



Winning en opslag van sperma van zeldzame Nederlandse schapen- en geitenrassen in de genenbank (2001-2012)

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





Winning en opslag van sperma van zeldzame Nederlandse schapen- en geitenrassen in de genenbank (2001-2012)

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

© 2013 Lelystad, 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-03-003-045 Beheer bestaande diercollecties en WOT-03-003-047 Cryoconservering)

Verantwoording foto's voorpagina: CGN en H. Oudhoff van het Fries Melkschapenstamboek

ISSN 1570 - 8616

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 : Edelhertweg 15, 8919 PH Lelystad
: Postbus 65, 8200 AB Lelystad
Tel. : 0320 23 8 251
E-mail : cgn@wur.nl
Internet : www.wageningenUR.nl/cgn

Inhoudsopgave

	pagina
Voorwoord / dankwoord	1
Samenvatting	3
Summary	5
1. Inleiding	7
2. Prioritering van rassen en selectie van dieren voor de genenbank	9
2.1 Status van de zeldzame Nederlandse rassen	9
2.2 Raskeuze	10
2.3 Kern-collectie	10
2.4 Keuze van donoren	11
3. Spermawinning en verwerking	13
3.1 Veterinaire status	13
3.2 Winning van ejaculaat sperma	13
3.3 Winning van epididymaal sperma	14
3.4 Spermaverwerking: verdunnen en invriezen	15
3.5 Bevruchtingsresultaten epididymaal sperma	15
4. Resultaten: sperma in de genenbank	19
4.1 Heideschaaprasen 2001 - 2012	19
4.1.1 Ejaculaat winning 2001 - 2002	19
4.1.2 Epididymaal winning 2002 - 2003	19
4.1.3 Winning epididymaal 2004 - 2012	20
4.2 Nederlandse landgeit 2005 - 2012	21
4.3 Melkschaap 2009 - 2012	21
4.4 Zwartbles schaap 2003 - 2012	22
4.5 Nederlandse Witte en Bonte geit 2012	22
4.6 Blauwe Texelaar 2012	23
5. Totale genenbankcollectie geit en schaap anno 2013	25
6. Evaluatie, conclusies en toekomst	27
7. Literatuur	29
Bijlage I. Secretariaten en contactpersonen per rasvereniging	1 p.

Voorwoord / dankwoord

Het behoud van rassen vraagt om zorgvuldige fokkerijbeslissingen en een verantwoord genetisch management van de populatie. 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 landbouwhuisdieren.

De doelstelling van een genenbank is om door (*ex situ*) 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 of het materiaal uit de genenbank kan worden gebruikt wanneer de genetische diversiteit binnen een ras te beperkt is.

In de periode 2001-2012 heeft het CGN in een aantal acties genetisch materiaal van schapen- en geitenrassen veiliggesteld in de genenbank. De activiteiten zijn uitgevoerd in nauwe samenwerking met de stamboekbestuurders van de betreffende schapen- en geitenrassen. Zonder hun inzet om zoveel mogelijk goede en onverwante rammen en bokken beschikbaar te krijgen voor spermawinning, en niet in de laatste plaats de medewerking van individuele fokkers, zou het voor het CGN niet mogelijk zijn geweest om deze genenbankcollecties tot stand te brengen. Hartelijk dank hiervoor.

Sipke Joost Hiemstra
Clusterleider dierlijke genetische bronnen van CGN

Samenvatting

Populatiebeheer vraagt om zorgvuldige fokkerijbeslissingen en 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 over 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.

In de periode 2001-2012 is in een aantal acties genetisch materiaal van Nederlandse schapen- en geitenrassen opgenomen in de genenbank voor landbouwhuisdieren. In totaal zijn er ruim 34.000 doses rammen- en bokkensperma van 12 rassen opgeslagen in de genenbank.

In dit rapport wordt beschreven welke activiteiten CGN in de periode 2001-2012 heeft ondernomen om genetisch materiaal van schapen- en geitenrassen veilig te stellen in de genenbank. De eerste actie vond plaats in 2001-2002, net na de MKZ crisis, die duidelijk maakte dat er een reëel gevaar is dat een groot deel van de heideschape bij een dergelijke dierziekte kan verdwijnen. Na deze eerste actie is het aantal doses sperma van diverse schapen- en geitenrassen verder uitgebreid in de periode 2003-2012. Naast de heideschaaprasen zijn het Melkschaap, het Zwartbles schaap, het Blauwe Texelaar schaap, de Nederlandse Landgeit, en de Bonte geit en de Witte geit toegevoegd aan de genenbank.

Er is een flinke genenbank collectie aangelegd, nadat eerst spermawinning en invriesprotocollen voor rammen- en bokkensperma zijn vastgesteld. Er is onder andere een kosten-effectieve methode van spermawinning ontwikkeld, door isolatie van epididymaal sperma uit de bijbal na castratie of slacht. Met een inseminatieproef is aangetoond dat epididymaal sperma ook goed bevrucht.

Summary

The main aim of the Dutch gene bank for farm animals is long term conservation of genetic diversity between and within breeds, in order to be able to re-establish a breed in case of calamities. First initiatives to collect semen of rams of Dutch heath sheep started immediately after the Foot and Mouth Disease crisis (FMD) in 2001. The FMD outbreak clearly showed the threats to geographically concentrated, local, endangered breeds in case of diseases and raised awareness about the importance of establishing gene bank collections.

In the period 2001-2012 a number of activities have been undertaken by CGN to safeguard genetic diversity of a number of sheep and goat breeds, starting with five endangered heath sheep breeds. This work was done in close collaboration with the breed societies and breeders of Dutch sheep and goat breeds. Altogether almost 34000 doses of semen of 12 sheep and goat breeds have been stored in the gene bank repository of CGN during the period 2001-2012.

Besides collection of ejaculated semen of rams and bucks, an alternative cost-effective method was developed and implemented, in order to collect semen from the epididymus after castration or slaughter. An insemination experiment showed that insemination of epididymal semen was succesful. In addition, different freezing protocols and media for cryoconservation of semen of rams and bucks were tested.

1. Inleiding

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. Stamboeken en rasverenigingen kunnen genetisch materiaal uit de genenbank in de toekomst weer nodig hebben. Bovendien bevat de genenbank waardevol (historisch) materiaal dat interessant kan zijn voor onderzoeksdoeleinden. 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 en het Global Plan of Action voor dierlijke genetische bronnen van de Wereldvoedselorganisatie van de Verenigde Naties (FAO, 2007).

Met de ontwikkeling en het beheer van de nationale genenbank voor landbouwhuisdieren zorgt CGN voor *ex situ* behoud van rassen en draagt bij aan de instandhouding van de genetische diversiteit binnen rassen. Op twee locaties worden collecties sperma en embryo's opgeslagen in vloeibare stikstof. CGN beheert anno 2013 genenbankcollecties van runderen, varkens, paarden, schapen, geiten, pluimvee, honden en watervogels. Zowel zeldzame rassen als veelgebruikte, commerciële rassen zijn vertegenwoordigd in de genenbank.

