

Conservering van sperma van de Nederlandse zeldzame kippenrassen

C.A. Zuidberg¹, H. Woelders¹, H. Sulkers¹, A. Boks² en S.J. Hiemstra¹

Inhaalslag 4



¹ Centrum voor genetische Bronnen Nederland (CGN) van Wageningen UR

² Stichting Zeldzame Huisdierrassen

© 2007 Wageningen, CGN/ Stichting DLO

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van CGN/ Stichting DLO.

Exemplaren van dit rapport kunnen bij de (eerste) auteur worden besteld.

CGN, Centre for Genetic Resources, the Netherlands

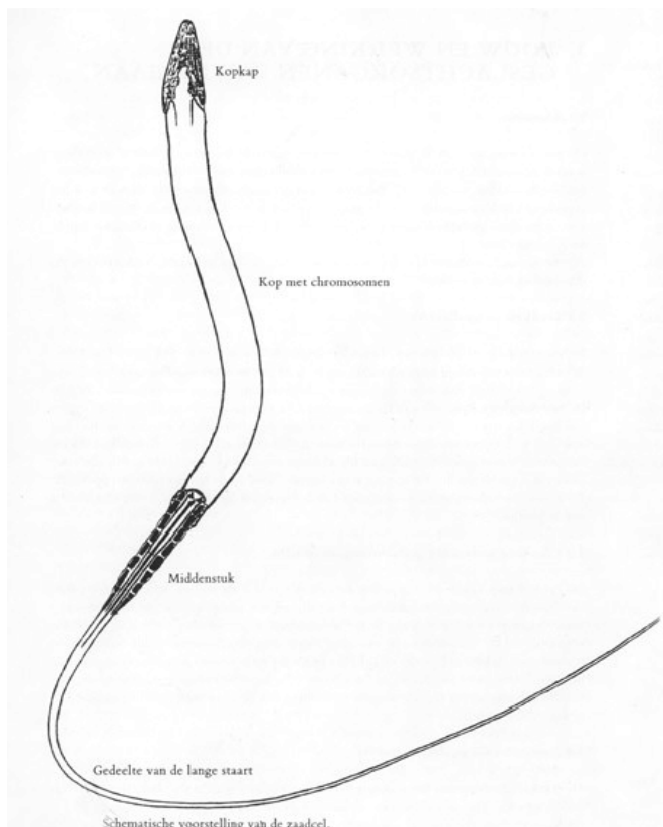
Adres : Edelhertweg 15, 8219 PK Lelystad
: Postbus 65, 8200 AB Lelystad
Tel. : +31 320 23 82 38
Fax : +31 320 23 80 50
E-mail : kees.zuidberg@wur.nl
Internet : www.cgn.wur.nl/AnGR

Woord vooraf

Dit project is uitgevoerd door het Centrum voor Genetische Bronnen Nederland (CGN van Wageningen UR) te Lelystad in nauwe samenwerking met een vertegenwoordiger van de Stichting Zeldzame Huisdierrassen, die als intermediair fungeerde naar fokkers / eigenaren van de hanen. Zonder de medewerking van de fokkers en leden van de rasverenigingen van de betreffende pluimveerassen en de bereidwilligheid om hun fokdieren af te staan had dit project niet kunnen slagen. Ook de betrokkenheid en inzet van de biotechnische medewerkers J.W. Deetman, A. Ter Laak, G. Visscher, Jan Truin en André Huiskes van de stofwisseling- en klimaataccommodatie van de Animal Sciences Group in Lelystad is van groot belang geweest voor het welslagen van het project.

Samenvatting

Na de eerste drie 'inhaalragen' in 2003, 2005 en 2007 is weer een project opgezet om te komen tot het verzamelen van genetisch materiaal van een aantal hanen van zeldzame kippenrassen (inhaalrag 4). Het doel van het project is om (de genetische variatie van) deze (kleine) rassen veilig te stellen in de genenbank. Met de financiële middelen van 2009 kon voor de vierde maal worden gestart met een aantal hanen van rassen, die in 2003, 2005 en 2007 niet voldoende aan bod waren gekomen. In een evaluatie met de Stichting Zeldzame Huisdierrassen en rekening houdend met de reeds aanwezige genenbank collecties zijn zestien rassen geselecteerd waarvan genetisch materiaal is gecryo-conserveerd, te weten het Hollandse Kriel (11), Eikenburger Kriel (5), Sabelpoot Krielen (10), Fries Hoen (2), Hollands Kuifhoen (6), Assendelfter Hoen (6), Drents Hoen (3), Groninger Meeuw (5), Noordhollands Hoen (6), Twents Hoen (3), Chaams Hoen (3), Welsumer (2), Lakenvelder (2), Nederlandse Uilenbaard (2), Barnevelder (4) en het Hollands Hoen (3). Van deze 16 rassen zijn totaal 73 hanen aangevoerd. Vier hanen zijn in de eerste dagen reeds gesneuveld. (zie 2.7 "Gezondheidscontrole hanen"). Van één Eikenburger Kriel haan kon geen sperma worden verkregen. Met de aanvulling van het sperma van de hanen van voornoemde rassen zou de doelstelling kunnen worden bereikt, om van elk ras ca. 800 doses sperma in opslag te hebben van minimaal 10 hanen. De Eikenburger Kriel haalde deze aantallen niet vanwege de te geringe spermaproductie (ruim 200 doses !). Van het Drents Hoen, de Assendelfter Hoen en de Schijndelaar benaderen de aantallen doses sperma de 800. In totaal zijn in deze vierde inhaalrag 5534doses sperma ingevroren en in de genenbank weggezet.



