



# Winning en cryoconservering van sperma van zeldzame Nederlandse konijnenrassen voor de genenbank

Rita Hoving, Agnes de Wit, Henk Sulkers, Kees Zuidberg, Ina Hulsegge, Henri Woelders en Sipke Joost Hiemstra





# Winning en cryoconservering van sperma van zeldzame Nederlandse konijnenrassen voor de genenbank

Rita Hoving, Agnes de Wit, Henk Sulkers, Kees Zuidberg, Ina Hulsegge, Henri Woelders en Sipke Joost Hiemstra

© 2014 Wageningen, CGN/Stichting DLO

Alle rechten voorbehouden. Overname van de inhoud is toegestaan, mits met bronvermelding.

Wageningen UR aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

Dit onderzoek is gefinancierd door het Ministerie van Economische Zaken (WOT-03-003-046 Opbouwen van genenbankcollecties voor kleinveerassen en WOT-03-003-047 Cryoconservering)

Foto voorpagina: Havana konijn 30Q-624 van J. Tromp, gefotografeerd door Wilma Taks

## **Centrum voor Genetische Bronnen Nederland**

Het Centrum voor Genetische Bronnen, Nederland (CGN) voert namens de Nederlandse overheid wettelijke onderzoekstaken (WOT) uit die verband houden met de genetische diversiteit en identiteit van soorten die van belang zijn voor de landbouw en bosbouw. Het CGN is een onafhankelijke onderzoekseenheid binnen de Stichting DLO die de overheid ondersteunt bij de uitvoering van wet- en regelgeving. De cluster dierlijke genetische bronnen van CGN richt zich op behoud en bevordering van duurzaam gebruik van genetische diversiteit in landbouwhuisdieren.

Adres : Droevendaalsesteeg 1, 6708 PD Wageningen  
: Postbus 338, 6700 AH Wageningen  
Tel. : 0317 48 05 10  
E-mail : [rita.hoving@wur.nl](mailto:rita.hoving@wur.nl)  
Internet : [www.cgn.wur.nl](http://www.cgn.wur.nl)



# Inhoudsopgave

	pagina
Voorwoord / dankwoord	1
Samenvatting	3
Summary	5
1. Inleiding en doelstelling	7
2. Prioritering van rassen en selectie van dieren voor de genenbank	9
2.1 Raskeuze en populatiegrootte	9
2.2 De Nederlandse konijnenrassen: afbeeldingen en rasbeschrijvingen	10
2.3 Gewenste omvang van een genenbankcollectie	15
2.4 Keuze en identificatie van donoren	15
3. Spermawinning en verwerking	17
3.1 Literatuuronderzoek en keuze invriesprotocol	17
3.2 Huisvesting en verzorging van de dieren	18
3.3 Winning van ejaculaat sperma	19
3.4 Winning van epididymaal sperma	19
4. Resultaten	21
4.1 Resultaten onderzoek invriesprotocol	21
4.2 Resultaten spermawinning	23
5. Conclusies en aanbevelingen	25
6. Literatuur	27
Bijlage A. Uitnodiging fokkers	29
Bijlage B. Foto's demonstratiedag 30 mei 2014	31
Bijlage C. Planning van de spermawinningsperiode	33
Bijlage D. Protocol "Invriezen Konijnensperma"	35
Bijlage E. Aantal ingevroren rietjes per dier	37



# Voorwoord / dankwoord

De genetische diversiteit binnen een ras kan zowel *in situ* (levend) als *ex situ* (diepgevroren) in stand worden gehouden. Het Centrum voor Genetische Bronnen Nederland (CGN) van Wageningen UR ondersteunt en stimuleert zowel het *in situ* als het *ex situ* behoud van genetische diversiteit bij landbouwhuisdierrassen.

De doelstelling van een genenbank is om door opslag van genetisch materiaal een ras veilig te stellen. Met het beschikbare genenbankmateriaal moet het mogelijk zijn een ras te kunnen reconstrueren in geval van calamiteiten. Ook kan materiaal uit de genenbank worden gebruikt op het moment dat de genetische diversiteit binnen een ras te beperkt is. Behoud van een ras vraagt om zorgvuldig genetisch management van een populatie.

In het voorjaar van 2014 heeft het CGN een start gemaakt met het veiligstellen van genetisch materiaal van de meest zeldzame Nederlandse konijnenrassen. De activiteiten zijn uitgevoerd in nauwe samenwerking met Kleindier Liefhebbers Nederland (KLN) en de Stichting Zeldzame Huisdierrassen (SZH). Zonder de inzet van de speciaalclubs zou het voor het CGN niet mogelijk zijn geweest om voldoende en onverwante rassen beschikbaar te krijgen en om deze genenbankcollectie op te starten.

De medewerking van de fokkers en de samenwerking met KLN en SZH en de Stadsboerderij "Presikhaaf" in Arnhem was geweldig. Tijdens de demonstratiedag op 30 mei in Arnhem was het enthousiasme bij iedereen voelbaar. Bij deze willen we speciaal nog een paar mensen danken, zonder wie het niet mogelijk is geweest dit werk te doen. Allereerst Jan Renes van KLN, die de intermediair was naar alle fokkers, voor al zijn bel-, organiseer- en transporteerwerk. En Wilma en Ad Taks voor de prachtige foto's van de dieren, waar de fokkers na afloop ook erg blij mee waren. En Ad Taks ook voor zijn inzet bij de opzet van dit initiatief. Daarnaast Harry Arts voor zijn houderijadviezen en het bloedtappen. En tenslotte Martin Faassen voor de perfecte huisvesting en verzorging en Stefanie Croes voor de vakkundige assistentie bij de spermawinning.

Met de opslag van sperma van zeldzame Nederlandse konijnenrassen heeft CGN de genenbank voor landbouwhuisdieren in samenwerking met de fokkers kunnen uitbreiden met rassen met een unieke cultuurhistorische en genetische waarde.

Sipke Joost Hiemstra  
Clusterleider dierlijke genetische bronnen van CGN





## Samenvatting

Populatiebeheer vraagt om zorgvuldige fokkerijbeslissingen en om een verantwoord genetisch management van de populatie. Rassen veranderen in de loop van de tijd en een ras kan bedreigd worden in haar bestaan wanneer er onvoldoende fokdieren zijn of wanneer de genetische diversiteit binnen een populatie sterk terugloopt. Middels opslag van genetisch materiaal in de genenbank kan de genetische variatie binnen een ras worden veiliggesteld voor de toekomst. Bovendien kan het materiaal interessant zijn voor onderzoeksdoeleinden.

Met het project “Opbouwen van genenbankcollecties voor kleinveerassen, WOT-03-003-046” wil CGN de genetische diversiteit in kleinveerassen *ex situ* veilig stellen en daarmee een bijdrage leveren aan de Nederlandse verplichtingen in het kader van het biodiversiteitsverdrag (CBD) en het FAO Global Plan of Action on Animal Genetic Resources.

In 2013 hebben het Centrum voor Genetische Bronnen in Nederland van Wageningen UR (CGN), Kleindier Liefhebbers Nederland (KLN) en de Stichting Zeldzame Huisdierrassen (SZH) afspraken gemaakt hoe spermawinning voor de genenbank vorm zou kunnen krijgen. In het voorjaar van 2014 is hiervoor een win- en invriesactie opgezet. In dit rapport wordt hierover verslag gedaan.

In de aanloop tot de praktische uitvoering is een protocol voor winning en invriezen van konijnsperma vastgesteld. Vervolgens zijn de zeldzame rassen gekozen die als eerste in aanmerking komen voor opname in de genenbank: de rassen Beige, Deilenaar, Eksterkonijn, Gouwenaar, Havana, Hulstlander, Sallander en Thrianta. In totaal zijn 69 rammen van 8 rassen van 28 verschillende eigenaren op Stadsboerderij “Presikhaaf” in Arnhem aangeleverd voor spermawinning. De speciaalclubs van de rassen hebben geadviseerd welke dieren een goede afspiegeling van het ras zijn. Van deze rammen hebben er 55 sperma geleverd en dit heeft bijna 1900 rietjes opgeleverd. Samen met de samenwerkingspartners en de fokkers is een flinke stap gezet om de unieke genetische diversiteit van de zeldzame Nederlandse konijnenrassen veilig te stellen.



## Summary

The main aim of the Dutch gene bank for farm animals is long term conservation of genetic diversity between and within breeds. A broad genetic base is crucial for long term conservation of these breeds of Dutch origin which are a valuable part of our cultural heritage. In the future semen might be necessary in case of genetic problems in live populations (e.g. due to genetic drift or inbreeding), in case of loss of a substantial number of breeding animals or gene bank material can be used for research purposes.

In 2014, genetic material of eight rare Dutch rabbits breeds was collected and stored in the Dutch gene bank. The Centre for Genetic Resources, the Netherlands (CGN) collected this semen in collaboration with the Dutch Federation of Rabbits and Poultry (KLN), the Dutch Rare Breed Survival Trust (SZH), and with individual breeders. The breed organisations have chosen representative males from their populations as a "back-up" of the current breeding populations.

A protocol to collect and to freeze rabbit semen was developed, based on a literature survey. To collect semen 69 males of in total from 8 different breeds and 28 different owners were housed together, 55 out of the 69 males produced semen, in total almost 1900 straws.

An important step has been made by CGN, in collaboration with the breeders, to safeguard a number of cultural and genetically unique Dutch rabbit breeds for the future.



