ved produksjonen av oppdrettsetterkommere og omtrent 150 ved befruktningstesten. Ved begge tilfellene ble eggene overført til et beger og fortynnet 1:2 med befruktningsløsningen som inneholder: 60 mM NaHCO_3 ; 20 mM glysin; 5 mM teofilin; 50 mM tris, pH 9.

De frosne sædprøvene ble opptint som beskrevet over og plassert sammen med eggene (1 "paljett" inneholdt 0,5 ml fortynnet sæd/150 egg) og blandet forsiktig. Etter 3 minutter med inkubasjon, ble ferskvann tilsatt (50 ml/150 egg) og eggene ble vasket og innkubert i en strømningsutklekningsanlegg ved en temperatur på 11°C. Utviklingen av embryoer ble oppnådd i ferskvann og befruktningssuksessprosenten ble vurdert etter 25 dager ved å måle prosenten av embryoene med øyet.

Prosenten av eggene som var befruktet etter fryse- opptiningsbehandlingen er vist i tabell 6, mens fiskeoppdrett (aquaoppdrettsbetingelser) data er gitt i tabell 7.

Tabell 6, evaluering av triokonserveringsprotokollen: befruktningsresultater.

Stamfar		Antall	Total befruktede egg (%)
Serie	Kode		
S	1	3	73,0
S	2	3	36,0
S	3	3	59,0
S	4	3	45,0
S	5	3	43,0
S	6	3	39,0
S	7	3	53,0
S	8	3	38,0
S	9	3	51,0
S	10	3	70,0
Gjennomsnitt			51,0

n = antall gjentakelser i det eksperimentelle forsøket.

5

Tabell 7 – Befruktningsresultater oppnådd ved akvaoppdrett

Stamfar	Befruktning	
	Forsøk 1	
Serie	Kode	Befruktede egg (%)
S	1	37,0
S	2	45,0
S	3	51,0
S	4	65,0
S	5	24,0
S	6	50,0
S	7	40,0
S	8	42,0
S	9	50,0
S	10	30,0
Total		44,0

Gjennomsnittene av befruktningseffektivitetene som er oppnådd ved akvaoppdrett, som er presentert i tabell 7, er lignende med de som ble oppnådd ved de individuelle laboratorieutførte testene, som er vist i tabell 6. Disse resultatene viser at også i tilfellet ved laks tilpasses den standardiserte protokollen, oppnådd ved anvendelsen av frossen sæd, godt til akvakultur under oppdrettsbetingelser uten noe tap av effektivitet.

P a t e n t k r a v

1.

Fremgangsmåte for kryokonservering av sæd fra Teleostei som tilhører familien

5 salmonider, som omfatter de følgende trinnene;

a) fremskaffelse av sæd fra utvalgte individer;

b) fortynning av sæden i et fortynningsmiddel ved et sæd/fortynningsmiddelvolum
forhold på mellom 1:3 og 1:5, der det nevnte fortynningsmidlet er en isotonisk løsning
som omfatter: NaCl, Hepes ved en konsentrasjon på mellom 10 mM og 35 mM, KCl
10 ved en konsentrasjon på mellom 20 mM og 60 mM, metanol ved en konsentrasjon på
mellom 6,5% - 13,5% (volum/volum), Bovine Serum Albumin (BSA) ved en
konsentrasjon på mellom 1%-2% (volum/volum), eggeplomme ved en konsentrasjon på
mellom 6% og 8% (vekt/volum), sukrose i en konsentrasjon på mellom 0,25% og
0,75%, og som har en pH-verdi på mellom 7,2 og 8,2 og en osmolaritet på mellom 250-
15 350 mOsm;

c) likevekt av den fortynnete sæden ved en temperatur på mellom 2°C og 6°C i en
tidsperiode på mindre enn 15 minutter, og oppdeling av den fortynnete sædløsningen i
0,5 ml "paljetter";

d) frysing ved avkjøling av aliquotene ved en hastighet på 30°C-40°C/minutt fra 4°C til -
20 110°C,
der avkjølingen utføres ved en programmerbar fryseenhet.

2.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, der salmonidene er valgt blant artene: *Oncorhynchus*

25 *mykiss*, *Salmo salar*, *Thymallus thymallus* og *Hucho hucho*.

3.

Fremgangsmåte ifølge krav 2, der artene er *Oncorhynchus mykiss*.