Spermacel van een haan

("Van Voorst en Leenstra")

Inhoudsopgave

Voorwoord

Samenvatting

1	Inleiding	1
2	Selectie en behandeling van de hanen	2
2.1	Selectie van rassen en hanen	2
2.2	Aanvoer van hanen	2
2.3	Huisvesting en verzorging	3
2.4	Registratie en identificatie	3
2.5	Demonstratie en publiciteit	3
2.6	Afvoer hanen.....	3
2.7	Gezondheidscontrole hanen	3
3	Spermawinning en spermaverwerking	5
3.1	Materialen en methoden.....	5
3.2	Training en spermawinning	5
3.3	Dagplanning spermawinning	6
3.4	Winning van sperma	7
3.5	Vorbereiding en aanlevering	7
3.6	Spermaverwerking	8
	3.6.1 Invriesprotocol.....	8
	3.6.2 Opslag en registratie.....	8
4	Resultaten	9
5	Discussie en conclusies	10
5.1	Conserveringsdoelstellingen	10
5.2	Rasverschillen	11
5.3	Opmerkingen	11
6	Bijlagen.....	15

1 Inleiding

Het Ministerie van LNV heeft per brief van 29 juli 2003 na de uitbraak van Aviaire Influenza (AI) de opdracht verstrekt aan het CGN om te komen tot het veilig stellen van de genetische variatie van diverse rassen pluimvee. CGN heeft voor de conservering van genetisch materiaal (sperma) van pluimvee in de genenbank in 2003 een start gemaakt met een zestal rassen.

Voor dit project was dat jaar een bedrag uitgetrokken voor een zestal rassen met elk 10 hanen.

Ook voor het jaar 2005 heeft het Ministerie van LNV een bedrag uitgetrokken om een tweede inhaalslag uit te voeren (toekenningsbrief TRCDWK/2004/3137 van 16 november 2004).

Voor het jaar 2007 waren er uit binnen de reguliere LNV programmafinanciering wederom gelden beschikbaar om van de "laatste" rassen (die niet eerder aan bod kwamen in inhaalslag één en twee) sperma van hanen te conserveren (inhaalslag nummer 3).

Voor 2009 is na de evaluatie van de afgelopen drie inhaalslagen met de Stichting Zeldzame Huisdierrassen, een lijst opgesteld met rassen waarvan nog aanvulling van sperma nodig is in de genenbank om de uiteindelijke doelstelling, de 800 doses diepvriessperma per ras, te realiseren.

In de maand februari 2009 heeft CGN concrete afspraken gemaakt over de planning en inhoud van het project met de Stichting Zeldzame Huisdierrassen en de proefdierfaciliteiten van de Animal Sciences Group in Lelystad, binnen de financiële kaders van inhaalslag 4. Met het nieuwe beschikbare budget kon in 2009 van ca. 70 hanen sperma worden gewonnen en geconserveerd.

De volgende stappen zijn ondernomen:

1. Aanvulling van de reeds aanwezige pluimveerassen en aantal hanen per ras voor opname in de genenbank (april 2008)
2. Aanvraag t.a.v. dierproeven. De DEC van ASG heeft geen bezwaar gemaakt tegen het houden van hanen voor spermaproductie (Zie bijlage 8, februari 2009)
3. Contractuele afspraken maken met eigenaar/fokker van hanen over huur of overname van hanen (maart-april 2009)
4. Trainen van hanen, spermawinning en conservering (april, mei, juni en juli 2009)

De na 2003 aangepast protocollen van de cryo-conservering van hanensperma, zoals gebruikt in 2005 en 2007, zijn wederom gebruikt voor het invriezen van hanensperma in 2009.

Half april zijn de geselecteerde hanen aangevoerd. Na een aantal dagen van acclimatisering van de dieren is het trainen in de tweede helft van april opgestart. Vanaf 27 april tot en met 15 juli zijn 21 dagen gebruikt om sperma van de hanen te winnen en te verwerken. Het gewonnen sperma werd elke dag verwerkt, ingevroren en opgeslagen in het opslagvat in Lelystad. Omdat de vaten voor Utrecht al vol waren, is besloten dit aanvullende sperma in één opslagvat te doen en in Lelystad te bewaren. Op de productiedagstaten zijn alle gegevens per dag weergegeven. Via een programma zijn de dagstaten "overgezet" in zogenaamde dierstaten en vervolgens digitaal opgeslagen in Cryo-IS. (Cryo Informatie Systeem) van CGN-AnGR.

2 Selectie en behandeling van de hanen

2.1 Selectie van rassen en hanen

De vertegenwoordigers van CGN en de Stichting Zeldzame Huisdierrassen zijn overeengekomen dat met cryoconservering van 10 hanen per ras de diversiteit binnen het ras in voldoende mate is vastgelegd. Met ca 80 doses sperma per haan, dus 800 per ras, zou het ras moeten kunnen worden teruggefokt. De 10 gekozen hanen per ras moeten de variatie binnen het ras vertegenwoordigen. Eventueel kunnen meer dan 10 hanen per ras worden gekozen bij veel kleurslagen binnen het ras en minder dieren bij uniformere kleuring. Na een evaluatie van eerste drie conserveringssessies in 2003, 2005 en in 2007 zijn de 16 rassen gekozen, waarvan nog niet voldoende sperma aanwezig was in de genenbank (zie bijlage 4; evaluatie spermavoorraad). De secretarissen van de speciaal clubs van de genoemde pluimveerassen zijn vervolgens door de vertegenwoordiger van SZH benaderd met de vraag om medewerking te verlenen bij de selectie van hanen/eigenaren met als doel zoveel mogelijk variatie binnen het ras aan te leveren.

2.2 Aanvoer van hanen

Het doel was de hanen door CGN te laten overnemen voor 25 Euro per haan. Echter ca. 40 % van de hanen is te leen aangeboden. We mogen concluderen dat we naast de gebruikshanen, die hun "werk" al gedaan hebben, ook met een groep hanen te maken hebben die nog voor de fokkerij beschikbaar zijn. Met de betreffende fokkers/eigenaren is een overeenkomst gesloten (bijlage 7) voor overname/leen van hanen voor spermawinning. Tabel 1 laat zien hoeveel hanen zijn aangekocht of te leen aangeboden. Per ras is er nogal wat verschil in de keuze die de fokkers hebben gemaakt, hun hanen verkopen of uit te lenen.

Tabel 1: Overzicht per ras van de keuze koop/leen.

