

Effecten van *Phytophthora* spp.- besmetting op de zaadkieming van groot zeegras (*Zostera marina*) Implicaties voor zeegrasherstel

In opdracht van Natuurmonumenten en Rijkswaterstaat
Juli 2015

Laura L. Govers, *Radboud Universiteit*
Johan P. Meffert, *NVWA Wageningen*
Patricia C. J. van Rijswick, *NVWA Wageningen*
Willem Man in 't Veld, *NVWA Wageningen*
Jannes H. T. Heusinkveld, *the Fieldwork Company*
Marieke M. van Katwijk, *Radboud Universiteit*
Tjeerd J. Bouma, *NIOZ Yerseke*
Tjisse van der Heide, *Radboud Universiteit*

Effecten van *Phytophthora* spp.-
besmetting op de zaadkieming van groot
zeegras (*Zostera marina*)

Radboud Universiteit
2015

In opdracht van Natuurmonumenten en Rijkswaterstaat

Laura L. Govers, *Radboud Universiteit*

Johan P. Meffert, *NVWA Wageningen*

Patricia C. J. van Rijswijk, *NVWA Wageningen*

Willem Man in 't Veld, *NVWA Wageningen*

Jannes H. T. Heusinkveld, *The Fieldwork Company*

Marieke M. van Katwijk, *Radboud Universiteit*

Tjeerd J. Bouma, *NIOZ Yerseke*

Tjisse van der Heide, *Radboud Universiteit*

1. Samenvatting

Enkele jaren geleden zijn twee soorten *Phytophthora* (*Phytophthora gemini* en *Phytophthora indundata*) ontdekt in zaden van groot zeegras (*Zostera marina*). De meeste soorten uit de *Phytophthora*-familie zijn pathogeen, maar over de effecten van *Phytophthora* op groot zeegras (*Z. marina*) is nog niets bekend. Zaden uit Sylt (Duitsland), die gebruikt zijn voor zeegrasherstel in de Nederlandse Waddenzee, bleken besmet en leken verminderd kiemkrachtig. Omdat alle Nederlandse zeegrasherstelprojecten in de Waddenzee volledig afhankelijk zijn van een goede kiemkracht van de zaden, zijn de mogelijke effecten van *Phytophthora* in interactie met potentieel belangrijke sturende omgevingsfactoren (sedimenttype, wintertemperatuur, transporttemperatuur) onderzocht in een experiment. Vóór aanvang van het experiment bleek 99% van alle zaden besmet met *Phytophthora* (*Phytophthora gemini* en/of *Halophytophthora* spp), maar besmetting had nog geen effect op de kiemkracht in dit stadium. Aan het einde van het experiment was nog 34% besmet, maar besmette zaden bleken nu wel bijna 6x minder kiemkrachtig dan niet-besmette zaden (4 vs. 23% kieming). *Phytophthora*-besmetting bleek te worden beïnvloed door wintertemperatuur en sedimenttype. *Phytophthora* deed het beter in zandig vergeleken met (zuurstofloos) slibbig sediment en beter bij koude dan warme wintertemperaturen. Behandeling met ethanol om besmetting te beperken bleek niet effectief. Wanneer de statistisch significante verliesposten in een model worden doorgerekend blijkt dat gekoeld transport in combinatie met een milde winter de hoogste zaadopbrengst geeft. Wanneer er echter een methode gevonden zou worden om *Phytophthora* uit te schakelen, kan de zaadopbrengst met gemiddeld 42% worden verbeterd. Verder moet er, naast gekoeld transport, in dat geval op zandig sediment worden uitgezaaid om de opbrengst te maximaliseren (Fig. 14). Verder onderzoek naar methodes om *Phytophthora*-besmetting te reduceren kan de opbrengst voor het zeegrasherstelproject dus sterk verbeteren. Daarnaast is het van groot belang om ook resterende verliesposten met een grote onzekerheid goed kwantificeren om zodoende de kansen van toekomstige zeegrasherstelmaatregelen te maximaliseren.

Inhoud

1. Samenvatting	2
2. Inleiding	4
2.1 Achtergrond.....	4
2.2 Vraagstelling.....	5
3. Methodes	6
3.1 Collectie van zeegraszaden	7
3.2 Voorbehandeling zaden	7
3.3 Experimentele opzet	9
3.4 Fysische en Chemische analyses	11
3.5 <i>Phytophthora</i> -analyses	12
3.6 Statistiek.....	13
3.7 Rekenmodel opbrengst	13
3.8 Validatie van het model	15
4. Resultaten	15
4.1 Voorbehandeling	15
4.2 Omgevingscondities: sediment	17
4.2 Incubatie.....	18
4.2.1 Zaadoverleving.....	18
4.2.2 <i>Phytophthora</i> -besmetting	20
4.2.3 Zaadkieming.....	21
4.4 Rekenmodel zaadopbrengst kg ⁻¹	22
5. Conclusies & Implicaties voor zeegrasherstel	23
5.1 Effecten van <i>Phytophthora</i> -besmetting op de zaadkieming	23
5.2 Invloed van omgevingsfactoren op <i>Phytophthora</i> -besmetting en zaadkieming ..	24
5.3 Maatregelen om <i>Phytophthora</i> -besmetting te beperken	24
5.4 Implicaties voor zeegrasherstel.....	25
5.5 Vergelijking met schattingen rapport voorstudie	26
6. Aanbevelingen en vervolgstappen	27
7. Referenties	31
APPENDIX: statistische resultaten	32
I. Voorbehandeling	32
II. Sedimenteigenschappen.....	33
III. Incubatie.....	34
IV. Rekenmodel.....	36

