



Cryo conservering van sperma van zeldzame Nederlandse eendenrassen

C.A. Zuidberg, A. de Wit, A.H. Hoving, H.W. Woelders, H. Sulkers en S.J. Hiemstra



Cryo conservering van sperma van zeldzame Nederlandse eendenrassen

C.A. Zuidberg, A. de Wit, A.H. Hoving, H.W. Woelders, H. Sulkers en S.J. Hiemstra

© 2012 Lelystad, 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.

Dit onderzoek is gefinancierd door het Ministerie van Economische Zaken, Landbouw en Innovatie (WOT-03 Genetische bronnen) en is ondersteund door de Stichting Zeldzame Huisdierrassen middels een financiële bijdrage.

Centrum voor Genetische Bronnen Nederland

Het Centrum voor Genetische Bronnen Nederland (CGN) is een onafhankelijke onderzoekseenheid van Wageningen UR die de overheid bijstaat in de uitvoering van haar wettelijke taken. De betrouwbare en onafhankelijke implementatie van deze taken wordt gewaarborgd door het Statuut Wettelijke Onderzoektaken. De cluster dierlijke genetische bronnen van CGN richt zich op behoud en bevordering van duurzaam gebruik van genetische diversiteit in landbouwhuisdieren.

Adres : Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad
: Postbus 65, 8200 AB Lelystad
Tel. : 0320 23 82 59
E-mail : cgn@wur.nl
Internet : www.cgn.wur.nl

Inhoudsopgave

	pagina
Voorwoord / dankwoord	1
Samenvatting	3
Summary	5
1. Inleiding	7
2. Ras- en dierkeuze	9
3. Pilot spermawinning	11
4. Huisvesting en verzorging van de dieren in Lelystad	13
4.1 Spermaproductie periode	13
4.2 Huisvesting	13
4.3 Verzorging en sociale interactie	13
4.4 Voeding en conditie	14
4.5 Training	14
4.6 Einde van de spermaproductie	14
5. Spermawinning	15
6. Pilot sperma isolatie epididymis	17
7. Spermaverwerking	19
7.1 Verdunnen en invriezen	19
7.2 Registratie en identificatie	20
8. Resultaten: materiaal in de genenbank	21
9. Evaluatie en conclusies	23
10. Literatuur	25

Voorwoord / dankwoord

Dit project is uitgevoerd door het Centrum voor Genetische Bronnen Nederland (CGN) van Wageningen UR, in nauwe samenwerking met de Stichting Zeldzame Huisdierrassen (SZH), vertegenwoordigd door de heer A. Boks en met de heer E. de Poel, fokker en intermediair naar fokkers / eigenaren van de eenden en ganzen. Zonder de medewerking van de fokkers en leden van de rasverenigingen van de betreffende watervogelrassen (E. de Poel, A. Vrugteman, Breman, J. Harteman en G. Olyslager) en de bereidwilligheid om hun fokdieren ter beschikking te stellen voor spermawinning, had dit project niet kunnen slagen. Ook de betrokkenheid en inzet van de medewerkers van de proefdierfaciliteit van Animal Sciences Group in Lelystad is belangrijk geweest voor het welslagen van het project (de heren G.J. Deetman, A. Ter Laak, G. Visser, J. Truin en A. Huijskes). Tevens een woord van dank aan de medewerkers van INRA op de locatie van Mont de Marsan voor de ontvangst en het laten zien van hun deskundigheid in het sperma vangen bij eenden en ganzen.

Sipke Joost Hiemstra
Clusterleider dierlijke genetische bronnen van CGN

Samenvatting

CGN heeft in haar programma voor de periode 2010-2014 opgenomen om genenbankcollecties aan te leggen van sperma van bedreigde oorspronkelijk Nederlandse eenden-, ganzen-, honden-, konijnen- en duivenrassen. CGN wil deze waardevolle genetische bronnen opslaan in de genenbank om in geval van een calamiteit een ras terug te kunnen fokken of het *in situ* behoud van het ras te ondersteunen.

Voor elke diersoort geldt een aparte aanpak voor winning, verwerking en invriezen van sperma. De eerste fase van winning van genetisch materiaal gaat hand in hand met onderzoek en methodeontwikkeling. In dit rapport worden de resultaten van de activiteiten in 2011 en 2012 gepresenteerd voor de winning van sperma van woerden (eenden). Beschreven worden de ras- en dierkeuze, de spermawinning, de spermaverwerking en het uiteindelijke resultaat van deze activiteiten, te weten het aantal spermarietjes in de genenbank.

Er is prioriteit gegeven aan de winning van sperma van de krombek- en witborsteenden. De doelstelling was om van minimaal 15 woerden van de Noord-Hollandse witborsteend en 15 van de Noord-Hollandse krombekeend in totaal minimaal 600 rietjes sperma in de genenbank op te slaan.

Er is door CGN een succesvol protocol voor het winnen en invriezen van sperma ontwikkeld. Er zijn uiteindelijk ruim 900 dosis sperma van 39 woerden in de genenbank opgeslagen, waarbij het grootste deel van de krombekeend is.