Ras	Verkoop	Leen
Barnevelder	2	2
Drents Hoen	1	2
Twents Hoen	-	3
Ned. Uilenbaard	-	2
Welsumer	2	-
Hollandse Kriel	11	-
Lakenvelder	-	2
Fries Hoen	1	1
Noordhollands Hoen	4	2
Groninger Meeuw	2	3
Assendelfts Hoen	3	3
Hollands Hoen	-	3
Chaams Hoen	2	1
Hollands Kuifhoen	6	-
Sabelpoot Kriel	9	1
Eikenburger Kriel	3	2
TOTAAL	46	27

De vertegenwoordiger van de SZH heeft een totaalijst gemaakt met alle dieren, die beschikbaar zijn gesteld voor de spermaproductie. Aan de hand van deze lijst is in april de aanvoer van de hanen door CGN in overleg met de fokkers in drie dagen voltooid. Elke haan is afzonderlijk in daarvoor speciaal bestemde kooien vervoerd per vrachtauto. Op de laatste aankomstdag zijn alle dieren tegelijkertijd gecontroleerd op luis en tegen NCD geënt (sprayen).

2.3 Huisvesting en verzorging

Op de pluimveelocatie van de proefdierfaciliteiten van de Animal Sciences Group te Lelystad zijn alle hanen in een speciale afgescheiden ruimten ondergebracht. Deze stal is voorzien van een klimaatregeling. De temperatuur wordt constant op 20 graden Celsius gehouden met een luchtvochtigheid van ca. 55 %. Als daglengte worden 16 uren gehanteerd met 60 % licht.

De grote hanen zijn individueel gehuisvest in kooien met een afmeting van 100 x 40 x 60 cm. (L x B x H). De andere kleinere hanen zijn in stapelkooien geplaatst met een afmeting van 65 x 45 x 40 cm. (LxBxH). Deze kooien zijn voorzien van een frontopening, hetgeen een voordeel is bij het uithalen van de hanen. Tevens zijn in de kooien voor de kleinere hanen een speciale fijnmazige kunststof “mat” op de roosters gelegd om het verblijf en het lopen te vergemakkelijken.

De voeding bestaat uit legmeel. De hanen zijn handmatig gevoerd, waarbij met name de Noordhollandse Hoenders scherp op dieet zijn gezet (ca. 80 gr./dag). Een sterke vervetting van de hanen van dit ras is hierdoor voorkomen, hetgeen in 2007 is gebeurd. Een open automatisch drinkwatersysteem (drink-cupjes) is aangesloten op elke kooi.

2.4 Registratie en identificatie

Alle kooien, waarin de dieren zijn gehuisvest zijn voorzien van een sticker met de identificatie van het dier. De sticker vermeldt het ras, kleur(-slag) en ringnummer alsmede “koop” of “leen”. Tevens hangt aan iedere kooi een vel met plakstickers met voornoemde informatie. Deze stickers worden na de spermawinning op de buis geplakt. Ook is er een totaalijst gemaakt van alle dieren met bijbehorend kooinummers. Op de laatste dag vóór de afvoer zijn alle dieren afzonderlijk gefotografeerd. De foto's zijn onder vermelding van ras, kleur(-slag) en diernummer digitaal opgeslagen. Op deze wijze zijn alle dieren geregistreerd en geïdentificeerd.

2.5 Demonstratie en publiciteit

De dag na het fotograferen aan het einde van de periode van spermawinning is een demonstratie georganiseerd voor de eigenaren van de hanen. Alle leveranciers hebben een uitnodiging ontvangen om deze demonstratie en excursie bij te wonen. Ca. 40 personen hebben hieraan gehoor gegeven.

Gedemonstreerd werd het “melken” van enkele hanen. Door de microscoop kon men het sperma bekijken en beoordelen. Tevens werd van andere diersoorten sperma getoond.

Verder werd, onder het genot van een kop koffie, een uiteenzetting gegeven over de genenbank (CGN AnGR) en werd de aanwezigen duidelijk gemaakt het waarom van de cryoconservering van sperma van hun hanen. Een videofilm van het sperma vangen, verwerken, invriezen en opslaan werd continu op een scherm vertoond middels een labtop. De aanwezigen konden zich tegoed doen aan diverse belegde broodjes alvorens ze de eigen haan (hanen) weer mee naar huis konden nemen.

2.6 Afvoer hanen

De afvoer van de hanen werd direct na de demonstratie in gang gezet. Alle aanwezigen namen hun eigen haan (hanen) mee. Twee dagen later werden de resterende hanen naar de eigenaren teruggebracht. Voor de gekochte dieren is in alle gevallen een nieuw adres gevonden in de vorm van nieuwe eigenaren tot kinderboerderijen.

2.7 Gezondheidscontrole hanen

Alleen klinisch gezonde hanen werden door de eigenaren aangeboden voor transport naar Lelystad (zie bijlage 6, punt 3). Bij aankomst zagen de meeste dieren er gezond uit met een goed verenkleed. Van een haan zijn de lange sporen verwijderd terwijl een andere is behandeld tegen kalkpoten. Eén haan is speciaal behandeld tegen luis!

Op de laatste dag van aanvoer kregen alle dieren een ingangscntrole. In geval van twijfel kon een dierenarts worden gewaarschuwd. Er waren geen afwijkingen bij de dieren geconstateerd behalve de drie hiervoor genoemde gevallen. Een bewijs van enting van de dieren tegen NCD en/of Pseudo vogelpest is niet als eis gesteld. Wel zijn alle dieren op de laatste dag van aanvoer tegelijk geënt d.m.v. sprayen en behandeld tegen bloedluis.

Vier hanen zijn binnen 10 dagen na aankomst overleden. Dit in tegenstelling tot de jaren 2003 (0) en 2005 (1) en 2007 (4 + 2). Na één dag ging er een Fries Hoen verloren, gevolgd door achtereenvolgens een Drents Hoen, een Hollands Kuifhoen en een Barnevelder (reeds een verdikte oorlel rechts!).

Over het algemeen kan worden gesteld dat de dieren door de verplaatsing van de ene locatie naar de andere nogal gestrest kunnen zijn. Hierdoor komt het voor dat zij niet of te weinig drinken, met uitdrogingsverschijnselen tot gevolg. Ook kan in een dergelijke situatie een milde aanwezige infectie van mycoplasma de kop op steken.