De belangrijkste doelstelling van de genenbank voor landbouwhuisdieren is om door opslag van genetisch materiaal alle Nederlandse zeldzame rassen veilig te stellen. Met het beschikbare genenbankmateriaal moet het mogelijk zijn een ras te kunnen reconstrueren wanneer dat nodig of wenselijk is. In geval van nood kan door te kruisen in ruim 6 generaties een ras weer opgebouwd worden. Verder verandert een ras in de tijd door selectie of 'genetic drift'. Om die reden is het verstandig steeds na circa drie generaties de genenbankcollecties aan te vullen met de dan aanwezige genetische variatie.

Een tweede doel van de genenbank is om het fokkerijbedrijfsleven te stimuleren een back-up op te slaan van niet-zeldzame, commerciële populaties in de genenbank. Dit is dan een soort 'brandverzekering' om terug te kunnen grijpen op materiaal uit het verleden. 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.

In dit rapport wordt beschreven welke activiteiten CGN in de periode 2001-2012 heeft ondernomen om genetisch materiaal van schapen- en geitenrassen veilig te stellen in de genenbank. De eerste actie vond plaats in 2001-2002, net na de MKZ crisis, die duidelijk maakte dat er een reëel gevaar is dat een groot deel van de heideschapen bij een dergelijke dierziekte kan verdwijnen. Na de eerste actie is de genenbank verder aangevuld met meerdere rassen en meer doses per ras. Tegelijkertijd zijn verschillende media vergeleken om het optimale protocol voor cryoconservering van rammen- of bokkensperma vast te stellen. Er is bovendien een methode ontwikkeld en geïmplementeerd waarbij sperma uit de testikels van rammen wordt geïsoleerd na castratie of na de slacht (epididymaal sperma). Met een inseminatieproef is onderzocht of epididymaal sperma ook goed bevrucht.

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

Nederland kent een groot aantal van oorsprong Nederlandse schapen- en geitenrassen. De doelstelling van een genenbank is om door opslag van genetisch materiaal een ras veilig te stellen voor de toekomst. Om financiële en praktische redenen worden prioriteiten gesteld en keuzes gemaakt. Allereerst is een afweging gemaakt welke rassen in de genenbank op te nemen, hoeveel donoren te kiezen en welke hoeveelheid sperma gewenst is per donordier.

2.1 Status van de zeldzame Nederlandse rassen

De FAO Guidelines In Vivo Conservation (FAO, 2013) geven aan populaties een risicoclassificatie voor bedreigdheid op basis van het aantal aanwezige vrouwelijke fokdieren en/of inteelttoename binnen een ras of populatie (Tabel 1). Ook wordt een onderscheid gemaakt in voortplantingsvermogen tussen diersoorten, een konijn kan bijvoorbeeld meer en sneller nakomelingen krijgen dan een paard.

Tabel 1. *Indeling risicoclassificatie van rassen (FAO, 2013).*

Risicostatus Bedreigdheid	Voortplantingsvermogen per ouderdier			
	Hoog (veel nakomelingen per vrouwelijk dier) (gevogelte, hond, varken, konijn)		Laag (weinig nakomelingen per vrouwelijk dier) (paard, rund, schaap, geit)	
	Aantal vrouwelijke fokdieren	Inteelt toename per generatie	Aantal vrouwelijke fokdieren	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 schapen- en geitenrassen weergegeven. Meer gegevens over de rassen is te vinden in de rassendatabase EFABIS: <http://efabis.cgn.wur.nl/>.

Tabel 2. *Populatiegrootte en status van de zeldzame Nederlandse schapen- en geitenrassen.*

Schaap	Aantal oien	Aantal oien	Aantal oien	Aantal rammen	Trend	Status
	2002	2007	2012	2012		
Blauwe Texelaar (incl. Dassenkop)	3500	4620	4962	612	Groei	Kwetsbaar
Drents heideschaap	1312	2658	3736	220	Groei	Kwetsbaar
Flevolander	1150	1800	425	19	Krimp	Bedreigd
Kempisch heideschaap	1544	1802	7000	150	Groei	Normaal
Mergelland schaap	600	579	1207	132	Groei	Bedreigd
Nederlands melkschaap (Zeeuws en Fries)	5500	7681	5000	100	Stabiel	Kwetsbaar
Noordhollander	1100	2074	534	60	Krimp	Bedreigd
Schoonebeeker heideschaap	1277	1477	2289	109	Groei	Bedreigd
Swifter	8500	13954	7632	330	Krimp	Normaal
Veluws heideschaap	1400	1400	1262	72	Stabiel	Bedreigd
Zwartbles	2500	2500	1419	158	Krimp	Bedreigd
Geit	Aantal geiten	Aantal geiten	Aantal geiten	Aantal bokken	Trend	Status
	2002	2007	2012	2012		
Nederlandse bonte geit	2000	499	1298	139	Krimp	Bedreigd
Nederlandse landgeit	1600	1923	1858*	393	Stabiel	Bedreigd
Nederlandse Toggenburger geit	3100	500	1039	115	Krimp	Bedreigd
Nederlandse witte geit		1882	1724	236	Stabiel	Bedreigd

**In 2012 zijn slechts 510 landgeiten voor de fok gebruikt, dit is een dalende trend.*

2.2 Raskeuze

De genenbank heeft als doelstelling om genetisch materiaal van alle Nederlandse zeldzame rassen veilig te stellen. De vijf Nederlandse heideschaaprassen behoren tot de meest kwetsbare zeldzame Nederlandse rassen. De MKZ uitbraak in 2001 heeft de risico's die kleine en regionaal gehouden populaties lopen, pijnlijk aan het licht gebracht. Om die reden is in 2001 gestart met spermawinning van zeldzame heideschapen. In de jaren daarna gevolgd door aanvullingen en opname van genetisch materiaal van een groter aantal zeldzame Nederlandse schapen- of geitenrassen in de genenbank.

2.3 Kern-collectie

Het doel van CGN is om van ieder ras ten minste een zogenaamde 'core collectie' ofwel kern-collectie op te slaan in de genenbank. De gehanteerde definitie van het begrip 'core collectie' 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 materiaal (sperma, embryo's of anders) dat in de collectie aanwezig is. Voor het terugfokken is een aantal generaties nodig. In theorie kan een ras gereconstrueerd worden met materiaal van 1 dier. In de praktijk betekent dit echter dat de genetische variatie bijna geheel is verdwenen en dat het ras vervolgens weer gedoemd is uit te sterven. Voor schapen en geiten moet idealiter minimaal 100 doses sperma van goede kwaliteit, van minimaal 25 onverwante donoren worden opgeslagen om een ras terug te kunnen fokken (Conservation Planner, <http://www.wageningenur.nl/nl/Expertises-Dienstverlening/Wettelijke-Onderzoekstaken/Centrum-voor-Genetische-Bronnen-Nederland-1/Expertisegebieden/Dierlijke-Genetische-Bronnen/Genenbank.htm>). Het is belangrijk dat de gekozen donoren zo weinig mogelijk aan elkaar verwant zijn. Wanneer het aantal donoren groter is dan 25, dan kan worden volstaan met minder rietjes per donor. Om praktische redenen wordt bij schapen- en geitenrassen gestreefd naar minstens 50 donoren.