# 1. Inleiding en doelstelling

Genetische diversiteit kan zowel *in situ* (levend) als *ex situ* (diepgevroren) in stand worden gehouden. Het Centrum voor Genetische Bronnen Nederland (CGN) van Wageningen UR ondersteunt en stimuleert zowel het *in situ* als het *ex situ* behoud van genetische diversiteit bij landbouwhuisdieren. Voor de lange termijn is het van belang om de genetische diversiteit binnen een ras veilig te stellen door effectieve en efficiënte *ex situ* conservering van genetische diversiteit in een genenbank. Bovendien bevat de genenbank waardevol (historisch) materiaal dat interessant kan zijn voor onderzoeksdoeleinden. CGN beheert anno 2014 genenbankcollecties van runderen, varkens, paarden, schapen, geiten, pluimvee, honden, watervogels en inmiddels ook van konijnen. Zowel zeldzame rassen als veelgebruikte, commerciële rassen zijn vertegenwoordigd in de genenbank.

Met de ontwikkeling en de instandhouding van de genenbankcollecties levert CGN een belangrijke bijdrage aan de door Nederland aangegane verplichtingen in het kader van de Conventie inzake Biologische diversiteit (CBD, 1992) en het Global Plan of Action voor dierlijke genetische bronnen van de Wereldvoedselorganisatie van de Verenigde Naties (FAO, 2007).

Een belangrijke doelstelling van de genenbank voor landbouwhuisdieren is om door opslag van genetisch materiaal alle Nederlandse zeldzame rassen veilig te stellen voor de toekomst. De fokkers kiezen een afspiegeling van hun populaties (zo veel mogelijk onverwante dieren) om een “back-up” van het ras te maken. Met het beschikbare genenbankmateriaal moet het mogelijk zijn de fokkerij van een ras te kunnen ondersteunen wanneer dat nodig of wenselijk is. Genenbankmateriaal kan worden ingezet wanneer genetische problemen in populaties vóórkomen, om een ras te reconstrueren, of voor het toevoegen van unieke genen aan bestaande populaties.

Met het project “Opbouwen van genenbankcollecties voor kleinveerassen, WOT-03-003-046” stelt CGN in samenwerking met de SZH, KLN en individuele fokkers de genetische diversiteit in kleinveerassen *ex situ* veilig en levert daarmee een bijdrage aan de Nederlandse verplichtingen in het kader van het biodiversiteitsverdrag en het Global Plan of Action. De genenbankcollectie is een ‘verzekering’ voor lange termijn behoud van genetische diversiteit.

In dit rapport wordt beschreven welke activiteiten CGN in samenwerking met de SZH, KLN en individuele fokkers hebben ondernomen om genetisch materiaal van konijnenrassen veilig te stellen in de genenbank. Op basis van literatuur en praktijkervaringen is een protocol voor spermawinning en spermaverwerking (cryoconservering) vastgesteld. Een dergelijk protocol was niet beschikbaar in de Nederlandse bedrijfsmatige konijnenhouderij omdat daar uitsluitend met vers sperma gewerkt wordt en niet met ingevroren sperma. Het rapport eindigt met een beschrijving van de resultaten van de spermawinning.



## 2. Prioritering van rassen en selectie van dieren voor de genenbank

### 2.1 Raskeuze en populatiegrootte

Er zijn internationaal bekeken vele konijnenrassen, die zich onder andere onderscheiden in grootte, vorm (type), kleur en beharing. Nederland kent elf konijnenrassen die Nederland als land van oorsprong hebben. Deze rassen zijn door de overkoepelende organisatie KLN (of diens voorloperorganisatie NKB) erkend. Om de genetische diversiteit in deze elf rassen veilig te stellen, is het verstandig om genetisch materiaal op te slaan in de genenbank. Om financiële en praktische redenen moeten echter prioriteiten gesteld worden en is allereerst een afweging gemaakt welke rassen voorrang zouden moeten krijgen bij het invriezen van sperma.

In Tabel 1 staan de FAO Guidelines In Vivo Conservation (FAO, 2013). Deze geven aan populaties een risicoclassificatie voor bedreigheid op basis van het aantal aanwezige vrouwelijke fokdieren en/of inteelttoename binnen een ras of populatie. Hierbij wordt een onderscheid gemaakt in voortplantingsvermogen tussen diersoorten. Konijn valt in de categorie van diersoorten met een gemiddeld hoog aantal nakomelingen per vrouwelijk dier.

**Tabel 1.** Indeling risicoclassificatie van rassen volgens FAO criteria

Risicostatus Bedreigheid	Voortplantingsvermogen per ouderdier			
	Hoog (veel nakomelingen per vrouwelijk dier. Bij gevogelte, hond, varken, konijn)		Laag (weinig nakomelingen per vrouwelijk dier. Bij paard, rund, schaap, geit)	
	Aantal vrouwelijke fokdieren	en/of inteelt toename per generatie	Aantal vrouwelijke fokdieren	en/of inteelt toename per generatie
Kritiek	< 100	> 3%	< 300	> 3%
Bedreigd	< 1000	1 – 3 %	< 3000	1 - 3 %
Kwetsbaar	< 2000	0,5 – 1 %	< 6000	0,5 – 1 %

In Tabel 2 staat de populatiegrootte en de trend van het afgelopen decennium voor de zeldzame Nederlandse konijnenrassen weergegeven. Deze gegevens zijn ook te vinden in de rassendatabase EFABIS (<http://efabis.cgn.wur.nl/>). Na bespreking met KLN en de SZH is besloten drie rassen minder prioriteit te geven. Deze drie rassen zijn relatief populaire rassen waarvan de populatie nog vrij groot is. De rassen die als eerste in de genenbank worden opgenomen zijn Beige, Deilenaar, Eksterkonijn, Gouwenaar, Havana, Hulstlander, Sallander en Thrianta. Dit zijn meest middelmaat konijnenrassen van ca 3 kg.

**Tabel 2.** Populatiegrootte en status van de zeldzame Nederlandse konijnenrassen

Ras (11 Nederlandse rassen)	Aantal voedsters	Aantal rammelaars	Aantal nesten	Jaar van erkenning
Beige	35	15	6	1940
Deilenaar	100	50	21	1940
Eksterkonijn	55	25		1981
Gouwenaar	55	25	8	1927
Havana	70	30	11	1907
Hulstlander	80	30	10	1984
Klein lotharinger	220	110	62	1975
Nederlandse hangoordwerg	2700	1350	330	1964
Nederlandse kleurdwerg	2500	1000	320	1940
Sallander	40	15	8	1975
Thrianta	350	200	54	1949 en in 1971/1975

## 2.2 De Nederlandse konijnenrassen: afbeeldingen en rasbeschrijvingen

De foto's en rasbeschrijvingen zijn letterlijk overgenomen uit het prachtige cultuurhistorische document van ons nationaal levend erfgoed: "Onze Nederlandse huiddierrassen" (Ad en Wilma Taks, 2010). Deze tekst is tot stand gekomen in afstemming met KLN en de specialclubs. In de Konijnenstandaard van KLN (KLN, 2013) staan de ideaaltypische beschrijvingen van de erkende rassen beschreven.

### Beige



De Beige is een konijn met een heel rustig temperament. Dit konijnenras heeft grijsblauwe ogen die op sommige momenten een vuurgloed hebben. Dit laatste kenmerk treffen we ook aan bij de Havana en de Gouwenaar. De Beige is ook qua type en bouw gelijk aan de Havana. De pels is iets fijner van structuur, vol en dicht ingeplant. De Beige heeft de meest verdunde kleur. De uitmonstering kenmerkt zich door een zo dun mogelijk patroon. De dekkleur van het lichaam is geel met een zeer ijle vale lichtblauwe waas. De onderzijde van het lichaam toont een zeer lichte gouwenaarkleurige sluier. De oren tonen iets meer vaal lichtblauw. De Nederlandse Beige, geboren in de Maasstad, heeft zijn naam aan zijn kleur te danken. Zowel in Engeland als in Nederland ontstonden rassen met deze bijzondere vachtkleur. Jarenlang hebben fokkers uit beide landen, zonder het van elkaar te weten, dit ras onder dezelfde rasnaam gefokt. Omdat de Beige een aantrekkelijke kleur bezit en aangetoond kon worden dat de kleur fokzuiver is, werd het ras in 1940 officieel erkend. Dit ras is vooral in handen van de sportfokkers. De 7 rassenclub is de specialclub van dit ras.



### Deilenaar



De Deilenaar is een typisch pelsras vanwege zijn typische haarstructuur, kleur en ticking. Een lust voor het oog! Dit ras is levendig en vriendelijk. De Deilenaar heeft een krachtig ontwikkelde markante kop, vooral de ram. De oren zijn stevig van structuur en goed afgerond en zo'n 11 cm lang. De ogen zijn donkerbruin. Het is een kort en geblokt konijn met soepele rondingen. De bouw is stevig met een brede voor- en achterhand. De benen zijn stevig en kort. Het gewicht zit tussen de 2 en 3½ kilo. De pels is glanzend en langer dan die van andere konijnen. Op de kop, de oren en de poten is de vacht korter dan op de rest van het lichaam. De zeer warme roodbruine dekkleur en de golvende zwarte ticking geven de Deilenaar een intens uiterlijk. De buik is roomkleurig. De achterbenen zijn aan boven- en binnenzijde roodbruin. De snuit, de kaakranden en de binnenzoom van de oren zijn tankleurig. De oren zijn verder zwartgezoomd. De voorbenen zijn zwaar getickt. De Deilenaar is ontstaan in Deil, een plaats in de Betuwe. Dit ras is gefokt uit een iets te kleine haaskleurige Vlaamse reus met een zwarte ticking en een zwarte Tan. Vermoedelijk zijn onder andere ook de Chinchilla's en Rode nieuw-zeelanders gebruikt. Alle jongen uit de eerste generatie waren haaskleurige dieren. In 1939 werden de eerste dieren tentoongesteld. Het ras is op 1 mei 1940 erkend. Deze konijnen zijn voornamelijk in handen van sportfokkers.