Sectie op een haan gaf een cardiaal falen als doodsoorzaak aan. (zie bijlage 5 van pathologie)

De hanen van het ras Noord Hollandse Hoen bleven door gerantsoeneerde voeding in goede gezondheid. Zij vertoonden geen vervetting hetgeen de spermaproductie ten goede kwam. De hanen van de andere rassen hadden weinig problemen. Zij zijn in goede conditie gebleven gedurende de periode van spermawinning.

Op de laatste dag voor afvoer is van elk dier een bloedmonster genomen voor eventuele latere onderzoeken op tot nu toe nog niet bekende mogelijke dierziekten. Het bloed is opgevangen in de spuit en voor een deel overgebracht in een EDTA buis. Het resterende bloed dient als serummonster. Op het laboratorium is het bloed gecentrifugeerd. De bovenstaande vloeistof (serum en plasma) is in twee gelijke delen in cupjes verdeeld, elk ca. 600 microliter, voorzien van een sticker en ingevroren.

3 Spermawinning en spermaverwerking

3.1 Materialen en methoden

Bij de winning van sperma van hanen, het zogenaamde hanen melken, worden speciale spermabuisjes gebruikt voor het opvangen van het sperma. Deze gesteriliseerde glazen buisjes zijn voorzien van een wijde bovenrand en hebben een inhoud van ca. 15 ml. Tevens zijn nu ook buisjes van 5 ml. gebruikt. Kleine hoeveelheden sperma aan de wand van de buis kunnen door dit kleine formaat makkelijker naar de punt van de buis worden “gespoeld” met verdunner.

Een klimaatkast is in het voorportaal van de stal geplaatst om de buizen op temperatuur te houden voor gebruik. Iedere kooi is voorzien van een vel met plakstickers met de diergegevens. Deze sticker wordt direct na het opvangen van het sperma als identificatie op het buisje geplakt. Het gevangen sperma wordt door de spermavanger aan de laboratoriummedewerker overhandigd. Deze verdunt het sperma ongeveer 1:1 met een speciaal verdunningsmedium voor hanensperma. Na weging wordt het buisje met verdund sperma in een portable koelbox geplaatst. Hierin wordt het verdunde sperma gekoeld tot 5 °C. De weeggegevens van de buisjes met sperma en hun leeg gewicht wordt ingevoerd in de computer bij de betreffende haan.

3.2 Training en spermawinning

Alvorens met de spermaproductie te starten worden de hanen getraind voor spermawinning. De meeste hanen vertonen weinig schrikachtige reacties, wanneer de stal wordt betreden en met de training wordt begonnen. De dieren zijn snel gewend. Van de meeste hanen kan al vrij snel sperma worden gewonnen. Na een drietal trainingdagen kan met de eigenlijke spermaproductie worden begonnen. Per week zijn drie dagen gepland om sperma te winnen, te weten op de maandagen, woensdagen en de vrijdagen. In de weken van Hemelvaart en Pinksteren is er ook drie dagen sperma gewonnen, maar nu zonder een “rustdag” er tussen.

Bij de spermawinning is gebruikelijk dat de haan tussen de arm en het lichaam wordt vastgehouden. Een tweede persoon, de “melker”, vangt het sperma op. De haan wordt door deze persoon tot ejaculatie gebracht door enkele malen met de hand over de rug van de haan richting staart te wrijven. Op dat moment is het aan de reactie van de staartveren te zien of de haan seksueel actief wordt en tot sperma afgifte komt. Nu is het moment gekomen om met het (warme) buisje het sperma uit de cloaca-achtige penis op te vangen. Hierbij wordt met de andere hand een licht knijpende beweging gemaakt met twee á drie vingers rond de cloaca. Door de druk op de cloaca komt de haan tot ejaculeren. Het sperma wordt opgevangen in het spermabuisje dat direct na spermavangen wordt voorzien van de sticker met een identificatienummer van de haan.



Het efficiëntiegetal van het aantal pogingen tot het verkrijgen van sperma en de werkelijke aantallen verkregen spermamonsters was 88% (zie tabel 2). Dat betekent dat van de 69 dekhanen dagelijks ruim 60 ejaculaten zijn gevangen. Gemiddeld lieten 9 hanen het dagelijks afweten.

De gestorven hanen (4) zijn hierbij niet meegerekend. Van de twee Lakenvelders is er een met cloacaprobleem. De Eikenburger Krielen hebben de meeste moeite met de spermaleverantie. In het algemeen is het een goede en productieve sessie in 2009 geweest.

Tabel 2 Het percentage effectieve gevangen ejaculaten van de totale pogingen.
(* = haan zonder productie, maar wel meeberekend in de gemiddelden)

Ras	Aantal productie hanen	Totaal aantal dek-pogingen	Aantal geleverde ejaculaten	% geleverd geleverde ejaculaten
Barnevelder	3	63	60	95
Drents Hoen	2	42	39	93
Twents Hoen	3	63	59	94
Ned. Uilenbaard	2	42	38	90
Welsumer	2	42	42	100
Hollandse Kriel	11	231	219	95
Lakenvelder	2	42	25	60
Fries Hoen	1	21	18	86
Noordhollands Hoen	6	126	119	94
Groninger Meeuw	5	105	99	94
Assendelfts Hoen	6	126	120	95
Hollands Hoen	3	63	58	92
Chaams Hoen	3	63	60	95
Hollands Kuifhoen	5	105	81	77
Sabelpoot Kriel	10	210	167	80
Eikenburger Kriel	4 + 1*	105	75	71
Totaal / (2007)	68 + 1*	1479	1279	88 (66)

3.3 Dagplanning spermawinning

Bij het plannen van de spermawinning is uitgegaan van de gemiddelde spermaproductie per haan (4 rietjes per ejaculaat) en de mogelijke winfrequentie per week met de doelstelling van het project, ca. 80 doses sperma per dier te produceren. Bij deze vierde inhaalslag zijn 21 dekdagen gepland. Uiteraard is het efficiëntiegetal van het aantal winpogingen van belang om de doelstelling te halen. Dit jaar zien we een hoog efficiëntiegetal op de spermawinningsdagen, namelijk 88 % (zie tabel 2). Dit in tegenstelling tot 2007 (66 %) en 2005(83 %). (zie ook tabel 3.) Ook zijn er deze inhaalslag weinig hanen waarvan geen of bijna geen sperma kon worden gewonnen, slechts 1 (2007: 6). Ook de krielen deden het dit jaar erg goed, al is de hoeveelheid sperma vaak zeer gering.