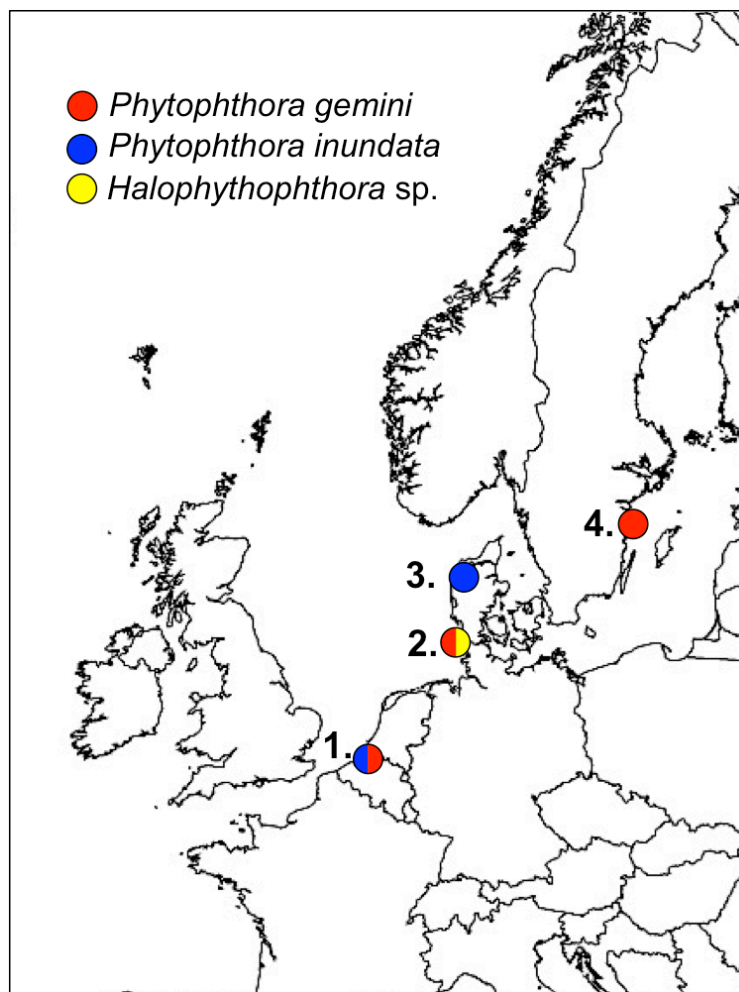
2. Inleiding

2.1 Achtergrond

Phytophthora is een familie van zogenaamde ‘waterschimmels’ (oomyceten) die bij planten ernstige ziekteverschijnselen kan veroorzaken. Besmetting door verschillende *Phytophthora*-soorten veroorzaakt jaarlijks ernstige economische schade aan landbouwgewassen en natuurlijke ecosystemen¹. Naar schatting zijn er meer dan 125 verschillende *Phytophthora*-soorten beschreven, waarvan sommigen slechts één specifieke waardplant, en andere meerdere waardplanten hebben. De meest bekende *Phytophthora*-soort is *Phytophthora infestans*, die in Ierland in de 19^e eeuw een grootschalige aardappelziekte veroorzaakte, waardoor er een ernstige hongersnood ontstond (1845-1849) waar miljoenen mensen aan zijn overleden². Een recentere ecologische ramp als gevolg van een invasieve *Phytophthora*-soort, vindt momenteel plaats in California (VS), waar *Phytophthora ramorum* massale sterfte veroorzaakt onder eiken (*Quercus* en *Lithocarpus*)^{3,4}. Recentelijk zijn er voor het eerst ook twee *Phytophthora*-soorten ontdekt in groot zeegras (*Zostera marina*)⁵. Dit zeegras was afkomstig uit de Zeeuwse Delta (Grevelingen), en besmet met *Phytophthora inundata* en *Phytophthora gemini*, een nieuw ontdekte *Phytophthora*-soort. Inmiddels is de aanwezigheid van *Phytophthora* in *Zostera marina* planten en zaad aangetoond op verschillende locaties⁶ (Fig. 1), zelfs aan de andere kant van de Atlantische Oceaan (Chesapeake Bay, VS, persoonlijke ongepubliceerde resultaten, een nieuwe soort verwant aan *Phytophthora gemini*). Ook is *Phytophthora* gevonden op de zaden van groot zeegras planten uit Sylt, Duitsland, waar het donormateriaal van de recente zeegrasrestauratieprojecten in de Nederlandse Waddenzee vandaan komt. Verder bleken zaden die in 2014 zijn uitgezaaid in respectievelijk het Grevelingenmeer en “De Bol” op Texel besmet te zijn met *Phytophthora* en in het geheel niet meer te kiemen, wat een belangrijke aanzet was voor dit onderzoeksproject.

2.2 Vraagstelling

Aangezien de aanwezigheid van *Phytophthora* in zeegras pas recentelijk is ontdekt⁵, is er momenteel nog niets bekend over de mogelijke effecten ervan op zeegras. Dit is zorgwekkend omdat *Phytophthora*'s in vrijwel alle planten waarmee ze geassocieerd zijn ernstige ziekteverschijnselen veroorzaken. Vooral omdat zowel huidige als toekomstige zeegrasrestauratieprojecten in de Nederlandse Waddenzee volledig afhankelijk zijn van een succesvolle kieming en overleving van zeegras. In het kader van toekomstige zeegrasherstelwerkzaamheden (via uitzaaien) is het daarom urgent om te achterhalen: (1) wat de effecten zijn van *Phytophthora*-besmetting op de kieming van groot zeegras, (2) welke omgevingsfactoren (sedimenttype,



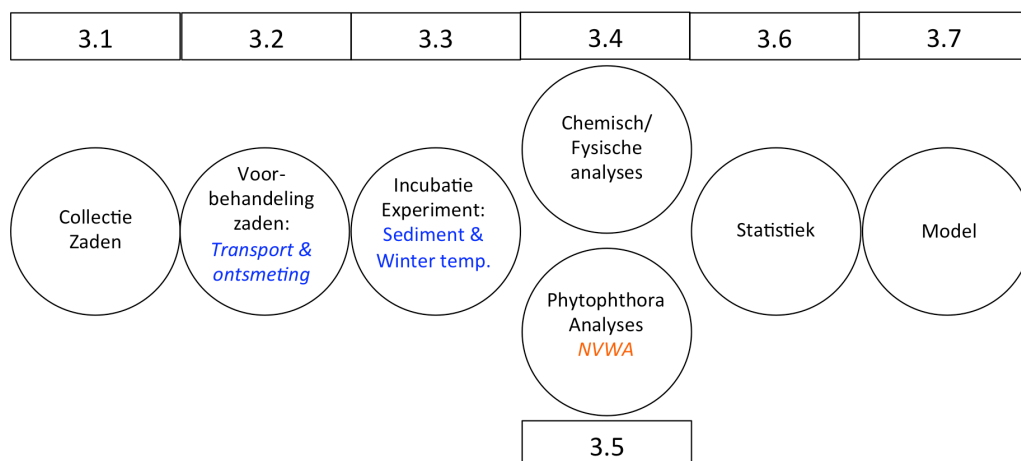
Figuur 1 Voorkomen van *Phytophthora*-soorten in Noord Europa; 1) Grevelingenmeer, Nederland, 2) Sylt, Duitsland, 3) Limfjord, Denemarken, 4) Lindholm, Zweden. Verschillende *Phytophthora*-soorten zijn aangegeven met kleuren. Meerdere kleuren op één locatie duidt op het voorkomen van twee of meerdere *Phytophthora*-soorten.

wintertemperatuur, transporttemperatuur) dit beïnvloeden, (3) wat de mogelijke gevolgen zijn voor het zeegrasherstel in de zin van verliesposten het optimaliseren van de opbrengst, en (4) of er maatregelen te treffen zijn om eventuele gevolgen van *Phytophthora*-besmetting te beperken.

3. Methodes

Om de eerder genoemde vragen te beantwoorden (1.2) is een experiment uitgevoerd (I). Als vervolgstap (II) zal nog veldmonitoring worden uitgevoerd.

In Figuur 2 zijn de verschillende methodische stappen van dit project weergegeven en in de volgende paragrafen worden deze methodes in detail uiteengezet (op wetenschappelijke wijze). De eerste stap was het verzamelen van zeegras-zaadmateriaal op Sylt, de tweede stap was het transport en de voorbehandeling van de zaden. Het incubatie (overwintering) experiment vormde de derde stap in het geheel, waarna als 4^e en 5^e stap zowel fysisch/chemische, als *Phytophthora*-analyses zijn uitgevoerd. Vervolgens (stap 6) zijn de resultaten statistisch getest en op basis van de uiteindelijke resultaten hebben we in de laatste stap (7), een rekenmodel opgesteld.



Figuur 2 Alle componenten van het *Phytophthora*-onderzoek dat in dit rapport wordt beschreven. De nummering geeft de paragraaf aan waarin de betreffende component van het onderzoeksproject wordt beschreven.

3.1 Collectie van zeegraszaden

De zaden die gebruikt zijn in het '*Phytophthora*'-experiment zijn verzameld op Sylt, op 13 september 2014, tijdens de tweede zeegraszaad-verzamelronde van het zeegrasherstelproject van 2014 (Fig. 3). Vrijwilligers van de Waddenvereniging hebben in dat weekend meer dan 200 kg zaadstengels van groot zeegras (*Zostera marina*) verzameld in het gemengd zeegrasveld (*Zostera noltii* + *Zostera marina*) bij Puan Klent op Sylt, Duitsland (54,799 °N, 8,296 °E). Ongeveer 6 kg zaadstengels van deze oogst is gebruikt ten behoeve van het *Phytophthora*-experiment.