Iedere populatie verandert in de tijd door selectie of 'genetic drift'. Bij een kleine populatie zal de selectie naar verwachting minder scherp zijn, want er zijn niet zo heel veel dieren om uit te kiezen, dus zal de wijziging door selectie ook minder groot zijn. Voor alle rassen is het belangrijk om periodiek, minimaal na ongeveer 3 generaties, de genenbank aan te vullen met nieuw materiaal. Voor een schaap of geit duurt 3 generaties ongeveer een decennium.

2.4 Keuze van donoren

De keuze van de juiste donoren is belangrijk vanwege het doel om zoveel mogelijk genetische variatie binnen het ras veilig te stellen. Bij voorkeur worden de donoren gekozen na analyse van de genetische diversiteit in de populatie (verwantschap in de populatie, aantal gebruikte vaders). Een gedetailleerde analyse is in het verleden o.a. voor de Schoonebeeker (Windig e.a., 2006), Mergellander (Windig e.a., 2007), Nederlandse landgeit (Mucha & Windig, 2006), het Nederlandse melkschaap en de Zwartbles (Windig & Hoving, 2009) gedaan.

Hoewel populatie-analyse een meerwaarde heeft, wordt ook vaak gekozen voor een meer pragmatische weg door de stamboekbestuurders te vragen een aantal, zoveel mogelijk onverwante, beschikbare dieren te verzamelen die goed de diversiteit in de populatie weerspiegelen. De populatiegeneticus geeft de voorkeur aan dieren die in de populatie relatief onverwant / minder ingezet worden voor de fokkerij en de fokkers willen graag als "brandverzekering" een afspiegeling van de best verervende fokdieren in de genenbank opnemen. Beide strategieën worden meegenomen in de uiteindelijke keuzes van donoren. Daarnaast is het belangrijk dat de dieren gezond zijn, voldoen aan de eisen van het stamboek en hebben laten zien dat ze kunnen bevruchten.

De communicatie tussen CGN en de rasorganisaties en fokkers verliep over het algemeen heel goed. Voor elke winningsperiode is contact gelegd met het bestuur van de rasverenigingen om te komen tot afspraken voor spermawinning van rammen en bokken voor de genenbank. De fokkersvereniging van het Drentse heideschaap en de Schoonebeeker heeft de leden opgeroepen om rammen die zij willen afstaan aan te melden. De Fok Advies Commissie heeft daarna beoordeeld of de rammen inderdaad geschikt waren om op te nemen in de genenbank. Deze rammen en de gegevens van de eigenaren zijn aan CGN doorgegeven, waarna het CGN rechtstreeks met de eigenaren afspraken gemaakt heeft voor het ophalen van de rammen voor winning van epididymaal sperma, in tijd aansluitend aan het dekseizoen. Een andere werkwijze werd gevolgd voor de Witte en Bonte bokken en de Zwartbles schapen. Hier werd – gecoördineerd door de rasorganisaties - sperma gevangen op een bedrijf waar 7-10 rammen of bokken bijeen waren gebracht. Daarnaast werden ook nog dieren geleverd voor winning van epididymaal sperma na de slacht. Niet alle aangemelde of aangeleverde dieren bleken geschikt voor de genenbank. Sommige dieren waren te jong of hadden geen goede kwaliteit sperma.

3. Spermawinning en verwerking

Winning van genetisch materiaal voor de genenbank ging hand in hand met onderzoek en methodeontwikkeling gericht op de optimale methode om sperma van rammen en bokken te winnen, te verdunnen en in te vriezen. Voor zowel ram als bok is een zo optimaal mogelijke invriesmethode ontwikkeld. Het doel is om na invriezen en ontdooien zo veel mogelijk zaadcellen te laten overleven. Bovendien is een alternatieve methode voor spermawinning ontwikkeld en geïmplementeerd.

3.1 Veterinaire status

Voor de genenbank is het van belang om sperma van gezonde donoren op te slaan en de risico's op dierziekten uit te sluiten. De EU regelgeving voor spermawincentra van schapen en geiten kan daarvoor als leidraad gebruikt worden, hoewel deze regelgeving in Nederland niet op nationaal niveau is geïmplementeerd.

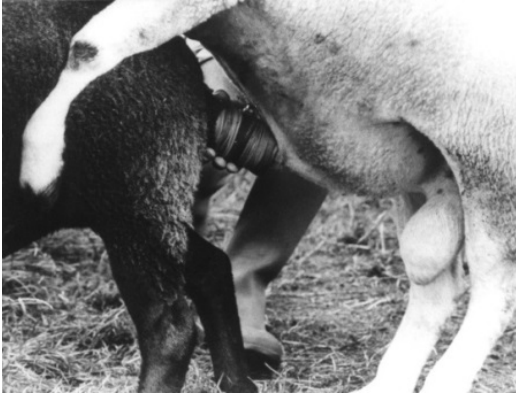
Bij het ophalen van de aangemelde dieren of voorafgaand aan spermawinning op een praktijkbedrijf hoort een klinische gezondheidsinspectie van een donordier. Indien aanwezig is een kopie van het gezondheidscertificaat van de bedrijven gearhiveerd. Bij winning van epididymaal sperma na de slacht wordt de gezondheidstatus van de donoren voor het slachten gecontroleerd door de keuringsdierenarts op de slachterij.

Van alle dieren is een bloedmonster (heparine en serum) genomen. In de periode dat er een verplicht bestrijdingsprogramma voor scrapie was zijn alle rammen gegenotypeerd op scrapiegenotype. In 2001-2002 zijn de bloedmonsters van alle rammen getest op *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, *Brucella abortus* en Zwoegerziekte (Maedi Visna virus). Soms is een MKZ verklaring toegevoegd. In latere jaren is onderzocht op antistoffen tegen *Brucella melitensis* en *Brucella ovis*, Maedi Visna en CAE/CL (Caprine arthritis encephalitis / Caseous lymphadenitis). Het scrapiegenotype werd zoveel mogelijk opgevraagd bij de eigenaar van de rammen. In de periode 2006-2007 zijn de rammen en bokken op blauwtong getest (zowel PCR als serologie), in 2009 zijn de rammen en bokken op Q-koorts antistoffen (serologie) getest. Vanaf 2012 zijn alleen heparine en serum bloedmonsters ingevroren. Er is geen onderzoek uitgevoerd, maar de mogelijkheid is aanwezig om later nog onderzoek uit te voeren op de aanwezige bloedmonsters. Van iedere ram of bok waarvan sperma in de genenbank is opgenomen is duidelijk of en op welke ziekten de donor is onderzocht.