Door op tijd (tussen 8.00 en 8.15 uur) met de spermawinning in de stal te beginnen konden de werkzaamheden op het laboratorium zonder te veel tijdsdruk worden uitgevoerd. Ondanks het hoge efficiëntiegetal van de spermawinningen (aantal ejaculaten per dag) konden de spermarietjes dagelijks op tijd worden ingevroren.

Gestart werd 's morgens met de krielen, omdat deze wat meer aandacht vragen voor de spermawinning. Van de grote "jongens" werd makkelijker sperma verkregen. Om alle negenenzestig dieren te melken is ongeveer 1,5 uur nodig met twee personen.



3.4 Wining van sperma

Van de 73 aangevoerde hanen zijn er vóór de spermaproductie vier verloren gegaan. Van de 69 overgebleven hanen heeft één haan (Eikenburger Kriel) geen sperma geproduceerd, terwijl van twee hanen slechts twee keer sperma kon worden gewonnen. Op de spermawinningsdagen hebben gemiddeld 61 van de 69 hanen sperma geleverd voor conservering. (= 88 %). In de andere gevallen kon er geen (goed) sperma worden gewonnen. Bij de meeste hanen kwam geen materiaal vrij uit de cloaca (droog!) of werd slechts wat vochtig materiaal opgevangen.



Redenen dat het gewonnen materiaal is afgekeurd zijn:

- inactiviteit van de haan (droog!)
- onvoldoende waterige hoeveelheid
- vervuiling met mest (enkel geval)

Aan de hand van de ervaringen van de voorgaande jaren is besloten geen tweede poging voor spermawinning bij de hanen, die niet ejaculeren, te doen op dezelfde dag. In slechts een enkel geval kon bij de inhaalslag in 2007 alsnog wat sperma worden verkregen. Hiermee is na een paar keer gestopt.

3.5 Voorbereiding en aanlevering

Naast de twee melkers zijn ook twee laboratoriummedewerkers aanwezig in de stal op het moment van spermavangen. Deze nemen de geïdentificeerde buisjes met sperma in ontvangst. De buisjes zijn door de spermavanger in de stal voorzien van een etiket. Het op de maatstreepjes van de buis afgelezen volume sperma wordt direct verdubbeld door toevoeging van eenzelfde volume invriesmedium. Deze verdunningsvloeistof wordt toegevoegd op ca. 30 °C.

In veel gevallen is het sperma verder doorverdund dan 1:1 omdat het onverdunde sperma aan de wand van de buis vaak moeilijk naar beneden in de punt van de buis wil vloeien.

De buis met ca.1:1 verdunde sperma wordt voorzichtig gemengd (vortex) en voorzien van een kurk. Na weging op een bovenweger wordt de buis met verdund sperma in een portable thermostaat koelbox van 5° C geplaatst. Met behulp van een speciaal computer programma (Excel) worden de gegevens van de haan, het

volgewicht van het buisje en het leeg gewicht (reeds op de buis vermeld!) geregistreerd op de zogenaamde dagstaat.

Na de spermawinning wordt de koelbox met de spermamonsters naar het laboratorium gebracht. De koelbox wordt onderweg aangesloten op de accu van de auto om zoveel mogelijk de koeling van de monsters in stand te houden. Tevens wordt de labtop meegenomen. Op het laboratorium worden de monsters direct in de koelwerkbank van 5° C. geplaatst voor verdere bewerking. Voor een optimale overleving van de spermacellen na diepvriezen moeten alle handelingen op dezelfde dag worden uitgevoerd.

3.6 Spermaverwerking

3.6.1 Invriesprotocol

Tijdens de vierde inhaalslag in 2009 is hetzelfde (verbeterde) invriesprotocol gebruikt als in 2005. In het kwaliteitshandboek van CGN (ISO 2001) is dit protocol "Invriezen van hanensperma" opgenomen (zie bijlage 9). Volgens dit protocol heeft de conservering van het hanensperma in 2009 plaatsgevonden.

3.6.2 Opslag en registratie

De conservering en opslag van het hanensperma gebeurt met behulp van de rietjesmethode.

De opslag van de rietjes vindt plaats in de vloeibare stikstof (-196 ° C.) Alle rietjes sperma zijn geïdentificeerd met geprinte tekst, te weten ras, kleur, NL-nummer, dier(-ring) nummer en productiedatum. Bekend is hoeveel zaadcellen per rietje aanwezig zijn. Per dier zijn van elke productiedatum de aantallen doses sperma en de plaats in de opslagvaten geregistreerd, alsmede de aantallen zaadcellen per rietje. Voor elk ras is gekozen voor een unieke kleur van het rietje. Voor de identificatie van doses sperma in de opslagvaten is een numeriek systeem gehanteerd, te weten een vat-, beugel- en beker nummer.

In tegenstelling tot de vorige conservering van het hanensperma in 2003, 2005 en 2007 zijn de rietjes in 2009 opgeslagen in de één vat, namelijk het "Lelystad" vat. Het zou voor deze vierde en waarschijnlijk laatste inhaalslag te kostbaar worden om twee halve vaten met hanensperma in de opslagruimte te hebben. De spermaproductie van 2009 betreft hanen, waarvan in Utrecht en Lelystad reeds de helft van de voorgaande jaren is opgeslagen. Daarom is besloten om slechts één vat beschikbaar te hebben voor alle hanen uit 2009. Hiermee komt het risico niet te veel in het geding.

4 Resultaten

De conserveringsresultaten staan vermeld in onderstaande tabel.

Een aantal statistieken geeft de kenmerken van het aantal doses/rietjes per ras, haan en ejaculaat.

Tabel 3: Gemiddelde spermaproductie en resultaten van het invriezen van hanensperma.