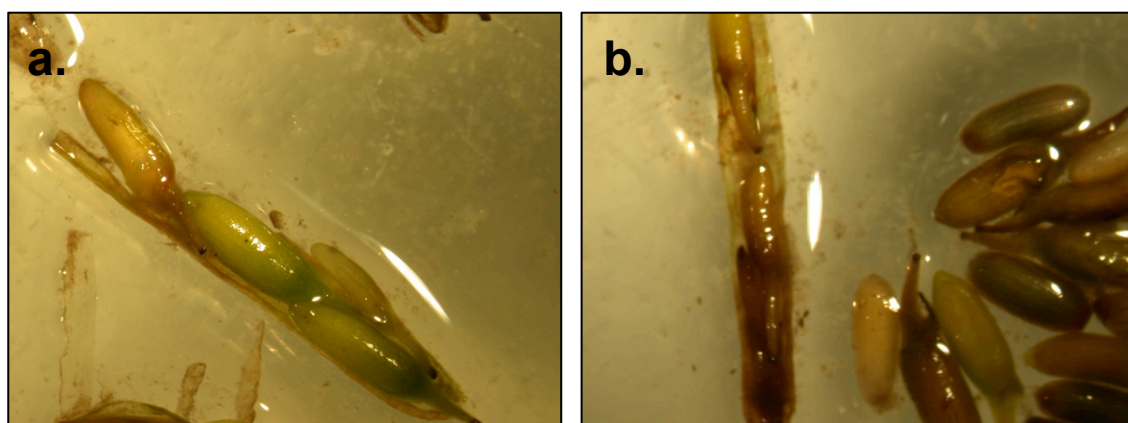


Figuur 3 Vrijwilligers van de Waddenvereniging verzamelen zaadstengels van groot zeegras (*Zostera marina*) in een zeegrasveld op Sylt, Duitsland. (13 september 2014)

3.2 Voorbehandeling zaden

Dit zeegrasmateriaal is, samen met de rest van het materiaal, vervoerd naar Nederland bij omgevingstemperatuur (dus niet gekoeld) op de dag nadat het materiaal is verzameld. Vervolgens is het zaadmateriaal verder

getransporteerd naar Nijmegen (ongekoeld, <24 uur), waar de helft (3 kg) gedurende 10 dagen gekoeld (4°C) en de andere helft bij omgevingstemperatuur (~20°C) is bewaard. Deze 10 dagen is een iets langere termijn dan welke in werkelijkheid in het restauratieproject is toegepast (2-6 dagen). Het zee gras is in deze periode bewaard in open kratjes, zodat er geen zuurstofloze omstandigheden zouden ontstaan, en dagelijks nat gespreid met een 20‰ zeezoutoplossing (Tropic Marin ©). Na 10 dagen zijn alle zaadstengels uitgezocht en daarbij zijn alle zaden verwijderd uit de stengels (waarbij de zaden uit de twee verschillende behandelingen apart zijn gehouden). Deze zaden zijn vervolgens allemaal onder de binoculair bekeken, waarbij alleen op het oog fitte en stevige zaden zijn geselecteerd voor het experiment (Fig. 4a+b).



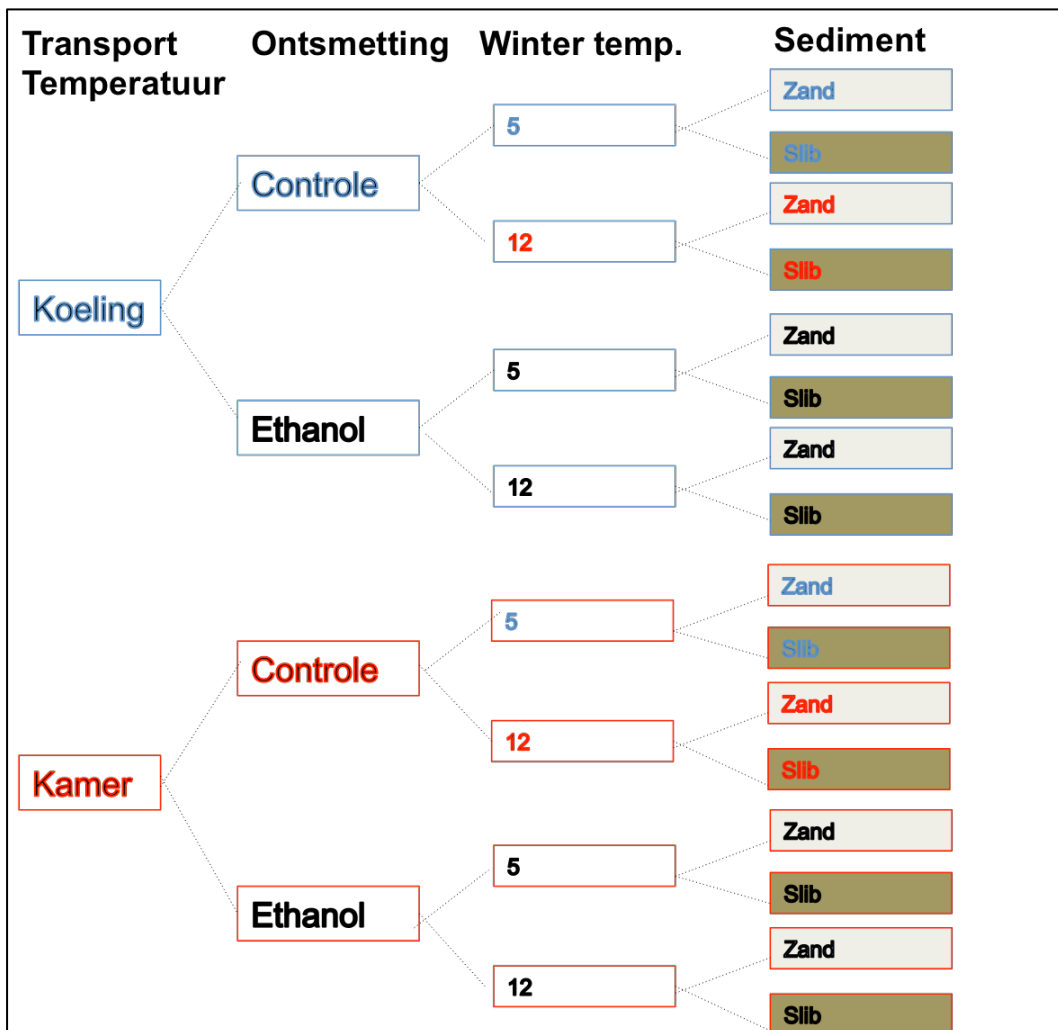
Figuur 4 Zeegraszaden in een stukje zaadstengel (a), en (b) de selectie van de meest stevige en rijpe zaden voor het *Phytophthora*-experiment onder de binoculair

Als vervolgstap in de voorbehandeling zijn per bewaartemperatuur-behandeling 160 zaden ontsmet (dus 2 x 160), door ze gedurende 2 minuten in een 70% oplossing van ethanol en gesteriliseerd zeewater te weken⁷ (naar Hanssen en van Katwijk, 2010). Deze ontsmette zaden zijn vervolgens nog slechts met een in ethanoloplossing (96%) ontsmette pincet aangeraakt.

Per voorbehandeling (4 in totaal; transporttemperatuur 4/20°C en ethanol ontsmet/controle) zijn 4 x 10 zaden individueel verpakt in epjes met een zeewaterverzadigd watje en vervolgens 1,5 maand in de koeling bewaard om vervolgens de kiemkracht van de zaden na de voorbehandeling te testen in het *Phytophthora*-lab van de Nederlandse Voedsel en Waren Autoriteit (NVWA).