Summary

The Centre for Genetic Resources, the Netherlands (CGN) has the aim to store genetic materials of farm animal genetic resources in the gene bank, including semen of native Dutch duck breeds. CGN will store these valuable genetic resources in the gene bank to be able to recreate the breeds or to support *in situ* conservation of the breed in case of calamities.

For every species research has to be done in order to find the optimal protocol for semen collection and cryo conservation. In this report the results of the cryopreservation activities on duck breeds in 2011 and 2012 are reported. In this report is described how breeds and animals were chosen, how the protocol for semen collection is developed, which research is done for collecting and freezing the semen and how many straws were cryopreserved in 2011 and 2012.

The Dutch 'krombek' (Hook Bill duck) and the 'witborst' (North Holland White Bibbed duck) are endangered breeds and considered as our living heritage. Priority was given to these two breeds. Finally more than 900 straws from 39 animals were stored in the gene bank.

1. Inleiding

Ex situ (diepgevroren) en *in situ* (levende populatie) behoud van genetische diversiteit zijn complementaire strategieën. Met de ontwikkeling en het beheer van de nationale genenbank voor landbouwhuisdieren zorgt het Centrum voor Genetische Bronnen Nederland (CGN) voor *ex situ* behoud van rassen en voor genetische diversiteit binnen rassen.

CGN besteedt zowel aandacht aan de landbouwhuisdiersoorten met een relatief groot economisch belang (rund, varken, paard, schaap, geit, kip) als aan een aantal kleinveediersoorten (eend, gans, duif, konijn, hond) met een cultuurhistorisch belang. Met het veiligstellen van een aantal unieke Nederlandse kleinveerassen in de genenbank voor landbouwhuisdieren levert het CGN een bijdrage aan de door de Nederland aangegane verplichtingen in het kader van de CBD (Conventie voor Biodiversiteit, 1992).

CGN heeft in haar programma voor de periode 2010-2014 als doel gesteld om ook genenbankcollecties aan te leggen van sperma van bedreigde oorspronkelijk Nederlandse eenden-, ganzen-, honden-, konijnen- en duivenrassen. De keuze is gemaakt om te starten met de eenden, onder andere omdat de krombek- en witborsteend in 2011 SZH ras van het jaar waren. Onderzocht is hoeveel dieren per ras beschikbaar waren. Daarna zijn de eigenaren benaderd om hun dieren beschikbaar te stellen.

Voor elke diersoort geldt een aparte aanpak voor winning, verwerking en invriezen van sperma. De eerste fase van de winning van genetisch materiaal was gericht op het vaststellen van de optimale methode van spermawinning. Allereerst is op basis van literatuur een verkenning gedaan naar de methoden van winning en verwerking van sperma van eenden en is gebruik gemaakt van de opgedane ervaring met hanen.

Daarna is in een aantal fases ervaring opgedaan met huisvesting, verzorging, spermaproductie en -winning bij woerden. Naast spermawinning middels ejaculeren is ook een alternatieve strategie verkend, waarbij sperma uit de epididymis wordt gewonnen. Ook moest een goed werkend protocol ontwikkeld worden om het sperma te verdunnen en in te vriezen.

In dit rapport worden de resultaten van de activiteiten in 2011 en 2012 gepresenteerd. Achtereenvolgens komen aan de orde: de ras- en dierkeuze, spermaproductie, spermaverwerking en het uiteindelijke resultaat van deze activiteiten, te weten het aantal rietjes eendensperma in de genenbank.

2. Ras- en dierkeuze

Nederland kent een zestal zeldzame eendenrassen, die als zodanig worden erkend door de Stichting Zeldzame Huisdierrassen (SZH), zie hiervoor Tabel 1.

Tabel 1. *Populatiegrootte Nederlandse eendenrassen.*

Nederlandse naam eend	Eerste bronnen	Houders	Fokkers	Vrouw	Man	Totaal	Status	Trend
Overbergse eend	1996	2	2	10	5	15	Kritiek	Afnemend
Noord-Hollandse krombekeend	1600	35	15	80	20	100	Bedreigd	Stabiel
Noord-Hollandse witborsteend	1850	10	5	20	5	25	Kritiek	Afnemend
Hollandse Kuifeend	1600	10	4	35	10	45	Kritiek	Afnemend
Hollandse Dwergkuifeend	1900	5	5	20	10	30	Kritiek	Afnemend
Hollandse Kwaker	1850	100	10	750	400	1150	Kwetsbaar	Stabiel

In januari 2011 is in een bijeenkomst met de Stichting Zeldzame Huisdierrassen en betrokken eendenfokkers besloten om prioriteit te geven aan de Noord-Hollandse krombek en de Noord-Hollandse witborst, met name omdat deze door de SZH in 2011 'SZH ras van het jaar' waren (Figuur 1). Tevens was het draagvlak bij de fokkers/eigenaren groot. De nutsfunctie van de beide rassen was in het verleden voor beide rassen belangrijk, waardoor ook voor beide rassen is gekozen.

De krombekeend en de witborsteend werden in het verleden als eierproducent in Noord Holland gehouden en konden destijds in eierproductie concurreren met pluimveerassen. Deze tamme eend zwierf overdag rond in poldersloot, kwam 's nachts met wat voer weer naar huis en werd de volgende dag weer losgelaten nadat de eieren waren gelegd. In latere tijd bleven de dieren continu opgehoekt.