3.2 Winning van ejaculaat sperma

In 2002 is voorafgaand aan het spermavangen een trainingsperiode voor de rammen geweest. Doel hiervan was om de dieren handtam te maken. Dit was belangrijk omdat de betreffende heideschaap rammen uit een kudde kwamen en niet gewend waren aan de hand te dekken. Het wennen hield in dat dieren meerdere keren per week aan een halster geleid werden en op een bronstige ooi moesten springen. Zodra de ram de ooi besprong werd over z'n onderbuik gewreven om het uitschachten te stimuleren. In latere jaren werd alleen ejaculaat sperma verzameld van dieren die gewend waren aan de hand te dekken. Een trainingsperiode vooraf was dan niet nodig.

Na de trainingperiode vond spermawinning plaats door de ram naar een bronstige ooi te leiden en het dier te laten dekken. Op het moment van uitschachten werd de penis met de kom van de hand tegengehouden en in een kunstschede geleid (Afbeelding 1). Na het binnenleiden in de kunstschede dekte de ram hierin af. De binnenvoering van de kunstschede is gevuld met warm water (40-43°C) en wordt via een ventiel op druk gebracht. Er zit glijmiddel op en aan het uiteinde een collectorbuisje. Hieromheen zit een beschermhoes. Na het vangen wordt het sperma 1 op 1 doorverdund met spermaverdunner en geplaatst bij 5 °C. Daarna werd het sperma in een koelbox naar het laboratorium vervoerd.



Afbeelding 1. Spermia vangen met behulp van een kunstschede.

3.3 Winning van epididymaal sperma

Omdat sommige rammen van de heideschaaprassen te 'wild' waren voor ejaculaat spermawinning is het idee geboren om sperma uit de bijbal na de slacht te winnen. Veel rammen worden na één of meerdere jaren dekken immers toch afgevoerd. Bij schapen is de hoeveelheid sperma in de bijbal relatief hoog, meer dan 20 miljard zaadcellen in een volwassen ram. Dit zou betekenen dat ruim 100 inseminatiedoses (200 miljoen zaadcellen per dosis) zouden kunnen worden gewonnen. In de bijbal worden de rijpe zaadcellen opgeslagen.

Begin 2003 is contact opgenomen met de rasverenigingen van het Drentse heideschaap en het Veluwe heideschaap met het verzoek mee te werken aan de winning van epididymaal sperma van rammen na het slachten. De testikels werden per ram verzameld, gecodeerd en op ijs in een koelbox naar het laboratorium vervoerd. Het voordeel is dat de dieren niet in de buurt van een laboratorium gehuisvest hoeven te worden en dat de dieren niet getraind hoeven te worden. Het enige nadeel is dat de dieren gedood of gecastreerd moeten worden en dat rekening gehouden moet worden met transportverordeningen en eventuele vervoersbeperkingen. Afbeelding 2 laat dieren van verschillende rassen zien in de wachtruimte bij de slachterij.



Afbeelding 2. Dieren van verschillende rassen in de wachtruimte bij de slachterij.

De procedure op de slachterij was als volgt. Na de levende keuring kan gestart worden met slachten. Na het verdoven is bij het verbloeden een bloedmonster genomen en na het slachten werden per dier de testikels afgenomen, verpakt en gekoeld naar Lelystad getransporteerd.

CGN heeft een eenvoudig protocol ontwikkeld om het sperma uit de bijbal te isoleren. Op het lab wordt de epididymus gescheiden van de testikel en in een petrischaal met verdunner gedaan (Afbeelding 3). De epididymus wordt fijn gesneden met behulp van een scalpel. De vrijkomende spermacellen worden direct in de verdunner opgenomen. Per epididymus wordt circa 15 ml. verdunner gebruikt. Na filtreren door een metalen filter (200 μm) wordt de concentratie en de motiliteit bepaald. Het reeds verdunde sperma wordt verder verdund tot 400 miljoen zaadcellen/ml.



Afbeelding 3. De testikels bij aankomst in het lab en de wijze van prepareren van de bijbal (epididymus).

Kostentechnisch komt de winning (isolatie) van epididymaal sperma vaak gunstiger uit dan ejaculaatwinning. Bij epididymaal spermawinning kunnen circa 20 miljard zaadcellen verkregen worden tegen circa 6 miljard bij drie ejaculaten/dag. Dit betekent gemiddeld een factor drie hogere opbrengst per ram. Daarnaast kunnen meestal meer dieren per dag verwerkt worden bij winning van epididymaal sperma. Mits goed georganiseerd (voldoende aantallen rammen) zijn de totale winnings- en verwerkingskosten lager bij winning van epididymaal sperma vergeleken met ejaculaten. Kosten voor transport en spermaverwerking zijn voor beide methoden vergelijkbaar.

3.4 Spermaverwerking: verdunnen en invriezen

Om na invriezen en ontdooien zo veel mogelijk zaadcellen te laten overleven, moet het sperma met behulp van een goede verdunner en goede afkoelsnelheid worden ingevroren. Gebruikt werd en wordt Tris-verdunner, deze verdunner bevat eigeel en glycerol als cryoprotectans en is gesteld op pH en osmolariteit. Om tot de meest optimale verdunner voor rammen- en bokkensperma te komen, zijn in 2006 onderzoeken gedaan met modificaties van de Tris-verdunner en daarnaast met enkele andere verdunners. Verdund sperma werd getest op invriesbaarheid van de zaadcellen (motiliteit na invriezen en ontdooien) en de houdbaarheid van de zaadcellen in de verdunners bij 5 °C. De conclusie was om Tris-verdunner als standaard verdunner voor rammen te handhaven. Het commerciële Red Ovine medium gaf vergelijkbare resultaten na ontdooien als de Tris-verdunner, echter geen verbetering. Voor bokkensperma is de verdunner wel aangepast door de concentratie van de chemicaliën in de verdunner te wijzigen en door fructose te vervangen door glucose en de verdunner te centrifugeren op 4500 toeren/ minuut. Tot 2005 is bokkensperma ingevroren met Tris-verdunner en na het onderzoek in 2006 is de aangepaste Tris-goat verdunner gebruikt.