3.3 Experimentele opzet

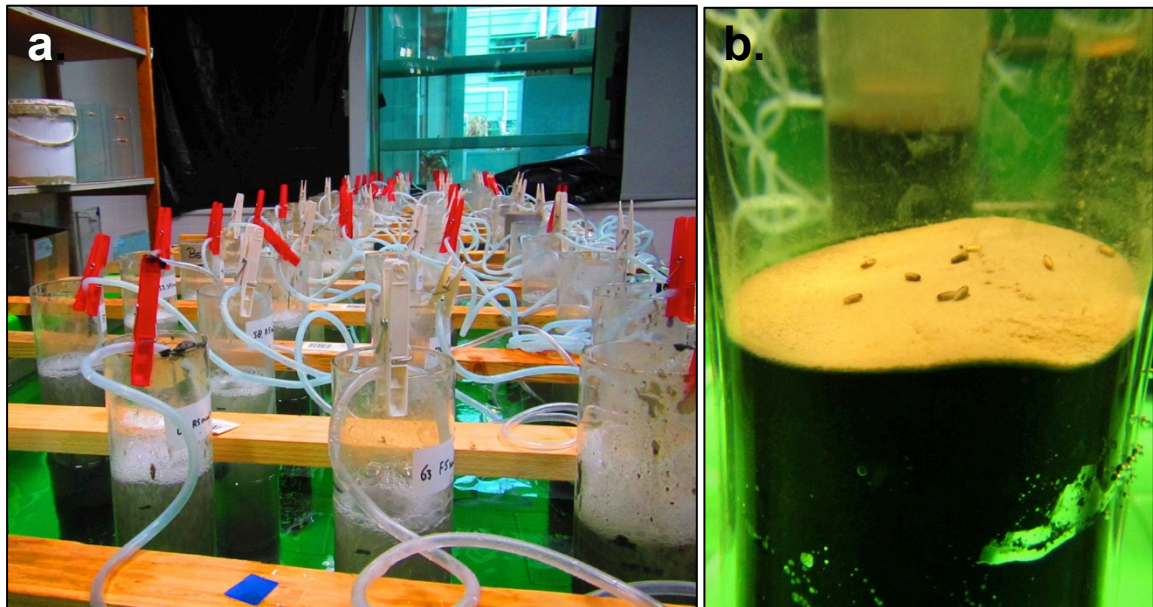
In het experiment zijn naast de voorbehandelingen (transporttemperatuur en ontsmetting met ethanol) ook de effecten van winter-omgevingscondities op *Phytophthora*-besmetting interessant; namelijk de wintertemperatuur (koude vs. warme winter) en lokale sedimentcondities (zand vs. slib). Voor het experiment zijn al deze condities (transporttemperatuur, ontsmetting met ethanol, wintertemperatuur en sedimenttype) volledig gekruist (full-factorial), resulterend in 16 verschillende behandelingen. Per behandeling zijn vier replica's aangehouden, met in elke replica 10 zaden. De opzet is weergegeven in Fig. 5.



Figuur 5 Opzet van het *Phytophthora*-experiment met de volledig gekruiste behandelingen, resulterend in 16 verschillende behandelingen.

Sediment voor de verschillende sedimentbehandeling was afkomstig van twee van de vier uitzaailocaties van 2014: Vlakte van Kerke, Texel (zand) en Uithuizerwad (slib). Het sediment is na het verzamelen direct getransporteerd en gezeefd over een 1 mm zeef in het lab om benthos >1 mm uit het sediment te verwijderen. In het gebruikte sediment is bij eerdere analyses (zomer 2014) geen *Phytophthora* aangetroffen dus we gaan er vanuit dat het sediment vrij was van *Phytophthora*.

De incubatieproef is vervolgens uitgevoerd in 50 cm hoge, ronde glazen buizen (Fig. 6a), met een diameter van 6 cm. In deze buizen is een laag sediment van 20 cm aangebracht, met daarop een laag artificieel zeewater van 25 cm, met een saliniteit van gemiddeld 27‰. Door middel van pompjes met bruissteentjes, waarbij elke buis van een individuele pomp was voorzien



Figuur 6 a) Impressie van de opzet van het experiment in hoge ronde buizen, waarbij elke buis is voorzien van een volledig eigen pompsysteem en b) tien zaden zijn in elke buis gebracht, waarna ze bedekt zijn met een klein laagje sediment.

om kruisbesmetting te voorkomen, is ervoor gezorgd dat het bovenstaande zeewater volledig werd belucht, om zuurstofloze omstandigheden/stilstand van het oppervlakte water te voorkomen (het zeewater van de Waddenzee is in de winter ook zuurstofrijk en in beweging).

Om het effect van wintertemperatuur op *Phytophthora* en zaadontkieming te meten, zijn de buizen geïncubeerd in twee naast elkaar gelegen waterbaden,

waarbij de ene helft van de buizen is geïncubeerd bij een temperatuur van 5.7°C, wat een strenge winter simuleert, en de andere helft bij 12.1°C, wat een warme winter simuleert⁸.

Na aanbrengen van het sediment heeft het sediment in de buizen twee dagen de kans gehad om te stabiliseren. Vervolgens zijn de zaden per tien met een steriele pincet op steriele petrischalen geplaatst waarop een paar druppels artificieel zeewater lagen. Deze zaden zijn vervolgens verdeeld over de buizen (Fig. 6b). Hierna zijn de zaden bedekt met een laagje sediment van een ongeveer een halve centimeter, om de natuurlijke veldcondities zoveel mogelijk te simuleren.

Na de start van het experiment is gemiddeld twee keer per week het zoutgehalte van de buizen gecontroleerd, en zo nodig bijgesteld met demiwater dan wel een 35‰ zeezoutoplossing om het waterpeil in de buizen op peil te houden en om ervoor te zorgen dat het zoutgehalte constant bleef (27‰). Ook is regelmatig de temperatuur van de waterbaden gecontroleerd, welke constant was tijdens het experiment (5,7 en 12,1°C).

3.4 Fysische en Chemische analyses

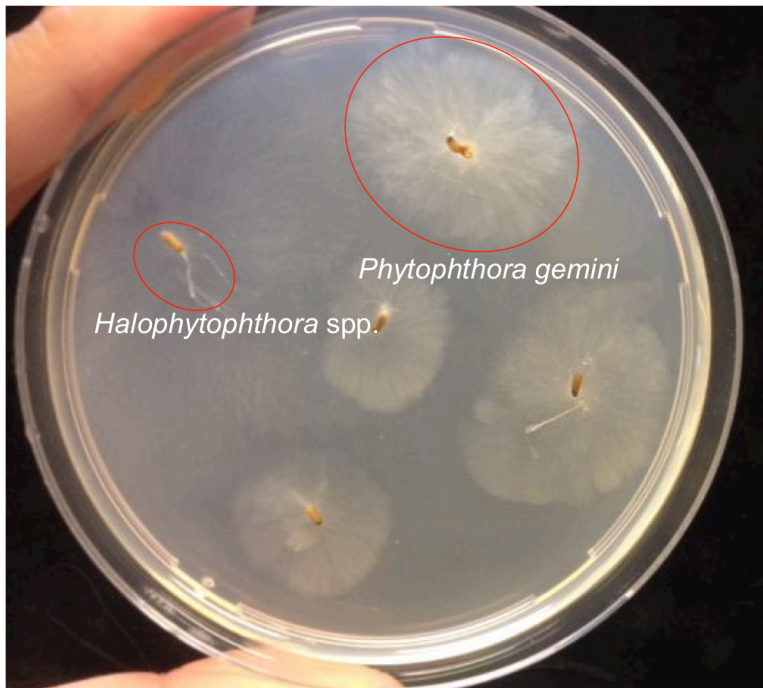
Vóór aanvang van het experiment zijn er 4 sedimentmonsters genomen van de beide sedimentlocaties (Texel en Uithuizen) die vervolgens gedroogd zijn voor verdere analyse. Deze samples zijn geanalyseerd op korrelgrootte op het lab van het NIOZ Yerseke, met behulp van een Malvern (Master 2000, UK) particle size analyzer. Het organisch materiaal in het sediment is bepaald door de gedroogde sedimentmonsters te verassen bij 550°C voor 4,5 uur en daarna het gewichtsverlies te bepalen (LOI = loss on ignition). Twee weken voordat het experiment werd beëindigd zijn in alle buizen 5 cm rhizons (Eijkelkamp, Giesbeek) geplaatst tot een diepte van 6 cm. Dit zijn poreuze buisjes met een poriegrootte van 20 µm waarmee gefilterd porievocht kan worden gemonsterd. Op de dag vóór beëindiging van het experiment zijn deze rhizons gebruikt om gefilterde porievochtmonsters te nemen in vacuümgetrokken glazen 30 mL flesjes. Hierna is de concentratie sulfide