De krombekeend is genoemd naar de platte, brede snavel die krom naar beneden verloopt. De schedel en snavel vormen een vloeiende halve cirkel. De kromme snavel vererft recessief. De witborsteend werd ook wel spreeuwkop-eend genoemd. Deze heeft een witte borst en 4 tot 5 witte slagpennen. Verder zijn ze wildkleurig, hoewel vaak iets donkerder getint. Het dier heeft een kleine rechte snavel. Door de typische kleurtekening van de witte borst waren de eenden gemakkelijk te onderscheiden van hun wilde soortgenoten.

De heer E. de Poel, fokker en intermediair naar andere fokkers/houders, heeft CGN ondersteund bij de keuze van woorden. Zijn kennis en inzicht in de eendenfokkerij en de onderlinge verwantschappen is gevolgd.

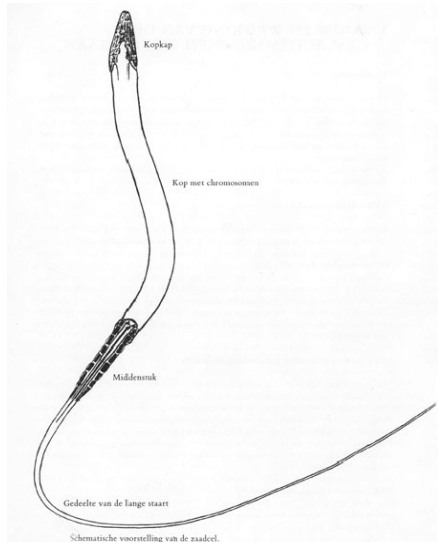


Figuur 1. *Een witborst (links) en een krombek woerd (rechts).*

De doelstelling was om een zodanige hoeveelheid genetisch materiaal in de genenbank te krijgen dat in geval van een calamiteit het ras kan worden teruggefokt. Daarom is besloten om te streven naar minimaal 600 rietjes van 15 witborst woerden en 15 krombek woerden van verschillende foklijnen/eigenaren. De keuze uit de krombekken binnen de populatie was redelijk groot, terwijl het aantal beschikbare witborsten zeer beperkt was.

3. Pilot spermawinning

Uit de literatuur bleek dat via massage sperma te verkrijgen kan worden in de periode dat woerden seksueel actief zijn. Sperma van gevogelte is anders gevormd dan sperma van zoogdieren. In Figuur 2 een afbeelding van een spermacel.



Figuur 2. Spermacel van een haan/eend/gans (Van Voorst en Leenstra).

Voorjaar 2011 is bij twee fokkers en bij het Groenhorst College in Barneveld gestart met het oefenen op de aanwezige krombekeenden en witborsteenden. Alle medewerking werd verleend om te komen tot een goede spermawinning van de woerden. Dat lukte slechts ten dele. Het sperma raakte nogal eens vervuild met mest.

Omdat spermawinning bij woerden en genten complexer bleek dan bij hanen is een bezoek gebracht aan INRA, Mont de Marsan/Benquet, Frankrijk (13-15 april 2011). Woerden en genten hebben inwendig een wikkelvormige penis die bij massage tevoorschijn komt. Medewerkers van INRA hebben het winnen van sperma en insemineren van eenden gedemonstreerd (Figuur 3). Er was gelegenheid om te oefenen. Aldaar zijn tijdens de studiereis de fijne kneepjes van het vak geleerd. Dit betrof de manier van het masseren, met name de instructie om in de 'inwendige bal' te knijpen, zodra die voldoende opgezet is. Ook is overgegaan op een andere type opvangbuis.



Figuur 3. Het sperma vangen (masseren) van een woerd en het insemineren van een eend bij INRA.

4. Huisvesting en verzorging van de dieren in Lelystad

Na de pilotfase is zowel in 2011 als in 2012 sperma gewonnen op de proefdierfaciliteit van Animal Sciences Group in Lelystad.

4.1 Spermaproductie periode

Eenden zijn reproductief in het voorjaar. Afhankelijk van de weersomstandigheden loopt het broedseizoen van ongeveer maart tot juni.

Na pilotexperimenten in het voorjaar van 2011 bij twee fokkers en op het Groenhorst College in Barneveld, zijn 14 krombekwoerden en 2 witborstwoerden naar Lelystad gehaald. In 2012 werden 23 krombekwoerden en 2 witborstwoerden naar Lelystad gehaald. In totaal zijn 35 krombekwoerden en 4 witborstwoerden naar Lelystad gehaald van 4 eigenaren, vijf dieren zijn twee keer in Lelystad geweest.

In 2011 zijn woerden pas in mei naar Lelystad gehaald. Dit was vrij laat in het seizoen. Spermawinning van deze woerden verliep na een paar dagen al succesvol en hield half juni vrij plotseling op toen dieren het begin van de rui vertoonden.

In 2012 werden al in maart, vroeg in het seizoen, 25 woerden met een paar vrouwtjes eenden naar Lelystad gehaald. Zo kon gebruik worden gemaakt van een langere periode voor de spermawinning. Twee maal en later vier maal per week vond spermawinning plaats. In 2012 was de spermaproductie van de woerden op 4 juni voorbij. Dit kan te maken hebben gehad met de winterse nachttemperaturen (< 10 °C) rond die tijd.