Voor de genenbank wordt sperma verdund tot 400 miljoen zaadcellen/ml en in rietjes van 0,5 ml afgevuld. Een rietje diepvriessperma bevat 200 miljoen spermacellen. De equilibratietijd voor het verdunde sperma, alvorens in te vriezen, bedraagt minimaal 3,5 uren, gerekend vanaf de toevoeging van het eerste verdunningsmedium. De rietjes worden gedurende 10 minuten in een stikstofdampe bij -80 °C ingevroren. De gemiddelde effectieve invriessnelheid is ongeveer 30 °C / minuut. Voor invriezen en na ontdooien wordt de motiliteit van het sperma beoordeeld.

3.5 Bevruchtingsresultaten epididymaal sperma

In een inseminatie-experiment zijn de bevruchtingsresultaten met ingevroren epididymaal en ejaculaat sperma vergeleken. Deze vergelijking is uitgevoerd met twee inseminatiemethoden. Bij vaginale/cervicale inseminatie heeft het diepgevroren sperma moeite de genitaaltractus te passeren om tot bevruchting te komen. Laparoscopische inseminatie ('chirurgische methode') levert veelal betere resultaten op, maar is niet toegestaan in Nederland. Voor het inseminatie-experiment is toestemming gevraagd en gekregen.

In het experiment zijn 4 x 10 gesynchroniseerde Swifter oöien geïnsemineerd (laparoscopisch of cervicaal) met sperma van 4 heideschaaprammen (ejaculaat of epididymaal) (Afbeelding 4). Het sperma was ingevroren in 0,5 ml rietjes met een concentratie van 400 miljoen zaadcellen per ml. Bij laparoscopische inseminatie kan met een kleinere dosis worden volstaan. De bronst van de oöien is gesynchroniseerd met hormoonbehandelingen. De oöien

zijn 12 dagen gesponsd en kregen prostaglandines, HCG en antibiotica rondom de inseminatie toegediend. In Tabel 3 staan de resultaten van dit experiment.



Afbeelding 4. Inbrengen en verwijderen van de spons voor synchronisatie van oöien en vaginale inseminatie.

Tabel 3. Sperma kwaliteit na ontdooien en bevruchtingsresultaten van ingevroren en ontdooid sperma.

	Ejaculaat sperma		Epididymaal sperma	
	%beweeglijk	% levend	% beweeglijk	% levend
	42.0 ± 4.5	48.5 ± 2.1	60 ± 0	62.3 ± 5.6
	Aantal drachten	Aantal lammeren/ooi	Aantal drachten	Aantal lammeren/ooi
Cervicaal	0/11	---	4/10	2.0
Laparoscopisch	6/10	2.3	7/10	3.1



Afbeelding 5. Pas geboren lam uit een Swifter ooi geïnsemineerd met diepgevroren epididymaal sperma van een Veluws heideschaapram.

In deze inseminatieproef zijn geen drachten verkregen van ejaculaat sperma middels cervicale inseminatie. De verklaring hiervoor ligt mogelijk bij het suboptimale moment van insemineren. Het inseminatie-experiment heeft echter wel aangetoond dat het mogelijk is lammeren middels inseminatie met diepgevroren genenbank sperma te verkrijgen en dat inseminatie van epididymaal sperma positieve resultaten oplevert (Woelders e.a., 2004; Woelders e.a., 2005; Woelders e.a., 2012).

In een andere onderzoek (Stutterheim, 2009) is een inseminatieproef uitgevoerd om drie verdunners te testen. Sperma is met behulp van verschillende inseminatietechnieken geïnsemineerd (laparoscopisch, cervicaal en uterien).

Uit de inseminatieresultaten (drachtigheden) bleek het moment van insemineren belangrijker te zijn dan het gebruik van één van de drie verdunners.

Vanaf 2013 wordt onderzoek met een intravaginale inseminatie techniek gestart bij melkschapen (Krohg, 2012).

4. Resultaten: sperma in de genenbank

In dit hoofdstuk worden de resultaten gepresenteerd van de activiteiten die het afgelopen decennium hebben plaatsgevonden om sperma in de genenbank op te slaan. Dit hoofdstuk is ingedeeld in 6 onderdelen:

- 1 Heideschaaprasen 2001 - 2012
- 2 Nederlandse landgeit 2005 - 2012
- 3 Melkschaap 2009 - 2012
- 4 Zwartbles schaap 2003 - 2012
- 5 Nederlandse Witte en Bonte geit 2012
- 6 Blauwe Texelaar 2012

4.1 Heideschaaprasen 2001 - 2012

4.1.1 Ejaculaat winning 2001 - 2002

Naar aanleiding van de MKZ crisis in 2001 is in opdracht van het Ministerie van LNV sperma gewonnen van rammen van 5 zeldzame schapenrassen. Het doel van het project was om de genetische variatie van deze bijzondere rassen veilig te stellen in de genenbank. Daartoe is in samenwerking met de Stichting Zeldzame Huisdierrassen en de fokkers van deze rassen in de periode tussen 1 november 2001 en 1 mei 2002 door de Faculteit Diergeneeskunde (Universiteit Utrecht) en ID-Lelystad (Wageningen UR) sperma verzameld (Tabel 4). In totaal zijn van 55 rammen van de verschillende heideschaaprasen 7000 doses ingevroren (De Drent niet). Van het Mergellandschaap, het Kempische heideschaap en de Schoonebeeker is van meer dan 12 rammen per ras sperma opgeslagen (Hiemstra e.a., 2002).

Tabel 4. Gewonnen ejaculaat sperma van 4 heideschaaprasen 2001-2002.

Ras	Aantal donoren	Aantal rietjes	Jaar
Kempisch heideschaap	15	2344	2001
Mergelland schaap	21	2650	2001
Schoonebeeker heideschaap	10	1096	2001
Veluwe heideschaap	7	717	2001

4.1.2 Epididymaal winning 2002 - 2003

Van het Veluwe heideschaap en het Drentse heideschaap is in de bovengenoemde periode 2001-2002 nauwelijks gelukt om sperma te verzamelen, omdat de dieren wild waren en niet of nauwelijks aan de hand wilden dekken. Dit was de reden om een onderzoek te starten naar de winning van epididymaal sperma.

De resultaten van spermawinning uit de epididymis begin 2003 waren boven verwachting goed. In Tabel 5 is het aantal gewonnen doses sperma per ram weergegeven. Een deel van de op de slachterij aangeleverde rammen bleek niet geschikt vanwege de te jonge leeftijd van de rammen. Omdat jonge rammen vaak nog niet seksueel actief zijn, worden in de epididymis van deze rammen niet of nauwelijks spermacellen gevonden.

Tabel 5. Gewonnen epididymaal sperma van 2 heideschaaprasen.