### Eksterkonijn



Het Eksterkonijn is qua karakter een erg rustig konijn. Het is een goed ontwikkeld licht gestrekt dier met een mooi, vol en breed lichaam en een zeer korte hals. De oortoppen zijn afgerond en de poten zijn relatief kort. De beharing van de Ekster is kort en glanzend. Het gewicht ligt tussen de 3½ en 4 kilo. Het Eksterkonijn is zwart-wit, met op de kop, borst en voorbenen, de zogenaamde harlekijnaftekening en op lichaam zowel witte als zwarte banden, met een minimum van drie banden aan elke zijde. De oogkleur is donkerbruin, en de nagelkleur is zowel aan de witte als de zwarte benen altijd donker hoornkleurig. Het Eksterkonijn bestaat als ras nog niet zo heel lang. Het is pas erkend sinds 1981. Het is gecreëerd in zowel Engeland als Nederland. Deze konijnen zijn in wezen Japanners waarvan de geelrode kleurvlakken wit zijn. Door inkruising van de zogenaamde chinchillafactor wordt de aanmaak van geel pigment verhinderd. Het fokken van dit ras is een grote uitdaging vanwege de tekening van de dieren. Het kruisen van twee mooi getekende dieren geeft niet automatisch goede dieren.

### Gouwenaar



De Gouwenaar is een rustig en aanhankelijk konijn. Het type behoort gelijk te zijn aan dat van de Havana. De kop is kort en breed en de oren hebben afgeronde toppen. Het ras bezit een korte en gespierde nek. Het is verder een kort, vierkant gebouwd dier met brede borst en schouders. De rug is breed met een soepel afgeronde achterhand. De oogkleur is blauwgrijs, de ogen tonen de vuurgloed van hun Havana voorouders. De pels is kort, fijn en zacht, dicht tegen het lichaam aanliggend. Een Gouwenaar weegt tussen 2½ en 3½ kilo. De Gouwenaar kenmerkt zich door de egale, valse lichtblauwe kleur, vergelijkbaar met een stevig uitgeblazen rookwolk van een kwaliteitssigaar. Opvallend bij dit ras is dat de grondkleur sterker is dan de dekkleur.

Het ontstaan van de Gouwenaar is bijzonder. Het was een sierduivenfokker die bij toeval een nest Havana's kreeg met de hierin voorkomende zeer tere blauwe kleur. De man had oog voor bijzonder levend erfgoed. Hij hield deze dieren aan en fokte hiermee verder onder de naam Gouwenaar. Dit laatste als herinnering aan zijn woonplaats Gouda. De kleur was in het begin veel donkerder dan die wij nu kennen. Door strenge selectie is de huidige vale lichtblauwe kleur ontstaan. Dit ras is niet alleen een fraai tentoonstellingsdier, maar zou ook bijzonder geschikt zijn als huisdier. De 7 rassensclub is schatbewaker van dit ras.

### Havana



De Havana is een markant oud-Nederlands ras met een attent en levendig karakter. De kop is vrij kort, zeer breed en goed ontwikkeld met oren van ca 11 cm lang. Het dier heeft een kort en geblokt lichaam, met weinig nek en is zowel aan de voor- en achterkant mooi afgerond. De poten hebben een gemiddelde lengte. Ze hebben een dichte, glanzende vacht met een fijne haarstructuur. Het gewicht ligt tussen de 2½ en 3½ kilo. De Havana is donkerbruin zonder nuanceverschillen, gelijk aan pure chocolade, met blauw als grondkleur. In 1898 werden in Ingen in de Betuwe, bij de gebroeders Honders, uit twee rasloze konijnen witgevelekte konijnen geboren met een bijzonder donkerbruine vachtkleur. Door kruisingen met Russen en terugkruisingen naar deze bijzondere gekleurde dieren is geprobeerd de kleur vast te leggen. Dat is gelukt! In 1902, op een grote internationale tentoonstelling in Parijs, werden deze dieren voor het eerst geshowd. Vanwege de bijzondere gloed die dit konijn in de ogen heeft, vuurgloed genaamd, werden ze Ingense vuuroog genoemd. Later is de rasnaam veranderd in Beverkonijn. Uiteindelijk kreeg het zijn blijvende rasnaam Havana. Havana's worden door fokkers voornamelijk gehouden als showdier. Als gezelschapdier komt de Havana helaas zelden voor. De 7 rassensclub behartigt de belangen van dit ras.

### Hulstlander



De Hulstlander is een temperamentvol konijn met een geblokte bouw. Het heeft een brede korte kop met flinke wangen en een zeer korte hals. De oren zijn ongeveer 9 cm lang, stevig, goed behaard en worden in een V-vorm gedragen. De lichtblauwe ogen zijn opvallend. Dit ras heeft een kort en vol lichaam met mooi geronde lijnen. De poten zijn kort, stevig en recht. Het dier weegt ongeveer 2½ kilo. Het is een echt pelsras. De vacht is kortharig, dicht tegen het lichaam aanliggend met voldoende onderwol. De Hulstlander komt alleen in de kleur wit voor.

De Hulstlander is één van de jongere rassen die we in de Nederlandse raskonijnenfokkerij kennen. Het ras is gecreëerd door wijlen de heer J. de Graaf uit Nieuwleusen. Hij heeft hierbij gebruikt gemaakt van Witte weners en blauwogige Pooltjes. De Hulstlander dankt zijn naam aan de streek Hulstlanden, een gebied dat in Overijssel tussen Ommen, Zwolle en Meppel ligt. Het ras is begin 1980 ontstaan en werd in 1984 officieel erkend. Het ras komt in andere landen nog nauwelijks voor. De Hulstlander wordt op beperkte schaal gehouden door sportfokkers. Als huisdier is dit ras voor kinderen wellicht te temperamentvol. De Thrianta-Hulstlanderclub heeft als geen ander begrepen hoe belangrijk het is om ons levend erfgoed te bewaken. Dit ras hebben zij omarmd en promoten ze met verve.

### Klein lotharinger



De Klein lotharinger is een vrij levendig en goedaardig konijn. Het heeft een brede, niet te lange, goed ontwikkelde kop met brede wangen. De oren zijn ongeveer 10 cm lang. Dit ras kent een gestrekte lichaamsbouw en staat op rechte en stevige poten. De Klein lotharinger mag niet meer dan 3 kilo wegen. Het heeft een vacht met normale lengte die zacht aanvoelt en rijk glanst. Kenmerkend is de bijzondere tekening op een stralende witte pels. De koptekening omvat de zogenaamde vlinder, de oogringen, de doorn, de wangstippen en de gekleurde oren. Op het lichaam heeft de Klein lotharinger een zogenaamde aalstreep die loopt van achter de oren tot aan de staart. Ten slotte hebben ze op elke zijde drie tot acht los van elkaar staande stippen. Dit Nederlandse ras is midden jaren zeventig gecreëerd als alternatief voor de Groot lotharinger. Het heeft in de loop der jaren veel ontwikkeling doorgemaakt. Het type is korter geworden, wat het ras ten goede is gekomen. In 1975 werd het ras officieel erkend. De kwaliteit is hoog. Regelmatig wint een Klein lotharinger een tentoonstelling. Met zijn prachtige dalmatiërachtige verschijning heeft dit ras binnen korte tijd een grote groep liefhebbers voor zich gewonnen.

### Nederlandse kleurdwerg



De Kleurdwerg is een levenslustig konijntje met grote uitspringende ogen, het lichaam is even lang als breed, de kop is bolrond, De oortjes worden nauwsluitend gedragen en zijn van 4 tot 6 cm lang, smal van vorm en lopen geleidelijk uit in een licht afgeronde punt. Het gewicht varieert van 800 tot 1100 gram. De vacht is iets korter dan normaal, zacht en glanzend met veel onderhaar. De Kleurdwerg komt in vrijwel alle erkende konijnenkleuren, uitmonsteringen en aftekeningen voor. De Kleurdwerg is in de jaren dertig in Nederland ontstaan door het kruisen van de roodoog Pool en kleine wilde konijnen. Het ras werd in 1938 voor het eerst op een tentoonstelling getoond. In 1940 werd het ras officieel erkend. In Engeland kent men twee variëteiten van deze konijntjes: de Polish, het ras waarmee de Pool in zijn huidige verschijningsvorm is gecreëerd en de Netherland Dwarf, een verzamelnaam van 'onze' Kleurdwerg en de rood- en blauwoog Pool. (De Polish is in Nederland erkend onder de naam Haasdwerg). Op de grootste nationale tentoonstellingen is de Kleurdwerg recordbreker met de meeste inzendingen. In de meeste landen is het ras een van de populairste konijnenrassen. De Kleurdwerg is daarom het grootste Nederlandse levend-erfgoed-exportproduct in de konijnenwereld. Dit konijn is als huisdier voor kinderen uitermate geschikt. De Nationale Polen- en Kleurdwergenclub (NPKC) behartigt de belangen van dit ras. Het is de grootste speciaalclub, aangesloten bij de KLN.