Ras	Aantal productieve dieren	Aantal ejaculaten	Aantal doses per ras	Gem.aantal doses per haan	Aantal doses per ejaculaat
Barnevelder	3	60	535	178	8.9
Drents Hoen	2	39	124	62	3.2
Twents Hoen	3	59	288	96	4.9
Ned. Uilenbaard	2	38	171	85	4.5
Welsumer	2	42	173	86	4.0
Hollandse Kriel	11	219	462	42	2.1
Lakenvelder	2	25	150	75	6.0
Fries Hoen	1	18	32	32	1.8
Noordhollands Hoen	6	119	962	160	8.1
Groninger Meeuw	5	99	493	99	5.0
Assendelfts Hoen	6	120	425	71	3.5
Hollands Hoen	3	58	254	85	4.4
Chaams Hoen	3	60	468	156	7.8
Hollands Kuifhoen	5	81	527	105	6.5
Sabelpoot Kriel	10	167	320	32	1.9
Eikenburger Kriel	4	75	150	30	2.0
Totaal	68	1279	5534	81	4.3

Het aantal doses per ras heeft uiteraard te maken met de aanvulling van de aantallen doses, die nodig zijn voor de genenbank. Het aantal hanen is hierop ook zoveel mogelijk op afgestemd. Duidelijk zijn wel de rasverschillen voor wat betreft het aantal rietjes per ejaculaat en dus ook het totaal per haan. De krielen komen er met rond de twee rietjes erg mager van af, terwijl de Barnevelders, de Noordhollandse Hoenders en de Chaamse Hoenders tot de meest productieve dieren behoren.

Het protocol "Invriezen van hanensperma" geeft de werkprocedure weer op welke wijze het sperma is behandeld en ingevroren. (Zie bijlage 9). Hierbij mag worden verwacht dat het sperma na diepvriezen, gemiddeld een bepaalde kwaliteit heeft. Daarom is de kwaliteit van het hanensperma na vriezen en ontdooien niet per batch nagekeken. Omdat de hoeveelheden rietjes per batch soms zo klein zijn, zou een kwaliteitscontrole er toe leiden, dat het aantal rietjes voor sommige batches op nul eindigt.

5 Discussie en conclusies

5.1 Conserveringsdoelstellingen

In 2009 zijn in tegenstelling tot de andere drie jaren, van vele rassen hanen aangevoerd. De dieren van deze rassen moesten dienen voor de aanvulling op de tekorten van spermarietjes van de betreffende rassen. Van de 16 rassen zijn 73 hanen aangevoerd. Uiteindelijk hebben 68 hanen sperma geleverd voor de genenbank (zie 2.1 "Selectie van rassen en hanen").

Van deze 16 zeldzame pluimveerassen zijn 5534 doses/rietjes sperma opgeslagen in de genenbank. Samen met de eerste conserveringsronden betekent het, dat van 20 zeldzame pluimveerassen ruim 16.600 doses zijn opgeslagen. In geval van calamiteiten zijn deze twintig rassen genetisch redelijk zeker gesteld.

Na de actie van 2003 zijn de beoogde aantallen doses van 500 per ras bijgesteld. Om na calamiteiten een ras terug te kunnen fokken worden 800 doses sperma per ras nodig geacht.

De aantallen doses diepvries sperma, die nu na vier inhaalslagen in de genenbank zijn opgeslagen worden in tabel 4 weergegeven met de aantallen hanen per ras. Duidelijk is het "vruchtbare" jaren 2005 en 2009 te zien, waarbij de meeste doses sperma zijn geproduceerd (resp. 4800 en 5534).

Tabel 4 Totale spermaproductie van de 20 kippenrassen over de vier jaargangen.

Ras	Aantal hanen	2003 doses	2005 doses	2007 doses	2009 doses	Aantal doses
Barnevelder	13	499			535	1034
Drents Hoen	12	454			124	578
Twents Hoen	13	614			288	902
Ned. Uilenbaard	12	687			171	858
Welsumer	12	647			173	820
Hollandse Kriel	30	68	273		462	803
Lakenvelder	9		740		150	890
Brabanter	13		1211		–	1211
Fries Hoen	13		722		32	754
Kraaikop	10		992		–	992
Ned. Baardkuifhoen	11		862		–	862
Noordhollands Hoen	14			527	962	1489
Groninger Meeuw	10			372	493	865
Assendelfter Hoen	11			226	425	651
Schijndelaar	5			500	–	500
Hollands Hoen	12			596	254	850
Chaams Hoen	10			536	468	1004
Hollands Kuifhoen	10			307	527	834
Sabelpoot Kriel	19			244	320	564
Eikenburger Kriel	7			56	150	206
Totaal doses	246	2969	4800	3364	5534	16667

5.2 Rasverschillen

Van een aantal rassen zijn nog geen 800 doses sperma geproduceerd. Met name van de Eikenburger Kriel is het beoogde aantal van 800 doses nog lang niet bereikt (zie tabel 4). Ook Het Drents Hoen, De Assendelfts Hoen, De Schijndelaar en de Sabelpoot Krielen behoeven nog enige aandacht. Een en ander heeft ook te maken met de capaciteit van de stallen en het aantal beschikbare en aangevoerde dieren per ras.

Net als de voorgaande jaren zijn de krielen niet de sterkste spermaproducenten. Daarentegen is de genenbank rijkelijk gevuld met diepvriessperma van hanen van de Barnevelders, de Brabanters, het Noordhollands Hoen en het Chaams Hoen. Van deze rassen werden respectievelijk 8,9-7,1-8,1 en 7,8 rietjes per ejaculaat gewonnen, hetgeen ruim boven de andere rassen zit. Misschien zijn er van deze rassen wat teveel dieren binnengehaald. Bij de evaluatie in 2008 is een schatting gemaakt van de benodigde hanen van elk ras om de doelstelling te halen.

Ten opzichte van de voorgaande jaren hebben de krielen over het algemeen meer bruikbare ejaculaten geleverd. Gezien het efficiëntiegetal in tabel 2 zijn er relatief weinig “miswinnings” geweest. Wel zijn de aantallen rietjes per ejaculaat erg laag.