30 4.

Fremgangsmåte ifølge krav 2, der artene er *Salmo salar*.

5.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, der fortynningsmidlet videre omfatter CaCl₂ i en

35 konsentrasjon på mellom 0,5 mM og 1,5 mM og MgSO₄ i en konsentrasjon på mellom
0,5 mM og 1,2 mM.

6.

Fremgangsmåte ifølge krav 5, er fortynningsmidlet omfatter: 20 mM hepes, pH 7,8, 40 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 0,8 mM MgSO_4 , 10% metanol, 103 mM NaCl, 1,5% bovin serum albumin; 7% eggeplomme; 0,5% sukrose.

5

7.

Fremgangsmåte ifølge krav 1-6, som videre omfatter trinnet:

e) oppvarming av den frosne sæden ved en temperatur som er lavere enn 30°C i en periode på mindre enn 1 minutt.

10

8.

Fremgangsmåte ifølge krav 7, der temperaturen er 25°C og perioden er 30 sekunder.

9.

15 Fremgangsmåte for *in vitro* befruktning som omfatter kryokonserveringsfremgangsmåten ifølge et hvilke som helst av kravene 1-6.

10.

Fremgangsmåte for *in vitro* befruktning ifølge krav 9, som videre omfatter trinnene:

20 e) opptining av sæden ved inkubasjon i et vannbad ved en temperatur på mellom 20°C og 30°C i en periode på mindre enn 1 minutt;

f) fortynning av den opptinede sæden i et områdeforhold på mellom 1:1 og 1:5 (volum/volum) med en befruktningsbuffer;

g) tilsetning av den fortynnete sæden til Teleostein egg under forsiktig blanding;

25 h) inkubasjon av blandingen i en periode på mellom 2 minutter og 5 minutter og ved en temperatur på mellom +2°C og +6°C

i) fortynning av blandingen med ferskvann til 30-60 ml for 100-200 egg,

j) inkubasjon av den fortynnete blandingen ved en temperatur på mellom 4°C og 13°C i ikke mindre enn 20 dager.

30

11.

Fremgangsmåte ifølge krav 10, der befruktningsbufferen er en vandig isotonisk løsning som omfatter: Tris, ved en pH-verdi på mellom 8,5 og 9,5 ved en konsentrasjon på mellom 40 mM og 60 mM, NaHCO_3 , ved en konsentrasjon på mellom 50 mM og 70 mM, og som eventuelt omfatter: teofylin ved en konsentrasjon på mellom 3 mM og 7 mM og glysin i en konsentrasjon på mellom 15 mM og 25 mM.

35

12.

Fremgangsmåte ifølge krav 11, der befruktningsbufferen er en vandig løsning som omfatter: Tris 50 mM, pH 9, teofylin 5 mM, glysin 20 og NaHCO₃ 60 mM.

5 13.

Fremgangsmåte ifølge krav 12, som videre omfatter evaluering av den genetiske komponenten til positive og negative utvalgte egenskaper.

14.

10 Fremgangsmåte ifølge krav 13, der evalueringen utføres med statistisk analyse.

15.

Fremgangsmåte for konservering av den genetiske arv hos utvalgte dyr, k a r -
a k t e r i s e r t v e d at kryokonserveringsfremgangsmåten ifølge et
15 hvilke som helst av kravene 1-6 benyttes.

16.

Fremgangsmåte for å utforme foredlinger, k a r a k t e r i s e r t
v e d at kryokonserveringsfremgangsmåten ifølge et hvilke som helst av kravene 1-
20 6 benyttes.

17.

Fremgangsmåte for forbedring av oppdrettsarter i akvakultur, k a r a k -
t e r i s e r t v e d at kryokonserveringsfremgangsmåten ifølge et hvilket
25 som helst av kravene 1-6 benyttes.

18.

Fremgangsmåte til foredling av genetisk forbedrede arter, k a r a k -
t e r i s e r t v e d at kryokonserveringsfremgangsmåten ifølge et hvilke
30 som helst av kravene 1-6 benyttes.

19.

Fremgangsmåte for evaluering av den genetiske verdi av den individuelle fisken,
k a r a k t e r i s e r t v e d at kryokonserveringsfremgangsmåten
35 ifølge et hvilke som helst av kravene 1-6 benyttes.