### Nederlandse hangoordwerg



De Nederlandse hangoordwerg is een vriendelijk en levendig konijn met een heel hoog knuffelgehalte. De kleine vorm, de hangende oortjes en de bolronde kopjes breken ieders hart. De oren hangen loodrecht naar beneden met de schaalopening naar de kop gekeerd. Door de ombuiging van de oren aan de wortels ontstaan twee zichtbare verhogingen, kronen genaamd. Dit konijn heeft een kort en gedrongen, halsloos, type met brede schouders en borst. De ruglijn is licht gewelfd en de brede achterhand kort, maar fraai afgerond. De poten zijn stevig, kort en dik. Het dier weegt ongeveer 1½ kilo. De pels moet vol ingehaard, glanzend en aanliggend zijn. In 1952 vatte A. de Cock het plan op om een miniatuurversie van de Franse hangoor te fokken. Het heeft hem uiteindelijk twaalf jaar selectie en inspanning gekost om tot een klein hangoorras te komen. Hij

ontwikkelde zijn ras uit kleurdwergen en Franse hangoren, ook heeft hij de Engelse hangoor ingekruist om goede hangende oren te krijgen bij dit nieuwe ras. In 1964 toonde hij zijn nieuwe ras voor het eerst aan het grote publiek en werd het ras officieel erkend. In de beginperiode waren het vooral de madagascarkleurige, konijngrijze en ijzergrauwe dieren die veel op tentoonstellingen waren te bewonderen. Nu zijn er bijna 20 verschillende effenkleurige en bonte dieren erkend. Op de grotere kleindiershows zijn al deze kleuren te bewonderen. De Nederlandse Hangoor Dwergen Club (NHDC) is de speciaalclub die het ras promoot en ervoor zorgt dat de kwaliteit wordt verbeterd.

### Sallander



De Sallander is een vriendelijk en levendig konijn. De kop is goed ontwikkeld en breed met stevig rechtopstaande oren. De ogen zijn donkerbruin. Het is een wat gedrongen, mooi gevuld dier met een korte hals dat flink en stevig op de poten staat. De beharing is van normale lengte, dicht en vol, met veel onderwol, het ligt zacht en glad tegen het lichaam aan. De Sallander weegt tussen de 3 en 4 kilo. De Sallander heeft eenzelfde uitmonstering als de Thüringer, maar de kleuren zijn bleker. Dit maakt het contrast in de uitmonstering nog scherper zichtbaar. De kleur is gebroken wit waarbij elke haarpunt lichtjes bruinzwart is aangetipt. De oren, de borst, de snuit, de achterhand, de poten en de buik zijn donkerder gekleurd. Het ras is vernoemd naar de streek van de fokker, namelijk Salland. Er werden Thüringers met Chinchilla's gekruist. De erkenning van dit ras vond plaats in 1975. Het is een echt tentoonstellingsdier. In Nederland is het ras een bekende verschijning, maar in andere landen komt het weinig voor.

### Thrianta



De Thrianta is een vriendelijk en toeschietelijk konijn. Het heeft een brede, korte en bolvormige kop. De oren zijn tussen de 8 tot 10 cm en hebben afgeronde toppen. Het lichaam is kort en gedrongen met een goed gevulde voor- en achterhand. De benen zijn recht en stevig. De beharing heeft een normale lengte en is dicht ingeplant. De vacht voelt zacht aan vanwege de onderwol. De Thrianta weegt tussen de 2 en 3 kilo. Het ras heeft een egale, warme oranje kleur van neuspunt tot staarteinde. Deze fraaie kleur vererft niet constant. Een nest jongen geeft verschillende tinten oranje. De Thrianta is een Nederlandse creatie van de heer Andreae uit Assen. Het doel was een eenkleurig oranje ras te creëren. Het ras werd gefokt uit een bruine Tan en een eenkleurig konijn dat uit madagascarkleurige Papillons was geboren. Ook zijn Havana's gebruikt. De eerste dieren toonden reeds een warme oranjerode kleur en werden oranje Tans genoemd. Het ras werd erkend op 1 mei 1940. Het ras werd niet populair en verdween zelfs enige tijd uit de standaard. In Duitsland bestond een ras dat met inzet van de Thrianta was gecreëerd, wat bleker van kleur, maar erg veel gelijkend op de Thrianta. Tegen het einde van de jaren zestig werden deze konijnen opgekocht door Nederlandse fokkers. In 1971 werden enkele geïmporteerde dieren weer in de standaard opgenomen. De Thrianta wordt vooral gehouden door sportfokkers. Dit ras zou het toch ook bij de liefhebber heel goed moeten doen. Zeker als men een accent legt op ons enige echte nationale oranje-boven-konijn met een hoog knuffelgehalte door zijn zachte pels.

## 2.3 Gewenste omvang van een genenbankcollectie

Het doel van CGN is om van ieder ras ten minste een zogenaamde “core collection” ofwel kern-collectie op te slaan in de genenbank. De gehanteerde definitie van het begrip “core collection” is de minimale hoeveelheid sperma die nodig is om een ras weer te kunnen opbouwen, mocht deze uitsterven. De omvang die nodig is om een ras te herstellen hangt af van de diersoort en het type genetisch materiaal (sperma, embryo's of anders) dat in de collectie aanwezig is (CGN Conservation Planner, link in literatuur). Voor het terugfokken met sperma is een aantal generaties nodig. In theorie kan een ras gereconstrueerd worden met voldoende sperma van één dier, maar in de praktijk betekent dit echter dat de genetische variatie dan bijna geheel is verdwenen en dat het ras vervolgens weer opnieuw het risico loopt om uit te sterven. Om de inteelt niet te hoog laten oplopen bij een herstelprogramma (<0.5% per generatie) zijn bij een uitgekiend fokschema tenminste 25 mannetjes en 160 vrouwtjes nodig en 5 rondes terugkruising. Berekeningen laten zien dat om tenminste 160 vrouwtjes te produceren per ronde, gegeven een worpgrootte van minstens 4, een bevruchtingspercentage van 65% en een overleving tot vruchtbare leeftijd van 75%, 400 inseminaties nodig zijn, dus over 5 rondes 2000 inseminaties. Voor een volledige en optimale genenbankcollectie van een konijnenras is het gewenst om – gespreid over meerdere generaties - van minstens 25 onverwante rammen ten minste in totaal 2000 doses op te slaan. Voor deze eerste actie in 2014 was per ras een beperkt aantal rammen beschikbaar en is gekozen om met meerdere rassen te starten.

## 2.4 Keuze en identificatie van donoren

De speciaalclubs kennen hun verenigingsstructuur en hun fokkers en hebben geadviseerd over de keuze van de donoren, waarbij is gestreefd naar een goede afspiegeling van de gehele populatie.

In Nederland worden konijnen geregistreerd door middel van een tatoeage in de oren. Dit nummer is gekoppeld aan de fokker en staat geregistreerd bij KLN. Konijnen welke gefokt worden om er mee naar tentoonstellingen te gaan, worden op een leeftijd van 6 tot 8 weken getatoeëerd. De plaatselijke vereniging verzorgt het tatoeëren. Bij het tatoeëren wordt in het rechteroor van het konijn het laatste cijfer van het jaar waarin het is geboren, gevolgd door twee verenigingsletters getatoeëerd. In het linkeroor worden het nummer van de maand en volgnummer getatoeëerd.



### 3. Spermawinning en verwerking

In het najaar van 2013 zijn de eerste contacten gelegd tussen CGN, SZH en KLN over spermawinning van konijnenrassen voor de genenbank. Daarop volgend is tijdens de Championshow op 24 januari 2014 de afspraak gemaakt dat de speciaalclubs van de 8 meest zeldzame Nederlandse rassen contact leggen met hun fokkers om rammen voor 3 weken beschikbaar te stellen aan CGN voor spermawinning. De contactpersonen van de speciaalclubs zijn gevraagd om zoveel mogelijk onverwante dieren te selecteren die gezamenlijk een goede afspiegeling van de populatie vormen. De zuivere lijnen worden door een klein aantal betrouwbare fokkers in stand gehouden.

SZH heeft vervolgens de mogelijkheden van een huisvestingslocatie onderzocht. De proefdierfaciliteit van Wageningen UR in Lelystad was hiervoor niet geschikt omdat vanuit deze faciliteit dieren niet worden geretourneerd (one direction).

De meest geschikte periode voor spermawinning bleek mei/juni te zijn, direct na het fokseizoen en ver weg van het keuringsseizoen. Op basis van de lijst met meewerkende fokkers en beschikbare dieren is een routeplanning gemaakt om de konijnen op de spermawinlocatie en weer bij de eigenaar te krijgen. In Bijlage C staat de planning van de spermawindagen. Er is in twee series gewerkt met ca 35 dieren per serie. Er is 3 keer per week sperma gewonnen, in totaal 5 keer per serie. CGN heeft met de eigenaren een overeenkomst gemaakt, waarin staat dat de eigenaar zijn dieren beschikbaar stelt voor spermawinning, dat CGN de kosten van spermawinning draagt, dat CGN eigenaar van het gewonnen sperma wordt, dat dit sperma niet uitgegeven wordt zonder advies van de speciaalclub en dat, indien de uitgeleende ram tijdens de uitleenperiode wat mocht overkomen, een vergoeding uitgekeerd zal worden. Tevens zijn alle eigenaren uitgenodigd voor een demonstratie van spermawinning bij konijnen en om meer uitleg over het project te krijgen (Bijlagen A en B).

Voordat begonnen kon worden met spermawinning en spermaverwerking moest eerst ervaring worden opgedaan met spermawinning met behulp van een kunstschede en een voedster en moest een invriesprotocol worden vastgesteld.

#### 3.1 Literatuuronderzoek en keuze invriesprotocol

Winning van genetisch materiaal voor de genenbank gaat vaak hand in hand met onderzoek en methodeontwikkeling gericht op de optimale methode om sperma te winnen, te verdunnen en in te vriezen. Het doel is om na invriezen en ontdooien zo veel mogelijk levende zaadcellen over te houden. Om dit te realiseren moet het sperma met een voor de diersoort geschikte verdunner, invriesmedium (cryoprotectans) en afkoelsnelheid ingevroren worden.