Ras	Aantal donoren	Aantal rietjes	Jaar
Drents heideschaap	10	128	2002
Drents heideschaap	25	2764	2003
Veluws heideschaap	9	636	2003

4.1.3 Winning epididymaal 2004 - 2012

In 2004 zijn schapenstamboeken van kleine/zeldzame Nederlandse schapenrassen opnieuw benaderd met het aanbod om (aanvullend) epididymaal sperma te winnen en op te slaan in de genenbank. Deze schapenstamboeken hadden in die periode in het kader van het scrapie-bestrijdingsprogramma een 'uitzonderingspositie' gekregen omdat uitvoering van het bestrijdingsprogramma soms onacceptabel grote risico's opleverde voor de inteelttoename binnen het betreffende ras. Opslag van de genetische diversiteit binnen het ras (ongeacht het scrapie-genotype) in de genenbank werd in dat kader als een zinvolle actie gezien. Gedurende een aantal jaren is vervolgens de genenbankcollectie aangevuld met epididymaal sperma van de vijf zeldzame heideschaaprasen (zie Tabel 6).



Afbeelding 6. Het ophalen van Mergellandrammen in Limburg in 2012.

Tabel 6. Ingevroren rietjes epididymaal sperma per ras per jaar.

Ras	Aantal donoren	Aantal rietjes	Jaar
Mergelland schaap	4	388	2004
Drents heideschaap	5	189	2005
Veluws heideschaap	18	2437	2007
Drents heideschaap	13	1088	2008
Schoonebeeker heideschaap	7	722	2008
Drents heideschaap	5	581	2009
Schoonebeeker heideschaap	8	1087	2009
Kempische heideschaap	15	2639	2009
Mergelland schaap	13	1126	2012
Drents heideschaap	11	920	2012
Schoonebeeker heideschaap	8	1033	2012

In een aantal gevallen bleek de kwaliteit van het sperma na invriezen qua motiliteit niet te voldoen aan de CGN kwaliteitsnormen. Toch is er voor gekozen om ook de doses van slechtere kwaliteit (voorlopig) op te slaan en de kwaliteit van het sperma goed vast te leggen. Op dat moment is de arbeid toch al verricht en misschien is het in de

toekomst wel mogelijk om met nieuwe (nu nog onbekende) technieken een bevruchting tot stand te brengen, en het betreffende sperma kan ook worden gebruikt voor DNA onderzoek.

4.2 Nederlandse landgeit 2005 - 2012

Volgend op de winning van sperma van heideschaaprasen is prioriteit gegeven aan winning van sperma van de Nederlandse landgeit. In 2005 zijn de bokken geslacht en zijn 2200 rietjes sperma opgeslagen in de genenbank.

In 2006 is een populatie analyse voor de Nederlandse landgeit uitgevoerd. Op basis van de analyses (Mucha & Windig, 2006) zijn bokken aangewezen waarvan opslag van sperma in de genenbank zinvol werd geacht. Deze bokken bleken echter op dat moment niet beschikbaar voor de slacht en winning van epididymaal sperma. Wel zijn vervolgens in 2008-2009 10 bokken een aantal weken bij elkaar gehaald op een locatie in de buurt van Lelystad om frequent ejaculaat sperma te winnen (Afbeelding 7). Van 7 dieren is dat gelukt, de overige waren steriel of wilden niet dekken. Na de dekperiode zijn alle bokken weer terug gegaan naar de eigenaren. Deze actie heeft meer tijd gekost dan wanneer bijballen op een slachthuis verzameld worden, daarom gaat de voorkeur van CGN uit naar epididymaal spermawinning, doch in overleg kunnen altijd andere oplossingen gevonden worden. In Tabel 7 staan de resultaten van de spermawinning weergegeven.



Afbeelding 7. Winning van ejaculaat sperma van landgeitbokken.

Tabel 7. Gewonnen sperma van Nederlandse landgeitbokken (ejaculaat en epididymaal) in de periode 2005-2009.

	Aantal dieren	Aantal rietjes	Jaar
Landgeit epididymaal	17	2198	2005
Landgeit ejaculaat	7	1692	2008 - 2009
Landgeit epididymaal	9	722	2012

4.3 Melkschaap 2009 - 2012

De eerste actie voor het Melkschaap vond in 2009 plaats. Winning van sperma volgde op een populatie-analyse (Windig & Hoving, 2009) en werd mogelijk gemaakt door medefinanciering vanuit het Europese project Heritage Sheep Breeds (European Commission, 2013). Heritage Sheep Breeds (HSBs) werden gedefinieerd als genetisch onderscheidende, geografisch gespreide lokale schapenrassen die zich aan de omgeving hebben aangepast. Naast het opstellen en uniformeren van protocollen voor cryoconservering van genetisch materiaal van schapen bood het project de mogelijkheid om sperma te winnen van Nederlandse schapenrassen (Woelders en Kaal, 2008; De Haas, 2010; De Haas e.a. 2010). In het kader van dit project zijn zo'n 1500 rietjes melkschaap ingevroren en opgeslagen in de genenbank (Tabel 8).

Tabel 8. Gewonnen sperma van melkschapen in 2009 (ejaculaat en epididymaal).

	Aantal dieren	Aantal rietjes	Jaar
Ejaculaat:			
Melkschaap	30	1366	2009
Epididymaal:			
Melkschaap	2	220	2012

4.4 Zwartbles schaap 2003 - 2012

Voor het Zwartbles schaap zijn in Nederland twee rasverenigingen. Afgelopen decennium is sperma van dieren van beide organisaties opgenomen in de genenbank (zowel ejaculaat als epididymaal sperma), startend in 2003. Na een aantal 'ad hoc' acties is in oktober 2012 tijdens de ledenvergadering van het Nederlands Zwartbles Schapenstamboek afgesproken dat het heel zinvol zou zijn om als een soort 'brandverzekering' sperma in de genenbank beschikbaar te hebben. Daarbij werd het van belang geacht dat de genenbankcollectie een goede afspiegeling is van de populatie en dat de kwaliteit van de rammen in de genenbank goed moet zijn. Afgesproken is om periodiek van de nieuwe generaties rammen sperma voor de genenbank te verzamelen (rammen bij elkaar brengen op 1 locatie). In Tabel 9 staan de resultaten.

Tabel 9. Gewonnen Zwartbles sperma (epididymaal en ejaculaat).

	Aantal dieren	Aantal rietjes	Jaar
Ejaculaat:			
Zwartbles	7	168	2003
	11	830	2012
Epididymaal:			
Zwartbles	1	616	2005
	4	294	2009
	1	374	2010

4.5 Nederlandse Witte en Bonte geit 2012

Voortschrijdend inzicht heeft tot de conclusie geleid dat ook de Nederlandse Witte geit, Bonte geit en Toggenburger als Nederlandse rassen kunnen worden beschouwd, omdat ze al lange tijd in Nederland met een eigen fokdoel zijn gefokt (minstens 40 jaar en 6 generaties). In dat kader wordt het ook zinvol geacht om sperma van deze rassen in de genenbank op te slaan (De Vries, 2012). Na afstemming met de rasorganisaties is een aantal keer ejaculaat sperma gevangen op praktijkbedrijven, waar meerdere bokken aanwezig waren. Ook is na afloop van het dekseizoen 2012 op 6 slachtdagen in de periode november 2012 - januari 2013 een aantal bokken geslacht en zijn de testikels verzameld voor winning van epididymaal sperma op het laboratorium in Lelystad. In Tabel 10 staan de resultaten, de Toggenburger is nog niet gerealiseerd.