(H₂S) in het porievocht (3 mL) gemeten in een 50% porievocht / 50% SAOB (sulfide anti-oxidatie buffer) oplossing, met een ion-specifieke zilver-sulfide electrode⁹. De gemeten waarden zijn omgerekend met behulp van een ijklijn. Deze metingen zijn uitgevoerd om een beeld te krijgen van de biogeochemische omstandigheden in de bodem, die mogelijk van invloed kunnen zijn op zowel de overwinterende zaden als *Phytophthora*.

3.5 *Phytophthora*-analyses

Na 110 dagen (3,5 maanden) is het experiment beëindigd. Het sediment uit elke buis/experimentele unit is bij beëindiging van het experiment uitgezeefd over een 800 µm zeef om de ingebrachte zaden weer terug te kunnen vinden. Het uitgezeefde materiaal is minutieus doorzocht, waarbij gemiddeld 8/10 zaden per buis zijn teruggevonden. De niet-teruggevonden zaden zijn bestempeld als weggerot.

De zaden zijn vervolgens wederom individueel verpakt in 1,5 mL epjes met een bodempje zeewater (200 uL, 23‰) en direct naar het *Phytophthora*-lab



Figuur 7 Besmette zaden op een test-plaat waarbij duidelijk een verschil te zien is tussen de snelgroeiende *Halophytophthora spp.* en de rosetvormende *Phytophthora gemini*. De 5 zaden op deze plaat zijn slechts een voorbeeld. Voor de uiteindelijke *Phytophthora*-analyse zijn alle zaden individueel op platen gebracht.

van de NVWA gebracht. Bij de NVWA zijn de zaden individueel op kleine 12 wells microtiterplaten met een selectieve voedingsbodem (ParpH) geplaatst, en gedurende 4 weken geïncubeerd bij een natuurlijk dag/nacht ritme bij kamertemperatuur (18-20°C).

Aanwezigheid/Afwezigheid van

(Halo)Phytophthora's (*Phytophthora gemini*, *Phytophthora inundata*, *Halophytophthora* spp.) is na 3 en na 7 dagen gescoord in de eerste week van de incubatie (Fig. 7). Na 7 dagen werd er per well/zaadje enkele ml artificieel zeewater toegevoegd. Tot vier weken in de incubatieperiode is aanvullend ook de kieming van de individuele zaden gescoord (wel of niet kiemen) met regelmatige intervallen.

3.6 Statistiek

De resultaten van de voorbehandeling en van het *Phytophthora*-experiment zijn statistisch getest met generalized linear mixed models (GLMM, lme4-package in R 3.01) met een binomiale verdeling (waarbij de uitkomst steeds was of een zaad wel/niet besmet was en vervolgens wel/niet gekiemd). De behandelingen zijn hierin als fixed factors meegenomen en de buizen als random factor. Eerst is het volledige model getest, waarbij alle behandelingen en interacties tussen behandelingen (transporttemperatuur / ethanol / wintertemperatuur / sedimenttype) zijn meegenomen. Vervolgens zijn stapsgewijs steeds de niet-significante behandelingen en interacties uit het model verwijderd, te beginnen met de meest ingewikkelde 4-weg interacties (transport T * ethanol * winter T * sediment). Op deze wijze is het statistische model steeds verder gereduceerd totdat alleen nog significante factoren (en eventuele interacties) over waren¹⁰. Totale *Phytophthora*-effecten en verschillen in effecten tussen soorten zijn aanvullend geanalyseerd met Chi-square (χ^2) tests. Sedimenteigenschappen zijn getest met behulp van t-tests en de resultaten van de sulfide metingen zijn met een tweeweg-ANOVA getest. Relaties worden aangemerkt als significant wanneer de P-waardes van het statistische model $P < 0.05$ waren. Alleen statistisch significante resultaten worden in de tekst als effect beschreven. De statistische resultaten zijn bijgevoegd in de Appendix.

3.7 Rekenmodel opbrengst

Bij de uitvoering van dit experiment zijn stapsgewijs drie belangrijke verliesposten in kaart gebracht die van ook relevant zijn voor het herstelproject. De verliesposten houden in dat er bij verschillende stappen in

de levenscyclus van het zaad, een bepaald percentage dood gaat/ wegrot. Om de cumulatieve effecten van getoetste verliesposten op de kieming van zaden te kunnen inschatten, is een rekenmodel gemaakt. Voor het rekenmodel zijn de drie verliesposten die in het experiment zijn gemeten in kaart gebracht en gekwantificeerd, namelijk I) transport, II) rotting in het sediment, en III) besmetting. Voor het rekenmodel zijn alleen statistisch significante effecten meegenomen om 'ruis' uit te sluiten. Het rekenmodel is bedoeld om de opbrengst per behandeling in aantal gekiemde zaden kg^{-1} verzameld zeegrasmateriaal te berekenen. Vervolgens kan de verliespost door *Phytophthora* ook worden uitgeschakeld in dit model om de potentiële toename in opbrengst te berekenen, wanneer *Phytophthora* niet aanwezig zou zijn in de zaden.

Alle verliesposten zijn apart berekend waarna de berekeningen zijn gecombineerd om de totale opbrengst na aftrek van alle verliesposten te bepalen. Er is begonnen met het uitrekenen van het verlies door transport (I), waarbij de hoogste opbrengst ($267 \text{ zaden kg}^{-1}$, gekoeld transport) op 1 is gesteld en de laagste opbrengst t.o.v. de hoogste opbrengst is berekend ($150 \text{ zaden kg}^{-1} / 267 \text{ zaden kg}^{-1} = 0.56$). Op deze wijze zijn van alle significante behandelingen de effectgroottes bepaald, waarbij steeds het grootste effect op 1 is gesteld en het laagste effect t.o.v. het hoogste effect is bepaald (zie APPENDIX IV voor effectgroottes). Met de volgende formules is vervolgens het effect van de verschillende verliesposten bepaald, resulterend in een kiemingsopbrengst (IV):

$$I) \text{ startopbrengst} * \text{transport effect} = \text{opbrengst na transport}$$

$$II) \text{ transporteffect} * \text{ethanoleffect} * \text{winter T effect} * \text{sediment effect} * \text{algemeen rottingseffect} \\ * \text{opbrengst na transport} = \text{opbrengst incl. wegrotting}$$

$$III) \text{ transporteffect} * \text{ethanol effect} * \text{winter T effect} * \text{sediment effect} * \text{algemeen winterseffect} \\ = \text{besmettingseffect}$$

$$IV) (\text{besmettingseffect} * \text{opbrengst incl. wegrotting} * \text{kiemingsperc. besmet}) \\ + ((1 - \text{besmettingseffect}) * \text{opbrengst incl. wegrotting} \\ * \text{kiemingsperc. niet besmet}) = \text{opbrengst kieming}$$

Hierbij is voor kiemingspercentage besmet 4% en niet-besmet 23% gebruikt (zie resultaten). De opbrengst is uitgedrukt in aantal gekiemde zaden kg^{-1} verzameld zeegrasmateriaal. Om de zaadopbrengst zónder *Phytophthora* uit rekenen zijn de laatste twee rekenstappen overgeslagen (V):

$$V) \text{ opbrengst incl. rotting} * \text{kiemingspercentage niet besmet} = \text{opbrengst zonder Phytophthora}$$

Dit rekenmodel kan gemakkelijk worden uitgebreid om nog onbekende verliesposten zoals zaadverlies door stroming of begraving mee te nemen.