Verschillende buitenlandse onderzoeksgroepen hebben onderzoek naar invriesmedia en invriessnelheden gedaan. De resultaten van het invriezen van konijnensperma blijken wereldwijd nogal variabel. Vicente & Viudes-de-Castro (1996) hebben verschillende concentraties DMSO en verschillende suikers uitgeprobeerd als cryoprotectans (CPA) en verkregen met 1,75 M DMSO en 0,05 M sucrose in Tris-citraat-glucose (TCG) het hoogste percentage levende zaadcellen na ontdooien (44%). Dit werd bevestigd door Rosato & Iaffaldano (2013) die verschillende permeërende CPA's hebben uitgetest (DMA, DMSO, glycerol, propyleen glycol, ethyleen glycol, methanol met verschillende concentraties en in combinatie met de disacchariden sucrose of trehalose). DMA gaf ook een redelijke overleving van de zaadcellen (31%) na ontdooien, maar het bevruchtigingspercentage na inseminatie bleek veel lager vergeleken met DMSO (47,4% vs 79,8%, Iaffaldano et al., 2012). Mocé et al. (2014) hebben het effect van de afkoelsnelheid onderzocht en kwamen tot de conclusie dat wanneer de rietjes 5 cm boven de vloeibare stikstof worden gehouden ( $\approx -54$  °C/min), of bij een gecontroleerde afkoelsnelheid van  $-40$  °C/min, de beste post-thaw motility behaald werd (ongeveer 12%). Bij een hogere of een lagere afkoelsnelheid waren de resultaten slechter. Onderzoekers uit de groepen van Vicente en van Iaffaldano behaalden 30-40% post-thaw motility met vrijwel identieke invriesmedia, maar met verschillende invriesmethoden: 15-30 min bij  $-30$  °C versus 5 cm boven de vloeibare stikstof. Daar staat

tegenover dat andere onderzoekers uit de groep van Vicente (Mocé et al. 2014, Safaa et al., 2012, Viudes-de-Castro et al. 2014) slechts 10-20 % behaalden met 5 cm boven de vloeibare stikstof methode.

Het feit dat verschillende onderzoekers met verschillende invriesmethoden (Vicente en Viudes-de-Castro (1996), laffaldano & Rosato (2013) en Si et al. (2006)) en zelfs met totaal andere invriesmedia (Si et al. (2006), Polgar et al. (2004)) vergelijkbare post-thaw motility verkrijgen, suggereert dat het invriezen van konijnensperma vrij robuust is. Dat onderzoekers uit de groep van Vicente (Mocé et al. 2005, Safaa et al., 2012, Viudes-de-Castro et al. 2014) dat niet kunnen reproduceren, spreekt dit echter weer tegen. Bij dit alles moet echter wel bedacht worden dat in de genoemde onderzoeken alleen sperma met minimaal 70% motiliteit vóór het invriezen werd gebruikt. De motiliteit van het verse sperma van de rassen van Nederlandse zeldzame rassen varieerde tussen de 10 en 80%.

Op basis van de literatuur en na persoonlijke communicatie met Nicolaia laffaldano is besloten de methode van laffaldano te volgen als basisprotocol (Protocol A in Bijlage D). Daarnaast is het effect van verschillende invriessnelheden en invriesmedia bekeken (voor de resultaten, zie hoofdstuk 7.1). Protocol A kan als volgt worden samengevat (voor meer details zie Bijlage D). Het sperma direct 1:1 verdunnen met verdunner 1 (zonder CPA). Vervolgens minimaal 1 uur bij 25 °C (waterbad) bewaren, gevolgd door langzaam (90 min) afkoelen naar 5 °C. Dan doorverdunnen met medium met CPA (verdunner 2) tot 160 miljoen zaadcellen/ml en in invriesrietjes laden. 45 minuten na het toevoegen van verdunner 2 invriezen (5 cm boven de vloeibare stikstof in een “geprimeerde” tempex doos).

## 3.2 Huisvesting en verzorging van de dieren

De konijnen zijn op Stadsboerderij “Presikhaaf” in Arnhem gehuisvest (afbeelding 1). Er waren geen veterinaire beperkingen om konijnen op één locatie samen te brengen. De dieren zijn verzorgd door een dierversorgster van de Stadsboerderij. De konijnen kregen ad lib rammenkorrel (Victoria mengvoeders). Rammenkorrel bevat meer vitaminen en mineralen en minder energie. Op voedstervoer worden rammen moddervet. Eénmalig tijdens het verblijf is door een dierenarts bloed getapt uit een pootvene. Dit bloed is opgeslagen in de vriezer voor eventueel later onderzoek.



*Afbeelding 1. Huisvesting van de konijnen.*



### 3.3 Wining van ejaculaat sperma

Bij konijnen is sperma vrij eenvoudig te winnen met een kunstschede en een voedster. De kunstschede is dubbelwandig, is gevuld met water en moet 55 tot 60 °C zijn. Op de kunstschede wordt een opvangbuisje bevestigd waarin het sperma opgevangen wordt (afbeelding 2). Door de kunstschede onder de vulva van de voedster te houden en de voedster voor de ram te houden zal de ram de voedster bespringen en in de kunstschede ejaculeren (afbeelding 3). Een ram produceert gemiddeld 0,5 ml sperma per keer. Op deze manier is van elke ram 3 keer per week sperma gewonnen. In onderstaande afbeeldingen is de kunstschede en de praktijk van spermawinning te zien.



*Afbeelding 2. Kunstschede met opvangbuis*



*Afbeelding 3. Het winnen van sperma*

### 3.4 Wining van epididymaal sperma

Bij sommige diersoorten (hengsten, bokken, schapenrammen) is de hoeveelheid sperma in de bijbal (epididymis) relatief hoog. Dit betekent dat op een efficiënte manier, door castratie of doden van de donor, éénmalig een relatief grote hoeveelheid sperma gewonnen kan worden. Het was onbekend of dit ook bij konijnen een optie is. Daarom is deze manier van spermawinning getest op twee rammen die niet meer terug naar de eigenaar hoefden.

Om sperma uit de epididymis te kunnen isoleren werd de ram geëthanaseerd met euthanasiemiddel (T61), is de bijbal van de teelbal geïsoleerd en in een petrischaal gedaan in een druppel verdunner (verdunner 1, zie protocol A). Met een scalpelmessje werd de epididymis in stukjes gesneden zodat het sperma eruit vloeide. De vrijkomende spermacellen worden direct in de verdunner opgenomen. Nadat de stukjes weefsel verwijderd zijn werd het sperma ingevroren op dezelfde wijze als met geëjaculeerd sperma (protocol A).

Bij de eerste ram (Thrianta) kon na het verwijderen van de testikels bijna geen epididymis worden gevonden. Wel was de zaadleider duidelijk zichtbaar. Slechts een klein aantal zaadcellen kon worden geïsoleerd. De zaadcellen zagen er qua vorm goed uit, maar slechts 50% was motiel. Vanwege de lage opbrengst is dit sperma niet ingevroren.

Bij de tweede ram (Hulstlander) was wel een duidelijke epididymis te zien. De vele kanaaltjes in de epididymis waren goed te zien en ook de zaadleider was duidelijk zichtbaar. Bij deze ram konden redelijk veel spermacellen (schatting uit beide ballen samen: ca 15 rietjes met elk 20 miljoen zaadcellen) worden geïsoleerd, met een goede kwaliteit (> 85% motiel). Vergeleken met andere diersoorten is dit echter een matige opbrengst.



## 4. Resultaten

### 4.1 Resultaten onderzoek invriesprotocol

Op basis van literatuur is het basisprotocol vastgesteld voor het invriezen van konijnensperma (Protocol A). Voor aanvang van de spermawinperiode is proefgedraaid met deze invriesmethode om de methode in de vingers te krijgen.

Daarnaast zijn andere invriesmedia en invriessnelheden getest. Tijdens de eerste pilot zijn 4 invriesmedia uitgetest: Rosato met eidooier, Rosato zonder eidooier (het gepubliceerde medium (Rosato & Iaffaldano, 2013) is zonder eidooier), ESE (invriesmedium voor paardensperma) en bokkenmedium. Bokkenmedium bevat dezelfde stoffen (tris, citraat, glucose) als het Rosato medium, maar in andere concentraties, ESE heeft een totaal andere samenstelling. Het bokkenmedium en ESE bevatten normaliter glycerol (of methylformamide + glycerol) als CPA (cryoprotectants), maar omdat glycerol volgens de literatuur in konijnen een contraceptieve werking heeft, en om de media onderling goed te kunnen vergelijken is in alle media DMSO als CPA gebruikt.

Van 6 rammen is sperma gevangen en in 4 porties verdeeld, 1:4 verdund met medium zonder CPA en vervolgens langzaam koelen naar 5 °C. Vervolgens is medium met CPA (1:1) toegevoegd en het sperma in 0,25 ml rietjes geladen. 45 minuten na het toevoegen van de CPA zijn de rietjes ingevroren: 8 min op een 5 cm dik vlot van piepschuim dat op vloeibare stikstof drijft. De resultaten zijn in Tabel 3 weergegeven.