4.2 Huisvesting

De gedomesticeerde watervogels worden bij houders/fokkers buiten gehouden. Daarom is een ruimte van 6 x 8 meter omheind. Met een gazen net werd de ren afgedekt ter bescherming tegen roofvogels. Twee grote platte waterbakken, een paar voerbakken en een nachthok werden in de ren geplaatst. De vrouwtjes werden gescheiden gehuisvest. De woerden hadden zicht op de vrouwtjes maar konden er niet bij.

4.3 Verzorging en sociale interactie

De eenden werden dagelijks verzorgd en gecontroleerd. Bij nat weer werd zaagsel in de ren gestrooid. De waterbakken vervuilden relatief snel waardoor de dieren niet altijd de beschikking hadden over schoon water. Vooral bij slecht weer had deze vervuiling extra aandacht moeten hebben.

De onderlinge hiërarchie van de woerden leidde in 2012 tot pikgedrag, waardoor verschillende woerden een kale nek vertoonden. Na ruim 4 weken heeft deze pikorde geleid tot de sterfte van de eerste twee woerden. Totaal zeven woerden hebben uiteindelijk op deze manier het leven gelaten. Takken en ander ruw (gras-) materiaal werd aangeboden als afleidingsmateriaal om het agressieve gedrag van de woerden te beteugelen.

4.4 Voeding en conditie

In 2011 werden de eenden dagelijks gevoerd met circa 90 gram kippenlegmeel per dier. In 2012 werd ad lib eendenvoer (Kasper Faunafood Anseres 4 Foktoomkorrel) aangeboden.

Omdat in 2011 de woerden de indruk wekten dat ze tijdens de spermawinningsperiode aan conditie verloren werden de dieren in 2012 gewogen bij aankomst. Na ruim een maand werden de woerden opnieuw gewogen. De meeste woerden lieten een toename in gewicht zien terwijl enkele woerden een licht gewichtsverlies lieten zien. Het gemiddelde gewicht was net beneden de anderhalve kilogram.

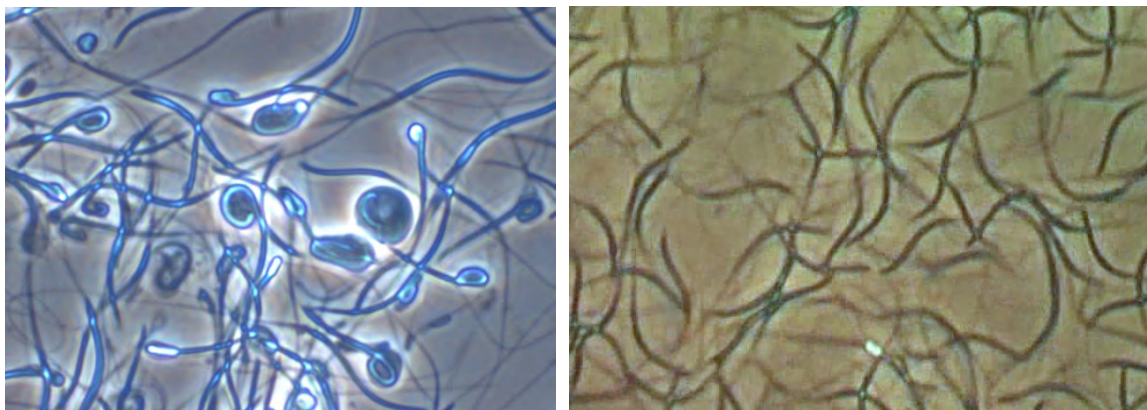
4.5 Training

Dieren in groepshuisvesting met uitloop zijn wat lastiger in de hand te krijgen dan dieren die individueel gehuisvest worden. Het verzamelen van de woerden voor de spermawinning gebeurde door de dieren in een hoek te drijven met behulp van een vanghek. Het ter hand nemen van de eenden was, zeker in het begin, zeer stressvol voor de dieren en moest vaak geoefend worden. Hoe vaker en langer sperma werd gevangen, hoe tammer de dieren werden. Hoe lang een dier getraind moet worden voordat sperma geleverd wordt, varieerde per dier.

4.6 Einde van de spermaproductie

Op 1 juli 2011 en op 9 mei 2012 zijn de geleende woerden en eenden teruggebracht naar de eigenaren. In 2012 hoefden 9 woerden niet terug naar de eigenaar, hiervan is nog enkele weken sperma gevangen totdat de productie bijna gestopt was. Eén van deze woerden vertoonde reeds enkele weken abnormale zaadcellen. De hoeveelheid afwijkende zaadcellen werd steeds groter naarmate de spermaproductie het einde naderde.

Een woerd vertoonde reeds enkele weken abnormale zaadcellen. De hoeveelheid afwijkende zaadcellen werd steeds groter naarmate de spermaproductie het einde naderde. Zie Figuur 4.