3.8 Validatie van het model

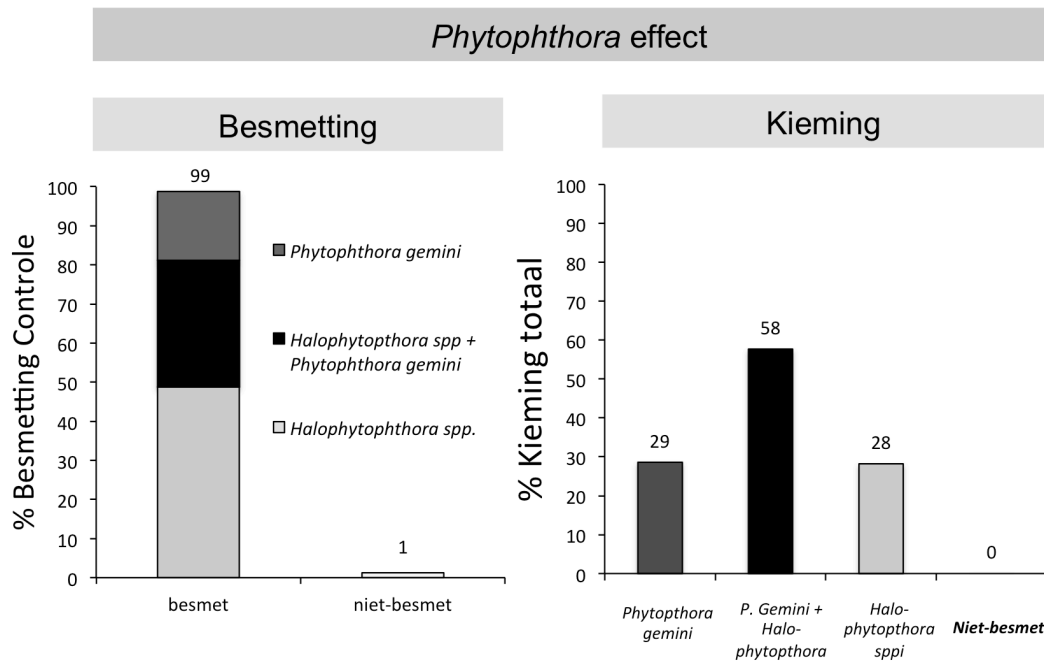
Het model is ook getest tegen de werkelijke gemeten data (verschil werkelijke data en modeldata in vergelijking tot 2x de standaarddeviatie van de gemeten waarden), waar ook de niet-significante ('ruis') effecten een rol in spelen. Het model blijkt de rottingseffecten (II) zeer goed te voorspellen. Het besmettingseffect (III) is echter minder nauwkeurig voor de bij kamertemperatuur bewaarde zaden. Het complete model (IV) blijkt ook minder nauwkeurig voor de bij kamer temperatuur bewaarde zaden dan voor de gekoeld bewaarde zaden. Dit is het gevolg van meetfouten bij elke verliespost (stapeling van 'ruis'), en mogelijk één of meerdere verliesposten en/of interacties die niet statistisch konden worden gekwantificeerden daarom niet zijn meegenomen.

4. Resultaten

4.1 Voorbehandeling

Na 'transport' en vóór aanvang van het experiment zijn alle op het oog vitale zaden uit het verzamelde zeegras gehaald met een pincet, waarna deze vervolgens onder de binoculair op het oog geselecteerd zijn op vitaliteit. De zaadopbrengst verschilde sterk tussen de bij kamertemperatuur en gekoeld bewaarde zaden. De zaadopbrengst van bij kamertemperatuur bewaarde

zaden was ~ 150 zaden kg^{-1} zeegras (nat gewicht) en voor de gekoeld bewaarde zaden was dit ~ 267 zaden kg^{-1} zeegras, wat 1,8 keer zoveel is.

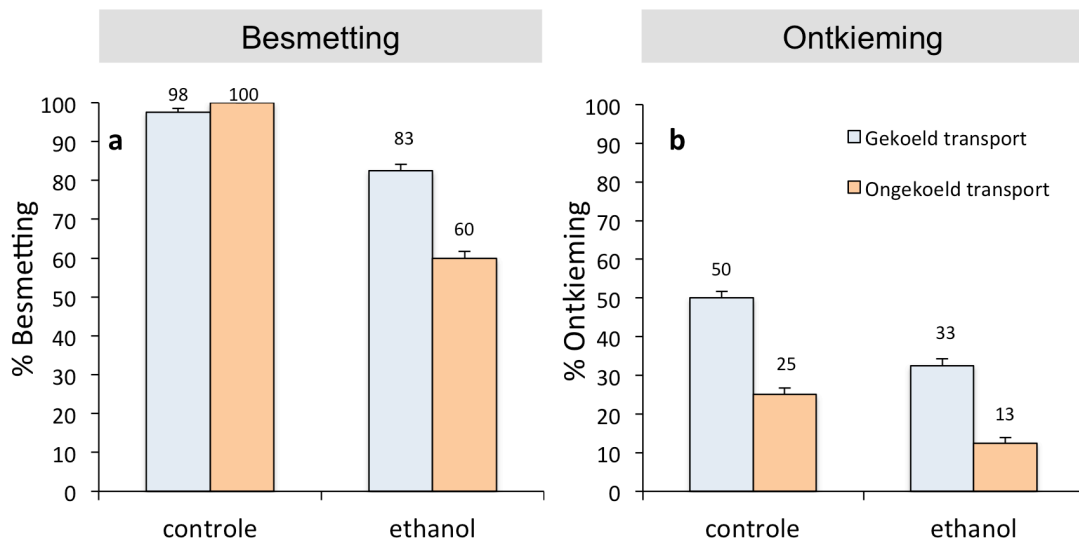


Figuur 8 a) Totale besmetting van *Phytophthora*, bepaald per *Phytophthora*-soort en b) het totale percentage gekiemde zaden besmet vs. niet-besmet.

Een deel van de voorbehandelde zaden (transporttemperatuur en ethanol-ontsmetting) is apart gehouden en niet gebruikt voor de experimentele incubatie in de buizen (zie sectie 2.2), maar na 1,5 maand rijping in de koeling getest op aanwezigheid van *Phytophthora*'s. Daarbij zijn alleen *Phytophthora gemini* als *Halophytophthora* spp. aangetroffen (dus geen *Phytophthora inundata*). De resultaten van de voorbehandeling zijn hieronder weergegeven in Fig. 8 en Fig. 9. Na de voorbehandeling bleek dat 99% van alle niet-ethanol ontsmette zaden besmet was met *Phytophthora*, waarbij 49% van de zaden met alleen *Halophytophthora* spp., 18% met alleen *Phytophthora gemini*, en 32% door beide *Phytophthora*'s besmet was (Fig. 8a). Ondanks het hoge besmettingspercentage bleek de *Phytophthora*-besmetting **vóór aanvang van de winter** echter geen enkel effect te hebben op de kiemkracht van de zaden (Fig. 8b).