**Tabel 3.** *Percentage motiliteit na invriezen en ontdooien met 4 invries media.*

Medium	Gemiddelde motiliteit na invriezen	Range motiliteit na invriezen
Rosato met eidooier	11,5	10-15%
Rosato zonder eidooier	11,0	5-20%
ESE	13,0	5-25%
Bokkenmedium	14,5	10-20%

De resultaten vielen tegen ten opzichte van de gepubliceerde resultaten van Iaffaldano, die 30-40% overleving behaalde. Na overleg met Iaffaldano is besloten een 2<sup>e</sup> pilot te doen, dit keer met een iets lagere concentratie DMSO (5 versus 8%, zonder eidooier) en bij -70 °C en -100°C (protocol C en D met de zogenaamde Zuidbergbak (ZBB), omdat een vlot piepschuim niet handig is wanneer grote aantallen rietjes ingevroren moeten worden). Protocol C (ZBB bij -70 °C) geeft een afkoelsnelheid van 40-50 °C/min en protocol D ongeveer 100 °C/min. De verwachting was dat een hoge afkoelsnelheid (100 °C/min) bij een lage DMSO concentratie (5%) een beter resultaat geeft. Als controle is ook het Rosato medium met 8% DMSO en eidooier meegenomen. Verder is er op dezelfde manier gewerkt als tijdens de 1<sup>e</sup> pilot, behalve dat na het vullen van de rietjes direct is ingevroren (geen holding van 45 min). De resultaten nu waren echter veel slechter als bij de 1<sup>e</sup> pilot: bij alle media 1-5% overleving, al scoorde -100 °C net iets hoger als de -70 °C. Het Rosato medium met 8% DMSO en eidooier gaf de beste resultaten.

Daarna zijn verschillende invriessnelheden getest (3, 5 en 7 cm boven de stikstof en in de ZBB bij -60, -70 en -100 °C). Het invriezen 5 cm boven de stikstof gaf hierbij het beste resultaat, maar wanneer grote aantallen rietjes in de tempex doos met stikstof gebracht werden bleek de temperatuur te veel omhoog te schieten. Al met al lijkt er bij het invriezen een aantal oncontroleerbare of zelfs onbekende factoren een rol te spelen waardoor de post-thaw motility schommelde tussen de 5 en 30%. Toch lijken de resultaten van de pilot richting een lage cooling rate te wijzen.

Bij de 3<sup>e</sup> pilot zijn 5 invriessnelheden met elkaar vergeleken (Tabel 4): op een vlot van 3, 5 en 7 cm boven de vloeibare N<sub>2</sub>, de ZBB bij -100 °C, en met een geprogrammeerd invriesapparaat ("Cunifreeze": met -3 °C/min naar -8 °C, dan met -47 °C/min naar -100 °C en met -20 °C/min naar -140 °C; zie Bijlage D protocol G). Er is ingevroren

met 3 verschillende invriesmedia: 1) Rosato met 8% DMSO met eidooier, 2) Rosato met 8% DMSO zonder eidooier en 3) Rosato met 10% DMSO met eidooier. De werkwijze was zoals beschreven voor de 1<sup>e</sup> pilot. Er is tijdens deze pilot in 2 batches ingevroren, en het vreemde was dat de 2<sup>e</sup> batch veel betere overleving gaf dan de eerste.

**Tabel 4.** *Percentage motiliteit na invriezen en ontdooien met 3 invriesmedia en 5 invriessnelheden.*

	1 <sup>e</sup> batch			2 <sup>e</sup> batch		
	8% - ei	8% + ei	10% + ei	8% - ei	8% + ei	10% + ei
3 cm vlot	2,0	3,5	2	nd	0,5	nd
5 cm vlot	6,8	5,7	5	nd	16,7	nd
7 cm vlot	2,0	3,3	3,5	nd	12,5	nd
ZBB -100	1,8	2,8	1,5	nd	13,3	nd
Cunifreeze	1,0	4,5	5	nd	14,2	nd

nd = niet gedaan omdat er te weinig sperma was, Cunifreeze = geprogrammeerd invriesapparaat

De eindconclusie van de pilots is dat het Rosato medium met 8% DMSO + eidooier het beste medium lijkt te zijn en dat 5 cm boven de vloeibare stikstof de beste overleving geeft. Met grotere hoeveelheden is het praktisch gezien lastig om met een vlot te werken. Daarom is een constructie bedacht waarbij een metalen spreidrek 5 cm boven de vloeibare stikstof geplaatst kon worden. Deze constructie is gebruikt en is onderdeel van protocol A (Bijlage D).

Protocol A is het meest gebruikt en gaf keer op keer de beste resultaten (Tabel 5). Protocol B was een variant van protocol A, hier werd het spreidrek vooraf in de tempex doos met vloeibare stikstof geplaatst. Zodra de temperatuur -120 °C was (5 cm boven de vloeibare stikstof) werden de rietjes op het rek gelegd. Dit is in feite exact de methode die laffaldano gebruikte, maar gaf een duidelijk lagere overleving.

Bij de protocollen C, D, E en F werden de rietjes bij 5 °C op het spreidrek gelegd en vervolgens op verschillende manieren ingevroren (ZBB -70 °C en -60 °C en IceCube waarbij met een koelsnelheid van respectievelijk -10 °C/min en -50 °C/min ingevroren werd).

**Tabel 5.** *Invloed van de verschillende invriesmethoden op de overleving. Protocollen in Bijlage D.*

Protocol	Datum	Aantal dieren waarvan een rietje ontdood is	% motiliteit vers	% motiliteit na ontdooien
A	19/5	12	57	20
	23/5	9	70	21
	26/5	4	71	14
	4/6	6	74	8
	6/6	6	67	19
	10/6	3	80	7
B	19/5	11	47	9
	28/5	5	71	13
	2/6	7	54	5
C	21/5	5	71	7
D	23/5	4	69	11
E	26/5	4	71	11
F	26/5	4	71	13

## 4.2 Resultaten spermawinning

Voor het invriezen is de concentratie en de motiliteit van het sperma bepaald. In Bijlage E staat de gemiddelde motiliteit per dier. Na invriezen is de motiliteit steekproefsgewijs bepaald. Bij 200 sprongen is sperma gevangen, bij 4 sprongen zaten er geen spermacellen in de opgevangen vloeistof, 6 maal was er urine in het buisje gekomen (wat het sperma onbruikbaar maakte) en 155 pogingen hebben niets opgeleverd.

Gemiddeld produceerden de rammen 0,5 ml sperma met gemiddeld 346 miljoen spermacellen/ml en ruim 60% motiliteit. In de praktijk wordt met vers sperma gewerkt en worden 30 voedsters geïnsemineerd met 1 ejaculaat. Gemiddeld bevat een ejaculaat 75-400 miljoen zaadcellen. Het aantal zaadcellen per ejaculaat is vergelijkbaar voor de zeldzame rassen in dit project, de motiliteit van het versie sperma ligt lager dan bij de rammen in de bedrijfsmatige houderij die op spermakwaliteit geselecteerd worden. In Tabel 6 zijn de gemiddelde producties per ras gegeven. Steekproefsgewijs is van 64 rietjes de motiliteit na invriezen bepaald. Deze varieerde van 1 tot 30% motiliteit, het gemiddelde was 13%.

**Tabel 6.** *Overzicht aantal sprongen, volume ejaculaat, aantal zaadcellen per sprong en motiliteit per ras.*

Ras	n/totaal*	Volume sperma (ml)	Concentratie (miljoen/ml)	% Motiliteit vers sperma	Invries-protocol**	% Motiliteit na ontdooien***
Beige	36/40	0,5	492	58	A, B	12 (10)
Deilenaar	15/35	0,8	424	57	A, B	14 (6)
Eksterkonijn	21/45	0,7	253	68	A, B, C	15 (11)
Gouwenaar	32/43	0,6	408	61	A, B, C	14 (14)
Havana	27/45	0,4	254	62	A, B	10 (3)
Hulstlander	25/45	0,4	304	61	A, B	8 (2)
Sallander	9/60	0,6	269	65	A, B	7 (3)
Thrianta	34/50	0,6	393	57	A, B, C	10 (14)

\* n/totaal = het aantal geslaagde pogingen om sperma te vangen op het totaal aantal pogingen

\*\* zie de protocollen in Bijlage D

\*\*\* tussen haakjes het aantal ontdooide rietjes

Er is in twee series van twee weken sperma gevangen. In de eerste serie waren er 34 rammen en in de tweede serie 39 rammen. Vier rammen zijn de hele periode gebleven, vandaar dat het totaal 69 rammen is. Er is 3 keer per week sperma gewonnen, in totaal 5 keer per serie. In Tabel 7 staat het aantal geproduceerde rietjes per ras. In Bijlage E staan het aantal geproduceerde rietjes per dier.

**Tabel 7.** *Aantal rietjes in de genenbank per ras.*

Ras	Aantal rammen	Aantal eigenaren*	Aantal rammen in productie	Aantal rietjes
Beige	8	4	8	313
Deilenaar	7	4	3	212
Eksterkonijn	9	5	8	217
Gouwenaar	9	4	7	321
Havana	9	4	9	207
Hulstlander	9	4	8	183
Sallander	8	3	3	97
Thrianta	10	7	9	347
Totaal	69	28	55	1897

\* Sommige eigenaren hebben meer dan 1 ras in hun bezit.

Niet elke ram heeft geproduceerd. Met name de Sallanders en de Deilenaren bleken lastig te verleiden tot ejaculatie. Voor de Sallanders is een voedster van het eigen ras gebracht, dit gaf verbetering, maar een aantal rammen liet zich niet verleiden. Vier Sallander rammen zijn na de eerste sessie gebleven, zij zijn toen in hokken met zicht op de "afwerkplek" geplaatst. Deze positie had tijdens de eerste sessie een verhoogde activiteit van toen aldaar aanwezige rammen tot gevolg, maar de Sallanders bleven er zeer kalm onder.