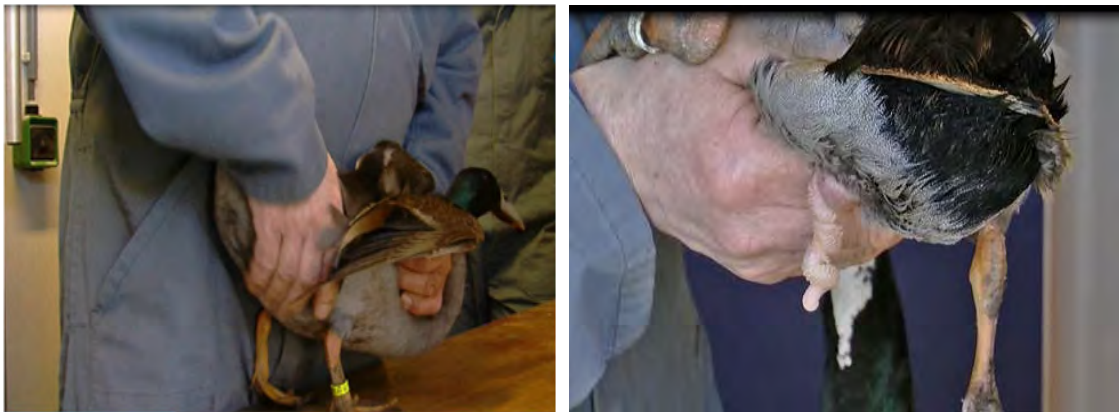
Figuur 4. Links abnormale en rechts normale zaadcellen.

Op 4 juni 2012 zijn de laatste negen woerden met T-61 geëthanaseerd. Daarna zijn deze dieren verbloed en geopend om de dieren inwendig te bekijken. Zeven woerden waren gestopt met spermaproductie. Bij beide groepen konden geen spermacellen in de zaadleider worden gevonden. De grootte van de testikels van niet producerende woerden verschilde niet van de producerende woerden. Eén woerd had zowel een vrij grote als een zeer kleine testikel.

5. Spermawinning

In het begin werden de woerden gevangen en in een krat verplaatst naar een overdekte ruimte voor spermawinning. Deze handeling bleek zeer stressvol voor de dieren. Daarna is de spermawinning in de ren van de woerden uitgevoerd. De woerden werden hierbij rustig in een hoek gedreven. Op een 'tafel' van twee gestapelde kratten werd sperma gewonnen.

Globaal is de winningsprocedure als volgt. De woerd wordt met een hand aan de vleugels gefixeerd op een tafel en met de andere hand wordt een aantal malen over de rug, vanaf de schouders richting staart, gestreken. Tegelijkertijd zal een kleine knijp-/kietel beweging de staartveren en vaak het hele lichaam omhoog zetten. Tijdens het strijken met de vingers aan de zijkant van de buikholte kan gevoeld worden of in de buikholte een soort bal (opgerolde penis) ontstaat. Daarna kan de woerd iets gedraaid worden en kan met de strijkhand lichte druk op deze 'bal' worden uitgeoefend met de cloaca boven de opvangbuis (Figuur 5). De hoeveelheid gewonnen sperma is 0,05-0,5 ml. Door de cloaca (en penis) af te spoelen met een paar druppels PE vloeistof op lichaamstemperatuur loopt het sperma in de opvangbuis. Geprobeerd wordt 1:1 te verdunnen. Vervolgens wordt het verdunde sperma overgegoten in een 1,5-ml 'epje', voorzien van het diernummer en in de koelbox geplaatst voor vervoer naar het laboratorium. Het 1:1 verdunde sperma wordt verder verwerkt bij 4-8 °C.



Figuur 5. Massage van de woerd voor spermawinning en een woerd met uitgeschachte (wokkelvormige) penis.

De woerden reageerden sterk op de weersgesteldheid. Bij mooi weer kwam de spermaproductie en de seksuele activiteit van de woerden snel op gang. Dit kan men terugvinden in de spermaproductie, zowel kwalitatief als kwantitatief. Op de spermawinningsdagen met mooi weer was de spermawinning gemakkelijker. Bij regenachtig weer was het moeilijker de woerden te masseren (strijken over natte veren was lastiger), hetgeen de spermawinning bemoeilijkte.

Aanvankelijk was het uitgangspunt dat vrouwtjes aanwezig moesten zijn om sperma te kunnen winnen. Vrouwtjes eenden waren zowel in 2011 als in 2012 aanwezig. In 2012 werd van de laatste negen woerden gedurende enkele weken sperma gewonnen zonder aanwezigheid van vrouwtjes eenden. Er was geen verschil in kwaliteit van winning (libido) en sperma te bemerken. Dit suggereert dat de aanwezigheid van vrouwtjes bij getrainde woerden niet noodzakelijk is.

Gestart is met een frequentie van 2 x per week, maar in de praktijk bleek dat 4 x per week geen problemen gaf. Er is niet geprobeerd om dieren twee maal op een dag te verleiden tot sperma winning. De spermawinning startte 's morgens om circa 8.00 uur.

In 2012 waren er in vergelijking met 2011 minder problemen met mest in het sperma. Het gebruik van ander voer kan hierbij een rol gespeeld hebben, maar ook dat er meer ervaring was met de techniek van winning.