Behandelingseffecten waren vergelijkbaar voor zowel *Phytophthora* als *Halophytophthora* (Appendix tabel 4), daarom scharen we beide soorten

verder onder één noemer, namelijk *Phytophthora*. De *Phytophthora*-besmettingsgraad verschilde niet significant tussen de verschillende transporttemperaturen. Ethanol-ontsmetting had echter wel het gewenste effect, waarbij de besmettingsgraad van de bij kamertemperatuur bewaarde zaden zelfs met 40% afnam als gevolg van de ethanolbehandeling (Fig. 9a).



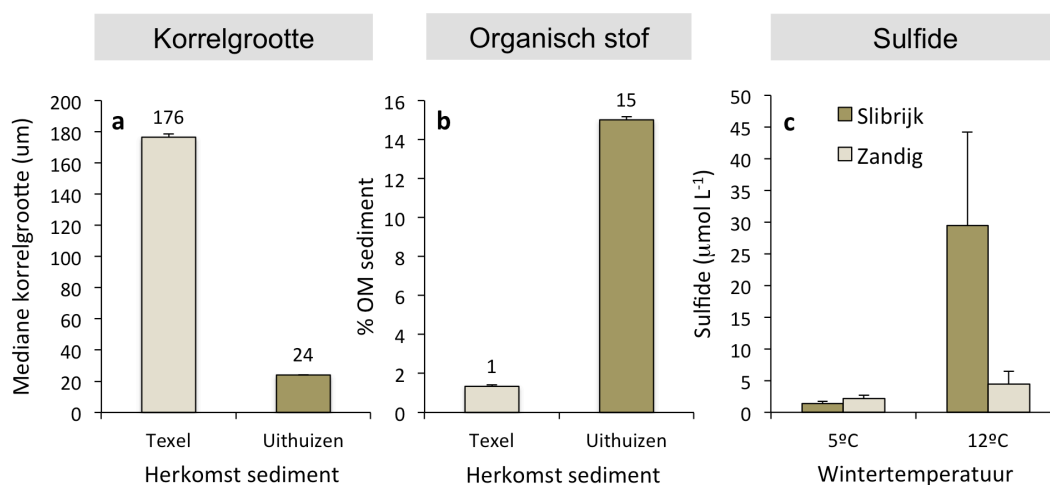
Figuur 9 Resultaten van de transporttemperatuur en ethanolbehandeling zaden vóór aanvang van de incubatie in het sediment. a) effecten van de behandelingen op totale *Phytophthora*-besmetting en b) behandelingseffecten op % zaadkieming

In tegenstelling tot het ontbreken van een *Phytophthora*-effect in de voorbehandelde zaden, hadden de voorbehandelingen zelf wél effect op de zaadkieming van *Z. marina* (Fig. 9b). Het kiemingspercentage van gekoeld bewaarde zaden was hoger dan dat van bij kamertemperatuur bewaarde zaden (50% versus 33 %). De ethanol-ontsmettingsbehandeling verminderde *Phytophthora*-besmetting, maar ook de kiemingspercentages gingen drastisch achteruit; van 50% in de controle naar 33% in de ethanol-behandeling van de gekoelde zaden, en van 25 naar 13% in de ongekoelde zaden (Fig. 9b).

4.2 Omgevingscondities: sediment

De eigenschappen van het sediment dat in het experiment is gebruikt zijn onderzocht om een indicatie te krijgen van de lokale (biogeochemische) condities die in het sediment heersen. De twee typen sediment zijn afkomstig uit Texel (vlakte van Kerke) en Uithuizen en geselecteerd vanwege de

teggestelde sedimentcondities. Onze analyse bevestigde ook dat het sediment van Texel zandig is met een mediane korrelgrootte van 176 μm en slechts 1% organisch materiaal (Fig. 10a, b), terwijl het sediment van Uithuizen erg slibbig (mediane korrelgrootte 24 μm) en organisch (15% OM) is. Deze sedimenteigenschappen resulteren in contrasterende biogeochemische condities in het sediment, waarbij in slibrijke sedimenttypes over het algemeen meer zuurstofloze omstandigheden heersen vergeleken met grovere, zandige sedimenttypes. Onder zuurstofloze omstandigheden kan er in mariene sedimenten sulfide worden geproduceerd, wat giftig is voor zeegras^{11,12}. Uit onze metingen blijkt dat de sulfideconcentraties in het sediment gedurende de winter vrij laag waren ($<30 \mu\text{mol L}^{-1}$) en dat alleen in slibrijke condities onder warme omstandigheden sulfideconcentraties verhoogd waren (Fig. 10c). Deze omstandigheden (combinatie slib en warme winter) zijn biogeochemisch gezien dus minder geschikt voor zeegraszaden.



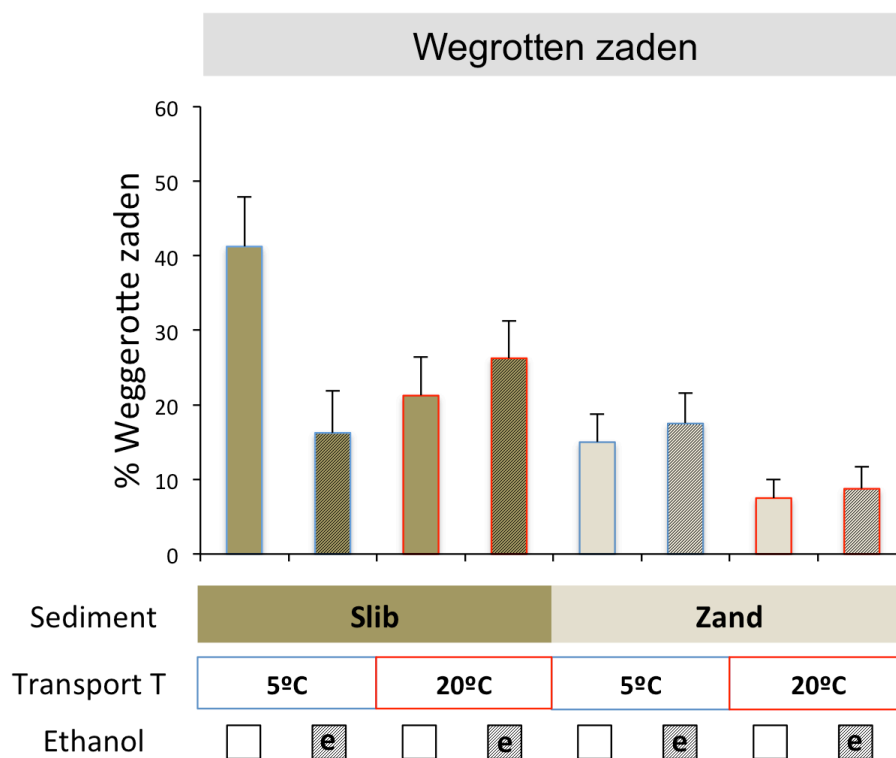
Figuur 10 Overzicht van de sedimenteigenschappen van het sediment dat in de proef is gebruikt, a) mediane korrelgrootte, b) % organisch materiaal (OM) en c) sulfide concentraties in het porievocht bij twee verschillende wintertemperaturen

4.2 Incubatie

4.2.1 Zaadoverleving

Per buis is bepaald hoeveel zaden er teruggevonden zijn, waarbij de niet-teruggevonden zaden zijn aangemerkt als 'weggerot' (sectie 3.4).