De oorspronkelijke doelstelling van 100 rietjes in 5 sprongen kon bij geen enkele ram gerealiseerd worden, het maximum is 74 rietjes. In de oorspronkelijke berekening waren we er van uitgegaan dat we per sprong 10-30 rietjes met 10 miljoen zaadcellen per rietje zouden kunnen realiseren. Omdat uiteindelijk besloten is te vullen met een hogere concentratie zaadcellen (80 miljoen zaadcellen/ml, dat is 20 miljoen/rietje), wordt het aantal gerealiseerde rietjes navenant gehalveerd en zou je op 50 rietjes per ram uitkomen, het gemiddelde bleek 35 rietjes.

In Afbeelding 4 staan de acht meest zeldzame Nederlandse konijnenrassen zoals die in Arnhem geweest zijn.



**Afbeelding 4.** De meest zeldzame Nederlandse rassen (vnr): Eksterkonijn, Deilaar, Beige, Gouwenaar, Hulstlander, Havana, Sallander en Thrianta

## 5. Conclusies en aanbevelingen

Er zijn bijna 1900 rietjes ingevroren, gemiddeld 35 rietjes per dier. Evaluatie van de resultaten na invriezen wijst uit dat het invriesprotocol nog niet optimaal is. Gehoopt was na invriezen en ontdooien een hoger percentage levende zaadcellen over het houden. De resultaten wijken niet veel af van literatuur en ervaringen in het buitenland. Verder onderzoek naar afkoelsnelheid is echter wel gewenst.

Tijdens het evaluatiegesprek met KLN, SZH, Stadsboerderij "Presikhaaf" en CGN op 17 november 2014 is geconcludeerd dat het doel gerealiseerd is. De koudwatervrees is weg en medewerking voor de toekomst is verzekerd. Iedereen toonde zich tevreden. Het project is planmatig opgepakt en kenmerkt zich door goede samenwerking tussen het CGN, de SZH, KLN en Stadsboerderij "Presikhaaf". Door KLN is de planning voortvarend ter hand genomen en de huisvesting en verzorging in Arnhem was prima. De 28 fokkers die dieren aangeleverd hebben waren enthousiast en de demonstratiedag op 30 mei is in goede aarde gevallen. Geconcludeerd werd dat de dierkeuze een goede afspiegeling van de populatie lijkt te zijn met goede rasvertegenwoordigers.

De verzorging werd perfect gevonden, netjes in stro (een paar dieren op zaagsel). Het was voldoende om na twee weken de hokken schoon te maken. Wel is geconstateerd dat de dieren gedurende de twee weken spermawinning in conditie achteruit zijn gegaan. Dit is een logisch gevolg van meer afleiding, veel beweging en minder eten en is ook gebruikelijk na een tentoonstelling. Na het retourneren bij de eigenaar zijn geen beschadigingen aan de dieren gemeld.

Niet elke ram wilde dekken (55 van 69 dieren hebben geproduceerd). Bij de evaluatie werd als advies gegeven elke ram een eigen "dektegel" (tapijttegel) te geven. De verwachting is dat sommige rammen te veel afgeleid zijn door andere geuren. Een ram dekt beter in het eigen hok, dit was technisch niet mogelijk. Voor bloedtappen is tappen uit de pootvene een goede methode, ook als je de poot niet mag scheren. Tijdens het evaluatiegesprek is ook vooruitgekeken naar de toekomst. Er is voorgesteld om eerst het bevruchtend vermogen van het ingevroren sperma te testen voordat opnieuw sperma wordt gewonnen.





## 6. Literatuur

Conservation Planner. <http://www.wageningenur.nl/nl/Expertises-Dienstverlening/Wettelijke-Onderzoekstaken/Centrum-voor-Genetische-Bronnen-Nederland-1/Expertisegebieden/Dierlijke-Genetische-Bronnen/Genenbank.htm>.

Convention on Biological Diversity, 1992. <http://www.cbd.int/>

EFABIS Database. <http://efabis.cgn.wur.nl/>

In vivo conservation of animal genetic resources (FAO, 2013) <http://www.fao.org/docrep/018/i3327e/i3327e00.htm>

Global Plan of Action for Animal Genetic Resources. FAO, 2007. <http://www.fao.org/docrep/010/a1404e/a1404e00.htm>

Iaffaldano, N., M. Di Iorio, M. Pina Rosato. 2012. The cryoprotectant used, its concentration, and the equilibration time are critical for the successful cryopreservation of rabbit sperm: Dimethylacetamide versus dimethylsulfoxide. *Theriogenology* 78, 1381–1389.

Konijnenstandaard (KLN, 2013). <http://www.kleindierliefhebbers.nl/site/stcomm-konijnen/272-publicatie-standaardcommissie-konijnen-2013.html>

Polgár, Z.S., Virág, G.Y., Baranyai, B., Bodó, SZ., Kovács, A., Gócza, E. 2004. Evaluation of effects of cryopreservation on rabbit spermatozoa membranes with Trypan blue-Giemsa staining. *Proceedings - 8th World Rabbit Congress –September 7-10, 2004 – Puebla, Mexico*.

Rosato, M.P., and Iaffaldano, N. 2013. Cryopreservation of rabbit semen: Comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. *Theriogenology* 79, 508-516.

Mocé, E., E. Blanch, A. Talaván and M. P. Viudes de Castro. 2014. Effect of different freezing velocities on the quality and fertilising ability of cryopreserved rabbit spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, [www.publish.csiro.au/journals/rfd](http://www.publish.csiro.au/journals/rfd)

Mocé E., Lavara R. and Vicente J.S. 2005. Influence of the Donor Male on the Fertility of Frozen-Thawed Rabbit Sperm after Artificial Insemination of Females of Different Genotypes. *Reprod Dom Anim* 40, 516–521.

Safaa H.M., Lavara R., Viudes-de-Castro M.P., Elsayed D.A.A., Mehaisen G.M.K., Marco-Jiménez F., Vicente J.S. 2012. Effect of different freezing extenders on semen quality, fertility and prolificacy in two selected lines of rabbit bucks. *Proceedings 10 th World Rabbit Congress – September 3 - 6, 2012– Sharm El - Sheikh –Egypt, 325 – 329*.

Si W., Hildebrandt T.B., Reid C., Krieg R., Ji W., Fassbender M., Hermes R. 2006. The successful double cryopreservation of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) semen in large volume using the directional freezing technique with reduced concentration of cryoprotectant. *Theriogenology*, 65, 788-798.

Taks, Ad en Wilma. *Onze Nederlandse huisdierrassen*. 2010. ISBN/EAN: 978-90-9025493-7.

Vicente, J.S, and Viudes-de-Castro M.P. 1996 A sucrose-DMSO extender for freezing rabbit semen. *Reprod Nutr Dev* 36, 485-492.

Viudes-de-Castro, M.P., E. Mocé, J.S. Vicente, F. Marco-Jiménez and R. Lavara. 2005. In vitro Evaluation of in vivo Fertilizing Ability of Frozen Rabbit Semen. *Reprod Dom Anim* 40, 136–140.

Viudes-de-Castro M.P., Lavara R., Safaa H.M., Marco-Jiménez F., Mehaisen, G.M.K. and Vicente J.S. 2014. Effect of freezing extender composition and male line on semen traits and reproductive performance in rabbits. *Animal*, 8:5 pp 765–770.



## Bijlage A. Uitnodiging fokkers

Postbus 65 | 8200 AB Lelystad



Geachte fokker,

Allereerst willen wij u heel hartelijk danken voor het beschikbaar stellen van 1 of meer zoveel mogelijk onverwante rassen voor spermawinning voor de genenbank.

Het Centrum voor Genetische Bronnen in Nederland van Wageningen UR, de Stichting Zeldzame Huisdierrassen en Kleindier Liefhebbers Nederland willen graag met de Speciaalclubs de unieke genetische diversiteit van de zeldzame Nederlandse konijnenrassen veilig stellen in de genenbank. Het is in het belang van het ras om, naast het verstandig fokken met de huidige populatie, te bewaren wat we nu hebben. Door samen te werken kunnen we sperma in de genenbank opslaan voor de toekomst en de rassen duurzaam behouden.

De spermawinning is gepland in twee series. Jan Renes regelt voor week 21 en 22 het vervoer van de dieren van de fokkers uit Noord en Oost Nederland en voor week 23 en 24 de andere fokkers.

Om te zien wat er met uw konijnen gebeurt, nodigen wij u uit voor een demonstratiebijeenkomst op vrijdag 30 mei op Stadsboerderij "Presikhaaf", Ruitenberglaan 4, 6826 CC Arnhem, telefoon: (026) – 3775464.

We verwelkomen u om 11.00 uur met een kopje koffie. Na korte inleidingen over de opzet van het project krijgt u een demonstratie spermawinning bij konijn met uitleg over de verdere spermaverwerking en kunt u onder de microscoop levende zaadcellen bekijken. Wij sluiten af met een lunch. Daarna kunt u ofwel uw dieren meenemen ofwel uw meegebrachte dieren in de kooien plaatsen. Indien u niet de mogelijkheid heeft om te komen, zullen wij ervoor zorg dragen dat uw dieren op de plek terug komen.

Bij deze brief is de overeenkomst met CGN voor uw konijnen bijgevoegd in tweevoud. Wilt u de tattoo nummers invullen en één getekend exemplaar van deze overeenkomst, samen met uw aanmeldingsformulier, aan ons retourneren? Mochten er nog vragen zijn, dan beantwoorden wij die graag en we hopen u op 30 mei te ontmoeten.

Met vriendelijke groet,

A handwritten signature in black ink that reads 'Rita Hoving'.

Rita Hoving, CGN, 0320-238251 (ook 's avonds)

Namens de CGN collega's en namens Ad Taks, SZH, 076-5971787 / 06-12433335 en Jan Renes, KLN, 0525-652340

Bijlagen:

1. Overeenkomst
2. Aanmeldingsformulier demonstratie dag vrijdag 30 mei 2014
3. Antwoordenvolp (geen postzegel nodig)
4. Brochure CGN



## Bijlage B. Foto's demonstratiedag 30 mei 2014

Hieronder staat een compilatie van foto's van de registratie van de dieren, het fotograferen van de dieren, de presentaties, de demonstratie van spermawinning en de lunch op 30 mei 2014.