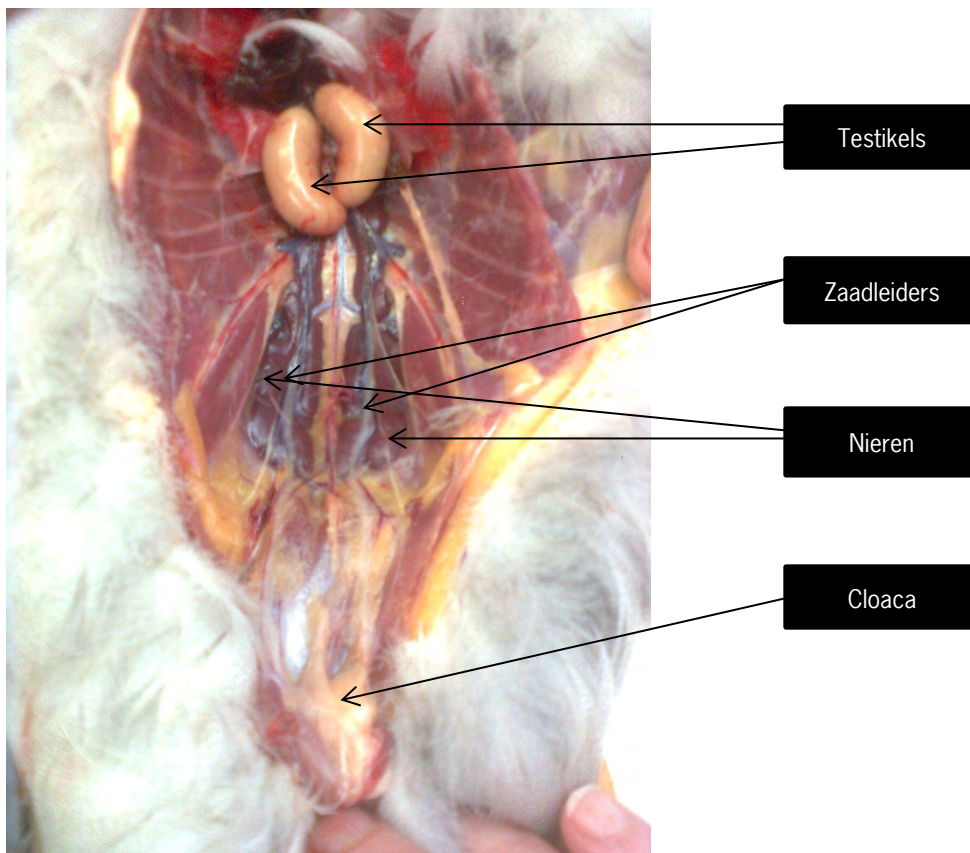
In de meeste gevallen was het sperma geschikt voor verwerking. Incidenteel is gewonnen materiaal afgekeurd vanwege onvoldoende hoeveelheid of vervuiling met mest.

6. Pilot sperma isolatie epididymis

Het idee om epididymaal sperma te winnen bij gevogelte is ontstaan uit de gedachte dat bij zoogdieren uit de epididymis tot 200 inseminatiedoses gewonnen kunnen worden (10 tot 40 miljard zaadcellen totaal). Omdat de winning van sperma middels ejaculatie bij woerden en genten niet makkelijk is, zou epididymaal spermawinning een oplossing kunnen zijn. De epididymis is de overgang van testikel naar zaadleider waarin bij zoogdieren de spermavoorraad opgeslagen kan worden.

Op 19 augustus 2011 zijn twee hanen als oefenmateriaal gebruikt voor sperma isolatie uit de epididymides. Deze hanen zijn m.b.v. T-61 geëuthanaseerd. Hierbij bleek dat bij hanen niet de epididymis, maar de zaadleider fungeert als spermaopslag. Na wat oefenen op de eerste haan werd bij de tweede haan meer dan 8 miljard zaadcellen verkregen. In de daaropvolgende pogingen zijn nog eens 18 hanen gebruikt voor sperma isolatie uit de zaadleiders. Echter maximaal 3 miljard zaadcellen konden per haan worden verkregen. Dat zou betekenen dat er maximaal 12 rietjes per haan ingevroren zouden kunnen worden. De sperma opbrengst is slechts eenmalig en gering in vergelijking met spermawinning middels ejaculaten, wat vele malen kan plaatsvinden. Voor dit beperkte aantal rietjes is het niet efficiënt hanen te doden.

Op 20 februari 2012 zijn twee woerden gebruikt voor sperma isolatie uit de zaadleiders. Na T-61 injectie zijn deze verbleed en open gemaakt. De zaadleiders zijn uitgerepareerd (Figuur 6). Het uitprepareren van de zaadleiders is moeilijker dan bij hanen. De zaadleiders lopen vanaf de testikels over de nieren naar het penisvormige aanhangsel in de cloaca. De zaadleiders zijn erg dun, terwijl rond de cloaca veel spierweefsel zit. De epididymis bevindt zich aan de binnenkant van de testikel, het is de overgang van testikel naar zaadleider. Van de testikel is de epididymis afgesneden. Dit weefsel is gespoeld met PE 1 verdunner. De spoelvloeistof bevatte naast enkele zaadcellen veel erythrocyten en somatische cellen. Bij deze woerden is er geen sperma in de zaadleiders gevonden.



Figuur 6. De interne geslachtsorganen van een woerd.