5.3 Opmerkingen

- Dit jaar zijn ten opzichte van de vorige jaren relatief meer hanen te koop aangeboden dan te leen.
- Tijdens het ophalen van de hanen werd bij overname contant met de eigenaren 25 Euro per haan afgerekend.
- Op het moment van binnenkomst van de hanen in de stal zijn de dieren gecontroleerd op en voorbehoedend behandeld tegen luis. Een entbewijs werd niet vereist. Wel zijn de dieren geënt tegen NCD en IB met dode entstof en tegen pokkendifterie met levende entstof.
- Op een van de laatste dagen voor afvoer zijn de dieren:
 - Bloed getapt in een EDTA buisje (DNA onderzoek) en voor serum. Na centrifugeren is het plasma over twee buisjes verdeeld en ingevroren.
 - Individueel gefotografeerd.
- Voor kleine dieren, met name krielen, zijn in de kooien fijnmazige kunststof matten gelegd om het verblijf en met name het lopen te veraangename.
- De grote hanen zijn in grondkooien opgehokt. De kleinere in stapelkooien met een frontopening. Dit heeft als voordeel dat de hanen de persoon ziet aankomen alvorens ze worden gepakt; dit geeft minder stres.
- Er zijn net als in 2007 vier hanen verloren gegaan; reeds binnen 10 dagen. In alle gevallen is de eigenaar op de hoogte gesteld. De reacties waren niet negatief!
- De Noord Hollandse hoenders kregen een gerantsoeneerde hoeveelheid legmail (80 gr./dier/dag). De situatie van vervetting zoals in 2007 werd daardoor voorkomen. De spermaproductie en de libido bleef mede daardoor op een goed niveau.
- Er is ruim te voren contact geweest met mensen van de stallen over het gebruik van de stalruimten en de benodigde menskrachten. De samenwerking, communicatie en de flexibiliteit van alle mensen is als zeer plezierig ervaren.
- Het spermawinningsprogramma zat strak in elkaar. Elke morgen werd het tijdstip van aanvang van de spermawinning (8.00 – 8.15 uur) strak gehanteerd.
- De verwerking van ruim 60 ejaculaten per dag (1279:21 dagen), zie tabel 3, konden goed uitgevoerd worden, mede door op tijd in de ochtend te beginnen met spermavangen. Voor de spermaverwerking was er de meeste dagen een aantal uren per dag een derde persoon beschikbaar. Het sperma kon daardoor gemakkelijk binnen de dag worden verwerkt.
- Alle procedures liepen naar wens. De ergonomische houding bij een aantal werkzaamheden geeft op het eind van de dag bij sommige medewerkers problemen. Vooral het langdurig staan in een bepaalde houding, zoals aan de koelbank, verdient aandacht.
- Het gewenste aantal zaadcellen per rietje (250 miljoen) werd in zeer veel gevallen niet gehaald. Om het gevangen sperma van de zijkant van de buis naar de punt te spoelen, was meer verdunner nodig dan gewenst. Hierdoor was de concentratie zaadcellen per ml. al lager dan de gewenste 1000 miljoen/ml. Met de kortere buisjes voor de kleinere volumina zou men een verbetering verwachten.

Echter deze kortere buisjes werden voor het merendeel gebruikt bij de krielen en niet beide de grote spermaproductanten.

- De wens om 250 miljoen spermacellen in een doses/rietje te stoppen is slechts een aanname. Er is geenszins iets bekend over de aantallen zaadcellen, die nodig zijn om een goed percentage bevruchte eieren van de hen te krijgen. Ook is het niet echt duidelijk hoe vaak een hen moet worden geïnsemineerd.
- Momenteel zijn vijftien van twintig zeldzame kippenrassen de genen zeker gesteld. Van vier rassen zijn de 800 niet helemaal gehaald, terwijl van de Eikenburger Krielen slechts ruim 200 doses sperma konden worden opgeslagen.
- Op de demodag, waaraan ca. 40 personen gehoor aan hebben gegeven, zijn veel leenhanen weer door de aanwezige eigenaar teruggenomen. Een aantal dieren waren tijdens de sperma winningsperiode gewijzigd van “leen” naar “koop”. Voor alle koophanen is een plek bij een of andere eigenaar of kinderboerderij gevonden.
- De afvoer van de hanen is zeer goed verlopen. Duidelijkheid in de stallen omtrent “koop” en “leen” hanen was essentieel, in tegenstelling van 2007, waarbij vele hanen waren verplaatst.
- Zoals bij voorgaande inhaalslag zijn dit jaar de spermaproductiegegevens niet direct na de spermaverwerking in Cryo-IS ingebracht. De tijd ontbrak om dit te realiseren mede omdat de derde persoon slechts voor een aantal uren per dag beschikbaar was.



Rassen van bovenstaande hanen	Rassen van bovenstaande hanen
5275 Hollandse Kriel	4861 Eikenburger Kriel
6322 Fries Hoen	0832 Hollands Kuifhoen
19549 Assendelfter Hoen	9293 Drents Hoen
7590 Groninger Meeuw	267 Noord Hollands Hoen



Rassen van bovenstaande hanen	Rassen van bovenstaande hanen
3590 Twents Hoen	3369 Chaams Hoen
072 Welsumer	320 Lakenverder
17262 Uilenbaard	0752 Barnevelder
4398 Hollands Hoen	2495 Sabelpoot Kriel

6 Bijlagen

1. *Protocol invriezen van hanensperma (verkort)*
2. Overzicht spermaproductie per haan en ras

Bijlage 1

Verkorte versie van het invriesprotocol voor hanensperma

1. Doel

Het doel van het invriesprotocol is de cryoconservering van hanensperma voor de genenbank van CGN/AnGR.

2. Toelichting

Op een speciale wijze is het mogelijk spermacellen van hanen te bewerken ten behoeve van het invriezen en het bewaren in de vloeibare stikstof.

3. Benodigheden

Voor de conservering is een complete invriesaccomodatie voor genetisch materiaal nodig voorzien van een koelwerktafel, rietjesprintmachine, rietjesvulmachine, vriesapparatuur en opslagcontainers met vloeibare stikstoftank

4. Werkwijze

Van het in de stal 1:1 verdunde sperma worden de gegevens van het gewicht van de spermabuisjes met en zonder sperma ingevoerd. Het buisje met sperma wordt in een koelbox gekoeld tot 5 °C, en naar het laboratorium vervoerd. De labtop met de gegevens worden meegenomen naar het laboratorium.