## Bijlage C. Planning van de spermawinningsperiode

Winning en opslag van sperma van zeldzame Nederlandse konijnenrassen in de genenbank

Planning		
datum	dag	activiteit
week 20		klaarmaken kooien en tussenschotjes
16-May	vrijdag	16 of 17 mei aanleveren konijnen
17-May	zaterdag	
18-May	zondag	
19-May	maandag	spermawinning A+K
20-May	dinsdag	
21-May	woensdag	spermawinning H+K
22-May	donderdag	
23-May	vrijdag	spermawinning H+A
24-May	zaterdag	
25-May	zondag	
26-May	maandag	spermawinning A+K
27-May	dinsdag	
28-May	woensdag	spermawinning H+K
29-May	donderdag	Hemelvaartsdag
30-May	vrijdag	dierwissel / schoonmaak
31-May	zaterdag	
01-Jun	zondag	
02-Jun	maandag	spermawinning A+K
03-Jun	dinsdag	
04-Jun	woensdag	spermawinning H+K
05-Jun	donderdag	
06-Jun	vrijdag	spermawinning H+A
07-Jun	zaterdag	
08-Jun	zondag	
09-Jun	maandag	Tweede Pinksterdag
10-Jun	dinsdag	spermawinning H+K (of A)
11-Jun	woensdag	
12-Jun	donderdag	spermawinning H+K
13-Jun	vrijdag	dieren retour
14-Jun	zaterdag	dieren retour
		schoonmaak en kooien retour





## Bijlage D. Protocol “Invriezen Konijnensperma”

Op basis van literatuur is een basisprotocol (protocol A laffaldano et al. 2012) vastgesteld, en is een aantal alternatieve protocollen (protocol B tot en met G) geëvalueerd die verschillen van protocol A wat betreft invriessnelheid.

### Protocol A (lage cooling rate in “geprimede” tempex doos)

#### Invriesmedia:

##### **Verdunner 1** (Rosato met eidooier)

250 mmol/L TRIS-hydroxymethylaminomethane, 88 mmol/L citric acid, and 47 mmol/L glucose + 10% eidooier

##### **Verdunner 2** (Rosato met eidooier en 16% DMSO)

250 mmol/L TRIS-hydroxymethylaminomethane, 88 mmol/L citric acid, 47 mmol/L glucose and 100 mM sucrose + 10% eidooier + 16% DMSO

1. Direct na vangen 40 µl onverdund sperma in een epje tbv concentratie bepaling
2. het sperma 1:1 verdunnen met “verdunner 1”
3. Spermamonster bewaren in waterbad bij 25 °C (facsbuis in 15-ml buis met 8.5 ml water zetten).
4. Als het laatste monster verzameld is blijven alle monsters nog 1 uur bij 25 °C staan.
5. Zet de sperma monsters (incl 15-ml buis met 8.5 ml water) 90 min in de koelbox bij 5 °C.
6. In het invries-laboratorium wordt in de koelbank bij 5 °C verder gewerkt.
7. Meet de absorbtie van het onverdunde sperma, vul dit in de dagstaat in, deze berekent hoeveel µl verdunner 1 en 2 nog toegevoegd moet worden om 80 miljoen cellen/ml te krijgen.
8. Voeg verdunner 1 toe zoals berekend door de dagstaat.
9. Voeg verdunner 2 in kleine porties (+/- 4 porties) toe met tussentijds mengen op vortex.
10. Print het berekende aantal 0.25-ml rietjes voor elke ram en laat de rietjes afkoelen naar 5 °C.
11. Vul de rietjes mbv de vulmachine of mbv de multichannel pipet en seal ze.
12. Leg de rietjes op een invriesrek.
13. Plaats een leeg een buizenrek in een tempex doos en vul de tempex doos tot het middelste level van het plastic rekje (geeft 5 cm afstand tussen de rietjes en het stikstof nivo).
14. Hang de digitale thermometer erin, zó dat het uiteinde van de sensor op dezelfde hoogte is als waar de rietjes komen te liggen.
15. 45 min na het toevoegen van verdunner 2 worden de rietjes als volgt ingevroren in een “geprimede” tempex doos op 5 cm boven de vloeibare stikstof.
16. Zodra de temperatuur tot ongeveer -120 °C gedaald is, wordt een leeg metalen spreidrek in de doos geplaatst en zal de temperatuur oplopen.
17. Als de temperatuur tussen de -65 en -70 °C is, haal dan het lege rek eruit en plaats een rek met in te vriezen rietjes in de doos.
18. De temperatuur zal nu eerst stijgen naar ongeveer -35 °C (afhankelijk van hoeveel rietjes op het rek liggen) en gaat daarna weer dalen.
19. Zodra de temperatuur weer ongeveer -70 °C is kunnen de rietjes in de vloeibare stikstof (ca 10 min tijd).

### Protocol B (hogere cooling rate in tempex doos)

1 t/m 14 zie protocol A.

15. Vul een tempex doos tot het middelste level van het plastic rekje (geeft 5 cm afstand tussen de rietjes en het stikstof nivo). Hang de digitale thermometer erin, zó dat het uiteinde van de sensor op dezelfde hoogte is als waar de rietjes komen te liggen.  
Plaats een lege metalen spreidrek in de doos.  
Zodra de temperatuur tot ongeveer -120 °C gedaald is, is hij klaar voor gebruik.
16. 45 min na het toevoegen van verdunner 2 worden de rietjes ingevroren door ze op het metalen rek in de tempexdoos met vloeibare stikstof te leggen.
17. Na 10 minuten kunnen de rietjes de vloeibare stikstof in.

## Protocol C (ZBB -70 °C)

1 t/m 12 zie protocol A.

13. Rek met rietjes 10 min in ZBB bij -70 °C invriezen, daarna in vloeibare N<sub>2</sub>.

## Protocol D (ZBB bij -60 °C)

1 t/m 12 zie protocol A.

13. Rek met rietjes 10 min in ZBB bij -60 °C invriezen, daarna in vloeibare N<sub>2</sub>.

## Protocol E (“IceCube” -10 °C/min, lage cooling rate)

1 t/m 12 zie protocol A.

13. Start temperatuur 5 °C

14. -4 °C/min naar -6 °C

15. -50 °C/min naar -25 °C

16. +49 °C/min naar -10 °C

17. -6 °C/min naar -11 °C

18. -10 °C/min naar -120 °C

19. Rietjes de vloeibare N<sub>2</sub> in.

## Protocol F (“IceCube” -50 °C/min, hoge cooling rate)

1 t/m 12 zie protocol A.

13. Start temperatuur 5 °C

14. -4 °C/min naar -6 °C

15. -50 °C/min naar -25 °C

16. +49 °C/min naar -10 °C

17. -6 °C/min naar -11 °C

18. -50 °C/min naar -120 °C

19. Rietjes de vloeibare N<sub>2</sub> in.

## Protocol G (“IceCube” voor Cunifreezeze protocol)

1 t/m 12 zie protocol A.

13. Start temperatuur 4 °C

14. -3 °C/min naar -8 °C

15. Met -47 °C/min naar -100 °C

16. Met -20 °C/min naar -140 °C

17. Rietjes de vloeibare N<sub>2</sub> in.

## Bijlage E. Aantal ingevroren rietjes per dier

Diernummer	Motiliteit voor invriezen(%)	Aantal rietjes
<b>Beige</b>	<b>58%</b>	<b>313</b>
OWP-447	66	12
2KL-605	62	27
2WP-556	71	57
3KL-502	40	35
3VA-214	18	56
3WP-339	71	61
4HW-103	67	24
9VA-904	66	41
<b>Deilenaar</b>	<b>57%</b>	<b>212</b>
1WE-314	66	74
3WE-333	43	74
3WE-507	61	64
<b>Eksterkonijn</b>	<b>69%</b>	<b>217</b>
2RP-327	78	23
2WE-571	70	27
2WY-502	51	34
3DE-136	60	19
3RP-125	75	16
3WE-547	70	24
3WE-552	80	13
3WY-406	74	61
<b>Gouwenaar</b>	<b>63%</b>	<b>321</b>
1HW-559	66	37
1WP-565	62	27
2VA-904	74	45
3HW-425	60	24
3VA-246	25	61
3VA-451	74	44
3WP-469	73	83
<b>Havana</b>	<b>62%</b>	<b>207</b>
1VA-466	70	9
2PL-4123	66	23
3EE-212	15	12
3OQ-436	70	30
3OQ-526	70	10

3OQ-624	77	28
3PL-4113	67	24
3VA-574	58	36
3VA-624	40	35
<b>Hulstlander</b>	<b>61%</b>	<b>183</b>
3DH-222	51	12
3DH-611	59	4
3HI-707	50	6
3HM-523	63	41
3TW-721	63	20
3WS-407	70	62
3WS-613	73	11
9DH-601	58	27
<b>Sallander</b>	<b>65%</b>	<b>97</b>
1DM-503	63	25
1VG-454	60	23
3DM-607	69	49
<b>Thrianta</b>	<b>57%</b>	<b>347</b>
2AC-605	53	44
2WS-203	71	64
3FX-231	54	23
3HU-310	76	50
3HU-562	55	39
3HU-573	43	36
3HU-701	38	29
3KP-419	67	42
3PK-649	43	20
<b>Gemiddelde motiliteit en totaal aantal ingevroren rietjes</b>	<b>61%</b>	<b>1897</b>