Tabel 10. Ingevroren rietjes sperma van de Bonte geit en de Witte geit.

Ras	Aantal eigenaren	Aantal dieren	Aantal rietjes
Bonte geit epididymaal	1	1	64
Bonte geit ejaculaat	1	7	200
Witte geit epididymaal	3	4	456
Witte geit ejaculaat	2	7	221

4.6 Blauwe Texelaar 2012

De Texelaar is een Nederlands ras en wereldwijd één van de meest vóórkomende schapenrassen. Het is geen zeldzaam ras, maar het ras kent wel een aantal unieke (kleur)varianten. Eén variant is de Blauwe Texelaar waarvan de populatie vrij klein is, en waarvoor een zelfstandig stamboek bestaat. CGN heeft contact opgenomen met het stamboek met de vraag om medewerking bij de opslag van genetisch materiaal van de Blauwe Texelaar. In Tabel 11 staan de resultaten voor het gewonnen epididymaal sperma van Blauwe Texelaar.

Tabel 11. Ingevroren rietjes epididymaal sperma voor de Blauwe Texelaar.

Ras	Aantal eigenaren	Aantal dieren	Aantal rietjes
Blauwe Texelaar	6	8	801

Afbeelding 8 illustreert de variatie in rastype (lengte, breedte en karkasgewicht) tussen de verschillende schapen- en geitenrassen. Van links naar rechts hangen de karkassen van een Landgeitbok (28 kg), een Melkschaap (30 kg), een Mergellander (39 kg), twee Blauwe Texelaars (56 en 44 kg) en nog een Melkschaap (55 kg). Op Afbeelding 8 is mooi te zien dat de Texelaarrammen veel korter en breder gebouwd zijn dan de andere rammen. De meest rechtste Melkschapenram is in gewicht vergelijkbaar met de zwaarste van deze twee Texelaars. Het gemiddelde geslacht gewicht van de 60 rammen en bokken die in 2012 en 2013 geslacht zijn was 30 kg. Het warm geslacht gewicht van de zwaarste ram (een Zwartbles) was 61 kg en het lichtste en het jongste (landgeit)bokje woog 9 kg.



Afbeelding 8. Een bok en 5 rammen geslacht op een rij. Landgeit, Melkschaap, Mergellander, Texelaar, Texelaar en Melkschaap.

5. Totale genenbankcollectie geit en schaap anno 2013

In totaal zijn er anno 2013 6000 rietjes van 58 bokken van 4 rassen en 27700 rietjes van 275 rammen van 8 rassen in de genenbank opgeslagen. Met in 2013 ondernomen actie zijn de collecties uitgebreid met 7000 doses (25% uitbreiding). Dit betreft een uitbreiding van collecties, maar ook een toevoeging van van rassen die nog niet in de genenbank opgenomen waren (Witte geit, Bonte geit, Blauwe Texelaar). In de database van de genenbank is de informatie per dier terug te vinden: <http://www.genebankdata.cgn.wur.nl/>. In Tabel 12 staat een overzicht van de actuele hoeveelheid sperma per ras.

Tabel 12. Overzicht actuele hoeveelheid sperma per ras.

Ras	Aantal donoren	Gemiddeld aantal rietjes per donor	Min – max aantal per donor	Totaal aantal doses	Laatste productie datum
Melkgeit	6	34		202	12-9-2012
Bonte geit	8	60		480	2013
Landgeit	33	139,8	54 – 364	4612	16-1-2013
Witte geit	11	61,5	3 – 180	677	28-12-2012
Totaal	58			5971	

Ras	Aantal donoren	Gemiddeld aantal rietjes per donor	Min – max aantal per donor	Totaal aantal doses	Laatste productie datum
Blauwe Texelaar	8	100	46 – 187	801	16-1-2013
Drents heideschaap	71	81	4 – 220	5714	16-1-2013
Kempisch heideschaap	31	163	23 – 254	5048	4-3-2009
Melkschaap	33	50	1 – 198	1640	17-12-2012
Mergelland schaap	38	110	22 – 196	4164	17-12-2012
Schoonebeeker heideschaap	33	119	2 – 228	3938	9-1-2013
Veluwe heideschaap	34	112	1 – 429	3790	19-11-2007
Zwartbles	28	93,6	5 – 616	2620	12-12-2012
Totaal	276			27715	

6. Evaluatie, conclusies en toekomst

In de periode 2001-2012 heeft het CGN in een aantal acties genetisch materiaal van schapen- en geitenrassen veilig gesteld in de genenbank. De activiteiten zijn in nauwe samenwerking met de stamboekbestuurders van de betreffende schapen- en geitenrassen uitgevoerd. Zonder hun inzet om zoveel mogelijk goede en onverwante rassen en bokken beschikbaar te krijgen voor spermawinning, en niet in de laatste plaats de medewerking van individuele fokkers zou het niet mogelijk geweest zijn om deze genenbankcollecties tot stand te brengen.

Er is onderzoek gedaan naar het optimale medium om sperma van rassen en bokken in te vriezen. Naast ejaculaat sperma is in 2003 een succesvol protocol voor het winnen en invriezen van sperma uit de bijbal (epididymus) van rassen en bokken ontwikkeld. Het is een goed kosteneffectief alternatief om sperma te winnen, in ieder geval ook in die situaties waarin dieren niet gewend zijn om aan de hand te dekken. Het nadeel is dat het dier hiervoor moet worden gedood of gecastreerd. Deze methode is de afgelopen jaren regelmatig toegepast. Met behulp van een inseminatieproef is aangetoond dat goede bevruchtingsresultaten met epididymaal sperma verkregen kunnen worden.

Samenvattend kan geconcludeerd worden dat er inmiddels een flinke hoeveelheid sperma in de genenbank is opgeslagen. De aantallen rietjes voor de benodigde omvang van een 'core collectie' zijn voor de Landgeit, Kempisch Heideschaap en Drents Heideschaap in principe gerealiseerd, maar met name voor het Melkschaap, de Blauwe Texelaar, de Witte geit en de Bonte geit is er zeker nog geen 'core collectie' gerealiseerd. Voor alle rassen geldt dat het wenselijk is om na een aantal generaties sperma in te vriezen om de veranderingen in de populatie vast te leggen.

Voor een aantal andere unieke Nederlandse rassen is het ook wenselijk om genetisch materiaal in de genenbank veilig te stellen (de Swifter, Flevolander, Noordhollander en Toggenburger). De Texelaar is Nederlands grootste schapenras en niet direct kwetsbaar, maar een 'brandverzekering' is voor dit ras ook nuttig en met name de speciale (kleur)varianten zouden moeten worden veiliggesteld, zoals de Blauwe Texelaar of de Dassenkop.