Tevens worden de meetwaarden van een bepaling van de lichtverstrooiing van een spermamonster in een colorimeter ingevoerd. Aan de hand hiervan berekent het programma de concentratie zaadcellen per ml en het benodigde aantal rietjes.

Met een rietjesprinter worden de rietjes voorzien van de benodigde identificatie.

Het sperma wordt hierna in twee stappen verder doorverdund, deels zonder en deels met DMA als cryoprotectans. Na het vullen van de rietjes worden deze ingevroren en opgeslagen in stikstofcontainers onder vermelding van hoeveelheid en opslagplaats in het Excel bestand.

Hierna worden de gegevens digitaal opgeslagen in Cryo-IS.

5. Referenties

Voor uitvoerige protocol wordt verwezen naar het ISO protocol "PRT-CGN-AN-7238", "Spermaproductie hanen"

Bijlage 2

Spermaproductie 2009

Ras	Diernummer	Kleurslag	rietjes	Totaal
Hollandse Kriel	H10 08 05173	Roodschouderwit	33	
Hollandse Kriel	H10 08 05241	Roodschouderwit	43	
Hollandse Kriel	H10 08 05164	Roodschouderwit	49	
Hollandse Kriel	H10 08 05275	Geelpatrijs	35	
Hollandse Kriel	H10 08 05270	Geelpatrijs	33	
Hollandse Kriel	H10 08 05272	Geelpatrijs	50	
Hollandse Kriel	H10 08 06249	Blauwpatrijs	30	
Hollandse Kriel	H10 08 05179	Patrijs	48	
Hollandse Kriel	H10 08 05345	Patrijs	49	
Hollandse Kriel	H10 08 05341	Patrijs	52	
Hollandse Kriel	H10 08 05155	Patrijs	40	462
Eikenburger Kriel	H12 08 04860	Wit	33	
Eikenburger Kriel	H12 08 04861	Wit	33	
Eikenburger Kriel	H12 08 00765	Zwart	33	
Eikenburger Kriel	H13 08 04643	Zwart	51	
Eikenburger Kriel	H12 07 01234	Zwart	0	150
Sabelpoot Kriel	H15 07 10282	Porselein	4	
Sabelpoot Kriel	H16 08 00786	Porselein	38	
Sabelpoot Kriel	H16 07 02493	Porselein	33	
Sabelpoot Kriel	H15 05 10656	Citroen Porselein	15	
Sabelpoot Kriel	H15 08 12157	Isalbel Porselein	47	
Sabelpoot Kriel	H16 08 00767	Blauw Porselein	44	
Sabelpoot Kriel	H16 07 02495	Porselein	43	
Sabelpoot Kriel	H15 04 06662	Porselein	35	
Sabelpoot Kriel	H15 08 01807	Isalbel Porselein	32	
Sabelpoot Kriel	H15 08 01790	Isalbel Porselein	29	320
Fries Hoen	H15 03 06322	Wit	32	
Fries Hoen		Zwart	0	32
Hollandse Kuifhoen	H16 08 00826	Koekoek	0	
Hollandse Kuifhoen	H16 08 00827	Zwartbont	46	
Hollandse Kuifhoen	H16 08 00803	Zwart	15	
Hollandse Kuifhoen	H16 08 00808	Blauwgezoomd	60	
Hollandse Kuifhoen	H16 08 00832	Koekoek	240	
Hollandse Kuifhoen	H16 08 00815	Wit	166	527
Assendelfter Hoen	H15 08 21881	Goudpel	57	
Assendelfter Hoen	H15 08 19559	Zilverpel	48	
Assendelfter Hoen	H15 08 19549	Goudpel	66	
Assendelfter Hoen	H15 08 20823	Goudpel	83	
Assendelfter Hoen	H15 08 08129	Goudpel	94	
Assendelfter Hoen	H15 08 08131	Goudpel	77	425
Drents Hoen	H15 08 09293	Roodschouderwit	45	
Drents Hoen	H15 07 10921	Zilverpatrijs	0	
Drents Hoen	H15 08 18989	Goudpatrijs	79	124
Groninger Meeuw	H16 08 10315	Goudpel	80	
Groninger Meeuw	H16 07 07590	Goudpel	67	
Groninger Meeuw	H16 08 04243	Zilverpel	114	
Groninger Meeuw	H16 08 04240	Zilverpel	91	
Groninger Meeuw	H16 08 04234	Zilverpel	141	493
Noorhollands Hoen	H22 07 02344		109	
Noorhollands Hoen	H24 08 00267		108	
Noorhollands Hoen	H22 08 06649		213	
Noorhollands Hoen	H24 08 00267		242	
Noorhollands Hoen	H22 08 05943		167	
Noorhollands Hoen	H24 08 00285		123	962

Twents Hoen	H22 07 03590	Geelpatrijs	57	
Twents Hoen	H20 07 00704	Geelpatrijs	85	
Twents Hoen	H20 08 03411	Blauwpatrijs	146	288
Chaams Hoen	H20 08 03369	Zilver Zwart Gerand	108	
Chaams Hoen	H20 08 03381	Goud Zwart Gerand	171	
Chaams Hoen	H20 08 02063	Zilver Zwart Gerand	189	468
Welsumer	H20 08 00072		83	
Welsumer	H20 08 00484		90	173
Lakenvelder Hoen	H18 08 05460		14	
Lakenvelder Hoen	H18 06 00320		136	150
Nederlandse Uilenbaard	H18 0817262	Blauw Gezoomd	97	
Nederlandse Uilenbaard	H18 08 17264	Zwart	74	171
Barnevelder	H20 08 04839	Dubbel Gezoomd	134	
Barnevelder	H20 08 00369	Dubbel Gezoomd Blauw Dubbel	0	
Barnevelder	H20 08 00733	Gezoomd	230	
Barnevelder	H20 08 00752	Dubbel Gezoomd	171	535
Hollands Hoen	H16 07 08511	Zilver Zwart Geloverd	77	
Hollands Hoen	H16 08 04398	Goud Zwart Geloverd	90	
Hollands Hoen	H16 06 06017	Zwart	87	254
Totaal			5534	