7. Spermaverwerking

7.1 Verdunnen en invriezen

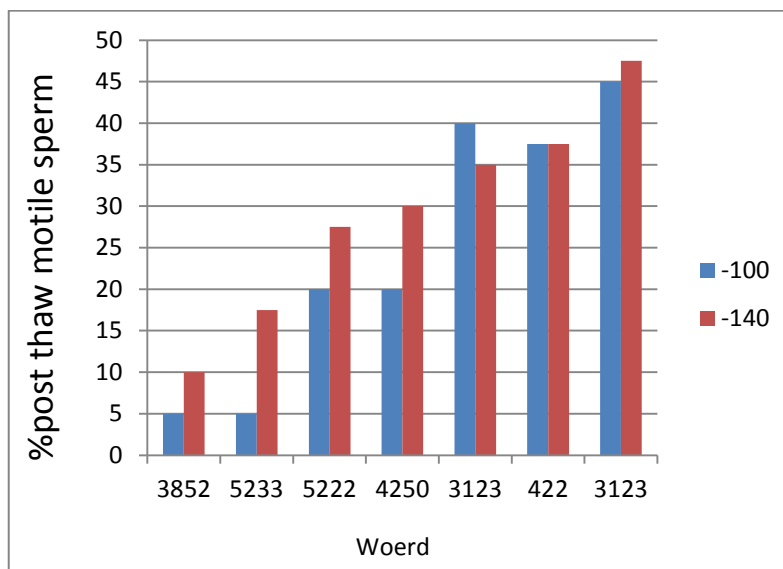
De eerste fase van winning van genetisch materiaal ging hand in hand met onderzoek en methodeontwikkeling, waarbij bij goede resultaten het diepgevroren materiaal reeds in de genenbank wordt opgeslagen. Voor elke diersoort wordt een zo optimaal mogelijke cryoconserveringsmethode ontwikkeld. Het doel is om na invriezen en ontdooien zo veel mogelijk zaadcellen te laten overleven.

Indien mogelijk wordt sperma met minimaal 60% motiliteit verdund tot $1 \cdot 10^9$ spermacellen/ml in ASG-PE-invriesmedium en geladen in 0,25 ml rietjes.

Voor het verdunnen en invriezen van het sperma zijn media met verschillende samenstelling getest. Het invriesmedium voor hanensperma (ASG-PE) gaf goede resultaten bij ander gevogelte (duiven, kraanvogels, kalkoenen). Daarom is dit medium ook gebruikt bij de spermaverdunning van de eenden. Naast dit medium zijn drie andere media (EK, HS1 en ASG-PE met 10 % kippeneidooier) splitsample getest. Deze media gaven geen verbetering van de motiliteit van het sperma na invriezen en ontdooien en daarom is definitief voor ASG-PE gekozen. De samenstelling van het ASG-PE verdunnings- en invriesmedium zal in een wetenschappelijke publicatie worden vrijgegeven.

Het streven was om 250 miljoen zaadcellen per rietje in te vriezen, zoals gebruikelijk is bij hanen. Door de spermawinningsmethode bleek het aantal zaadcellen per rietje erg variabel, omdat door het spoelen van cloaca/penis het sperma vaak te ver werd doorverdund. Het aantal zaadcellen per rietje varieert om die reden van 10 tot 200 miljoen.

Voor invriezen is splitsample een invriestemperatuur van $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ en $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ getest, dus een verschil in invries-snelheid. Figuur 7 laat de overleving na twee invriessnelheden zien, te weten bij invriestemperaturen van $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ en $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$. De overleving bij alle monsters is bij $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelijk aan of lager dan bij $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ en daarom is voor $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekozen. De 0,25 ml rietjes worden gedurende 10 minuten bij $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ ingevroren.



Figuur 7. Percentage beweeglijke zaadcellen na invriezen en ontdooien bij twee invriessnelheden (invriestemperaturen).

De ingevroren rietjes worden in de vloeibare stikstof (-196 °C) opgeslagen in stikstofvaten. Het diepvriessperma wordt op twee locaties opgeslagen.

7.2 Registratie en identificatie

Alle rietjes zijn geprint met ras, dieridentificatie, productiedatum en eigenaar. Bijna elk dier heeft een ringnummer. Van elk dier is een foto gemaakt en deze is met vermelding van ringnummer digitaal opgeslagen.

Elke spermadonor heeft een eigen kleur rietje. De informatie over de woorden, registratienummers en herkenbaarheid (kleur dier, kleur rietje etc.) en het geproduceerde sperma wordt ingevoerd in de genenbank database (Cryo-WEB). Hierin worden ook de kwaliteitsgegevens van de individuele ejaculaten vermeld, zoals aantal rietjes per productiedatum, het aantal zaadcellen per rietje en de opslagplaats in de stikstofvaten.

8. Resultaten: materiaal in de genenbank

Het aantal rietjes per ejaculaat varieerde tussen 1 en 13. Niet altijd lukte het op de gewenste concentratie zaadcellen af te vullen. Met 252 ejaculaten zijn 932 rietjes geproduceerd.