7. Literatuur

- European Commission, 2013.
Preserving genetic resources in agriculture. Achievements of 17 projects of the Community Programma 2006-2011. http://ec.europa.eu/agriculture/genetic-resources/publications/brochure-2013_en.pdf
- FAO, 2007.
Global plan of action for animal genetic resources and the interlaken declaration. food and agriculture organization of the United Nations (FAO). Rome, Italy 2007
; <http://www.fao.org/docrep/010/a1404e/a1404e00.htm>
- FAO, 2013.
In vivo conservation of animal genetic resources. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome 2013 <http://www.fao.org/docrep/018/i3327e/i3327e00.htm>
- Haas, Y. de, H. Sulkers, K. Zuidberg, H. Woelders & S.J. Hiemstra. 2010.
Report 'Collection and storage of semen of heritage sheep breeds in five European countries. (Wageningen UR Livestock Research).
- Haas, Yvette de, 2010.
Hoe kunnen we ons erfgoed aan schapenrassen behouden. <http://edepot.wur.nl/172187> en <http://www.heritagesheep.eu/index.htm>.
- Hiemstra, S.J., A.H. Visscher, K. Peterson, H. Woelders, B. Colenbrander & H.F. Crossen, 2002.
Conservering genetisch materiaal van een vijftal Nederlandse zeldzame schapenrassen. Rapport 2228. Rapport aan opdrachtgever.
- Krohg, A., 2012.
Inseminatie van schapen -intravaginale techniek door dierenarts en schapenhouder Are Krohg. <http://documents.plant.wur.nl/cgn/seminars/workshop2012/Presentatie.pdf>.
- Mucha, Sebastian & Jack J. Windig, 2006.
Management of genetic diversity in the Dutch Landrace goat. http://documents.plant.wur.nl/cgn/seminars/Symposium21122006/Sebastian_%20Mucha.pdf. 2006
- Stutterheim, L., 2009.
De invloed van verschillende invriesmedia op de resultaten van niet-invasieve KI bij schapen.
- Vries, Frank de, 2012.
Niet de geit is zeldzaam, maar de houder. <http://edepot.wur.nl/199323>. 2012.
- Windig, Jack J. & Rita Hoving, 2009.
Selectie tegen gevoeligheid voor scrapie met behoud van genetische variatie. Rapport 247. <http://edepot.wur.nl/8911>.
- Windig, J.J., H. Meuleman & L. Kaal, 2007.
Selection for scrapie resistance and simultaneous restriction of inbreeding in the rare sheep breed 'Mergellander'. Preventive Veterinary Medicine 78, 2007.
- Windig, Jack J., Herwin Eding, Lucia Kaal & Sipke Joost Hiemstra, 2006.
Inteelt en genetische diversiteit in het Schoonebeeker schaap. Case study genetisch management in een kleine populatie met sterke selectiedruk. http://documents.plant.wur.nl/cgn/literature/reports/schoonebeekers_2006.pdf
- Woelders, H., J. Windig, S.J. Hiemstra, 2012.
How Developments in Cryobiology, Reproductive Technologies and Conservation Genomics Could Shape Gene Banking Strategies for (Farm) Animals. Reproduction in Domestic Animals. 25 JUL 2012.
- Woelders, H. & L. Kaal, 2008.
Survey of Organisation, Actual Stocks, and Procedures of Ex situ Conservation of Heritage Sheep Breeds. Animal Sciences Group, Report 153. Animal Sciences Group, AB Lelystad, The Netherlands. <http://edepot.wur.nl/121062>.
- Woelders, H., C.A. Zuidberg, H. Sulkers & S.J. Hiemstra, 2004.
Preservation of genetic diversity of farm animals; gene-banking of germplasm. 20th Scientific Meeting of the

European Embryo Transfer Association (Association, Européene de Transfert Embryonnaire, AETE). Lyon, France. pp. 86–94.

Woelders, H., C.A. Zuidberg, H. Sulkers, M. Pieterse, K. Peterson & S.J. Hiemstra, 2005.

Cryopreservation and insemination of ejaculated and epididymal semen from Dutch rare sheep breeds.. In: Van der Honing Y (ed.), 56th Annual Meeting of the European Association for Animal Production. Vol. 11. EAAP, Uppsala, Sweden, p. 282.

Bijlage I.

Secretariaten en contactpersonen per rasvereniging

Ras	Contact 2012
<i>Schaap</i>	
Stamboek Blauwe Texelaars	Secretariaat: jcdewildt@kpnmail.nl; Ruud Kaasenbrood: rjkaasenbrood@planet.nl
Nederlandse Fokkersvereniging het Drentse Heideschaap en Schoonebeeker	Secretariaat: ingeborg@blackdream.nl; Gijsbert Six: gijsbert@gcsix.nl; Rob Brummel: robbrummel@hetnet.nl
Vereniging Stamboek Het Kempische Heideschaap	Secretariaat: info@schaapskuddeliempde.nl; Sjraar van Beek: info@wassum.nl
Oos Mergelland Sjaop (O.M.S.)	Secretariaat: secretaris@mergellandschaap.nl; Marius Vermaas: Voorzitter@mergellandschaap.nl
Nederlands melkschaap (Zeeuws en Fries)	Secretariaten Fries en Zeeuws: hiskekuiken@gmail.com; Heesters@hccnet.nl; Henk Oudhoff: hjoudhoff@hotmail.com
Veluws heideschaap stamboek	Gerrit Pastink: gerrit.pastink@landschapoverijssel.nl; Anita Wichers, Schaapskudde Lemelerberg: A.Wichers@kpnplanet.nl
Zwartbles stamboeken	Secretariaten: Gert Blaauw: secretaris.nzs@hetnet.nl; Annemarie Lahaye: zwartbles-fokkersgroep stamboekadministratie@kpnmail.nl
<i>Geit</i>	
Fokcie Nederlandse bonte geit	Tijd. Secretaris: Jan Poppelaars: janpoppelaars@hetnet.nl
Landelijke Fokkersclub Nederlandse Landgeiten (LFNL)	Secretariaat: cremers-de.achtersch@planet.nl; J.F. Tigchelaar: tigchelaar@dierenarts.nl
Fokcie Nederlandse Toggenburger geit	Secretariaat: Marielle Schenk: fokgroep toggenburger land.fokg.togg@zonnet.nl; Doede en Heleen de Jong: Jong278@zonnet.nl
Fokcie Nederlandse witte geit	Waarnemend secretaris: bierhofs@xs4all.nl; Durk van der Zee: zeedw@hetnet.nl
NOG	Engel Kupers: eennkupers@hetnet.nl; Theo van der Meer: th.vandermeer@home.nl