Van een aantal dieren is in Barneveld sperma gewonnen. In totaal is in Lelystad van 21 van de 24 woerden in 2011 en 23 van de 25 woerden in 2012 sperma gewonnen. Van 3 dieren in 2011 en 2 dieren in 2012 lukte het niet sperma te krijgen. Vijf woerden hebben zowel in 2011 als in 2012 sperma gedoneerd.

De hoeveelheid rietjes in 2011 was gering. In totaal zijn 72 rietjes in 2011 en 860 rietjes in 2012 ingevroren van gezamenlijk 39 dieren. Tabel 2 laat de aantallen per ras zien en Tabel 3 de resultaten per woerd.

Tabel 2. Aantal geproduceerde rietjes per ras.

	Aantal dieren	Aantal rietjes 2011	Aantal rietjes 2012	Totaal aantal rietjes
Krombek	33	49	768	817
Witborst	6	23	92	115
Totaal	39	72	860	932

Tabel 3. Aantal geproduceerde rietjes per woerd.

Diernummer		Totaal aantal rietjes	Aantal ejaculaten
Donald	Krombek	3	2
EE NL H14-10-408	Krombek	1	1
NL H06-14-19436	Witborst	3	1
NL H07-14-2193	Krombek	2	2
NL H09-14-3882	Witborst	9	2
NL H10-14-1697	Krombek	4	2
NL H10-14-1699	Krombek	6	4
NL H10-14-1706	Krombek	5	3
NL H10-14-1710	Krombek	3	1
NL H13-08-10967	Krombek	1	1
NL H13-09-6664	Krombek	2	1
NL H13-10-7762	Krombek	2	2
NL H14-08-5533	Krombek	103	21
NL H14-09-3237	Krombek	15	5
NL H14-09-3718	Krombek	1	1
NL H14-09-4250	Krombek	105	20
NL H14-10-12058	Krombek	2	2
NL H14-10-3123	Krombek	63	12
NL H14-10-3125	Witborst	17	8

Diernummer		Totaal aantal rietjes	Aantal ejaculaten
NL H14-10-3132	Krombek	2	2
NL H14-10-411	Krombek	38	13
NL H14-10-414	Krombek	48	9
NL H14-10-422	Krombek	53	11
NL H14-11-3339	Krombek	64	15
NL H14-11-3512	Krombek	12	3
NL H14-11-3766	Krombek	60	17
NL H14-11-3839	Krombek	12	4
NL H14-11-3841	Krombek	18	5
NL H14-11-42	Krombek	49	12
NL H14-11-5018	Krombek	8	3
NL H14-11-5222	Krombek	27	7
NL H14-11-5231	Krombek	60	15
NL H14-11-5233	Krombek	4	2
NL H14-11-5639	Krombek	5	1
NL H15-05-24758	Witborst	7	5
NL H15-09-3944	Krombek	8	3
NL H15-09-3953	Witborst	22	7
NL H15-11-3852	Witborst	57	15
Zwarte Ring	Krombek	31	12

9. Evaluatie en conclusies

- Er is een succesvol protocol voor het winnen en invriezen van sperma van eenden ontwikkeld.
- Voor de krombekeenden zijn voldoende rietjes sperma gewonnen. Voor de witborsteenden is de gewenste hoeveelheid niet gerealiseerd omdat weinig woerden beschikbaar waren.
- Bij een vervolgactie kan de collectie sperma van witborsteenden worden aangevuld en kan een aantal andere Nederlandse eendenrassen (kwaker en (dwerg)kuifeend) aan de genenbank worden toegevoegd.
- Bij een volgende ronde is het advies de dieren individueel of in kleinere groepen te huisvesten.
- De vraag die nog niet beantwoord is of het ingevroren sperma na inseminatie bevruchte eieren geeft. Hiervoor zou een inseminatieproef gedaan kunnen worden.

10. Literatuur

- Attempts on freezing the Greylag gander semen. Lukaszewicz , Animal Reproduction Science 80 (2004) 163-173.
- Effects of semen filtration and dilutionrate on morphology and fertility of gander spermatozoa. Lukaszewicz 2000, Elsevier.
- New method of freezing chicken semen using N-methyl-acetamide as cryoprotecting agent. S. Hanzawa
- Effects of diluents, cryoprotectants, equilibration time and thawing temperature on cryopreservation of duck semen. X.F. Han, Int. Journal of Poultry Science 4 (4):197-201, 2005.
- Efficiency of artificial vagina method in semen collection from Osaka drakes. K. Kasai 2001, Poultry science Association Inc.
- Cryogenic preservation of semen from the Aleutian Canada goose. George F. Gee, Zoo Biology 9: 361-371 (1990).
- De recente geschiedenis van de krombek- en de witborsteend. Edgar de Poel, Zeldzaam Huisdier, <http://edepot.wur.nl/172241>
- Alarmbel rinkelt voor Noord-Hollandse krombekeend. Boerenvee 2010, nr 2, <http://edepot.wur.nl/136283>
- Filmpje over het vangen van sperma van woerden. Via www.cgn.wur.nl
- <http://www.watervogels.nl/downloads/WITBORSTEENDEN.pdf>
- Noord-Hollandse krombek- en witborsteenden. SZH Ras van het jaar in 2011. Ad Boks. <http://www.szh.nl/index.php?id=368,0,0,1,0,0>