Wintertemperatuur blijkt niet van invloed op het rottingsproces van de zaden (Fig. 11), maar het sedimenttype beïnvloedt het weggroten van de zaden wel: In slibrijk sediment is 29% van de zaden weggerot versus 16% in zandig sediment. Ook de transporttemperatuur blijkt een rol te spelen, bij kamertemperatuur bewaarde zaden rotten minder snel weg dan gekoeld bewaarde zaden (23% vs. 16% weggerot). Dit is waarschijnlijk het gevolg van de voorselectie van de zaden die bij kamertemperatuur zijn bewaard. Fitte zaden waren gemakkelijker te onderscheiden in de niet-gekoelde behandeling, waardoor de kwaliteit van de bij kamertemperatuur-bewaarde zaden mogelijk na selectie iets hoger was dan bij gekoeld bewaarde zaden. Als laatste factor heeft ook de ethanolbehandeling een marginaal effect gehad op het aantal zaden dat is teruggevonden: er zijn minder ethanol-behandelde zaden weggerot (17%) dan controle zaden (21%) (Fig. 11).

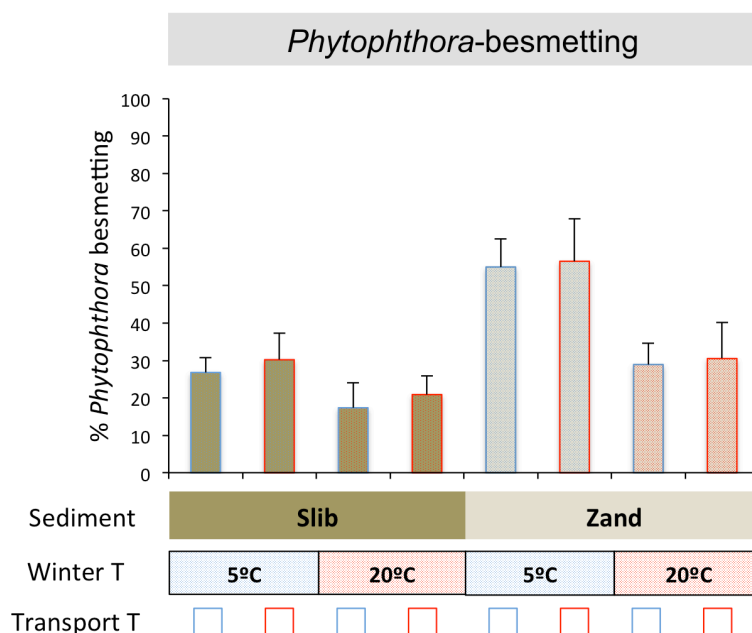


Figuur 11 Resultaten van het aantal teruggevonden zaden per buis (%) met de effecten van de behandelingen. Wintertemperatuur is in deze grafiek niet apart weergegeven omdat er geen significante effecten van wintertemperatuur op het % teruggevonden zaden zijn gevonden. E is een afkorting voor de ethanol-behandelde zaden.

4.2.2 *Phytophthora*-besmetting

Vóór aanvang van het experiment was 99% van de zaden besmet met *Phytophthora* (*Halophytophthora* spp. dan wel *Phytophthora gemini* of beiden) (sectie 3.1), echter, na de winter was het totale besmettingspercentage gedaald naar 34% (12% besmetting door alléén *Halophytophthora* spp., 18% door alléén *P. Gemini*, en 4% door beide soorten) (Fig. 12a). Dit betekent dus dat er een algemene reductie van besmetting heeft plaatsgevonden tijdens de incubatie (de gesimuleerde winter).

Phytophthora-besmetting werd beïnvloed door verschillende omgevingsfactoren: sedimenttype, wintertemperatuur en transporttemperatuur (Fig. 12). De besmettingsgraad van *Phytophthora* (zowel *Phytophthora gemini* als *Halophytophthora* spp.) was gemiddeld lager in slibbig sediment ten opzichte van zandig sediment (23 vs. 43%). Ook was de *Phytophthora*-besmettingsgraad lager bij een hoge wintertemperatuur (12°C) dan bij een lage wintertemperatuur (5°C) (24 vs. 43% besmetting). De ethanol-behandeling had slechts invloed op de besmettingsgraad na de winter van de bij kamertemperatuur bewaarde zaden, waarbij 47% van de controle zaden versus 22% van de ethanol-behandelde zaden besmet was. Daarbij is ook een marginaal effect gevonden van transporttemperatuur, waarbij de besmettingsgraad van de zaden iets lager was in de bij kamertemperatuur bewaarde zaden dan bij de gekoeld bewaarde zaden (32 vs. 35%).

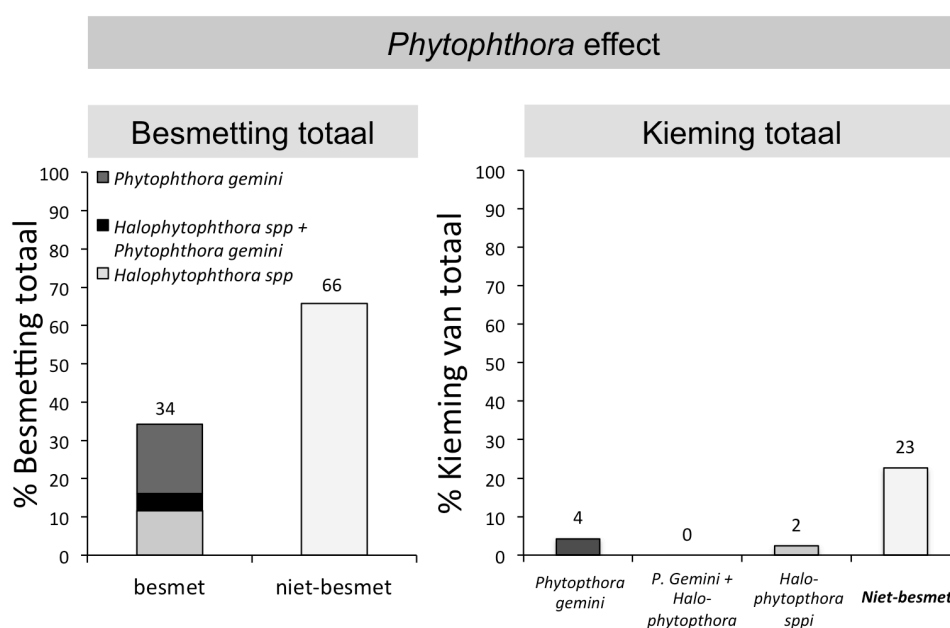


Figuur 12 *Phytophthora*-besmettingsgraad (in %) per buis, individueel per zaad bepaald.

4.2.3 Zaadkieming

De enige factor die **na de incubatie** effect had op de zaadkieming van *Z. Marina* was *Phytophthora*-besmetting (Fig. 13b). *Phytophthora*-besmetting had na de incubatie een sterk negatief effect op *Z. Marina* zaadkieming, waarbij 23% van de niet-besmette zaden is ontkiemd, in tegenstelling tot 4% van de besmette zaden. Dit betekent dat zaden die besmet zijn door *Phytophthora* een bijna 6x kleinere kans hebben om te kiemen dan niet-besmette zaden. De geteste omgevingscondities (transporttemperatuur, ethanol-ontsmetting, sedimenttype en wintertemperatuur) hadden na incubatie van de zaden verrassend genoeg geen enkel effect op de zaadkieming (niet grafisch weergegeven vanwege een gebrek aan significante effecten), dat wil zeggen, niet direct, maar wel via een effect op *Phytophthora* (zie volgende sectie).

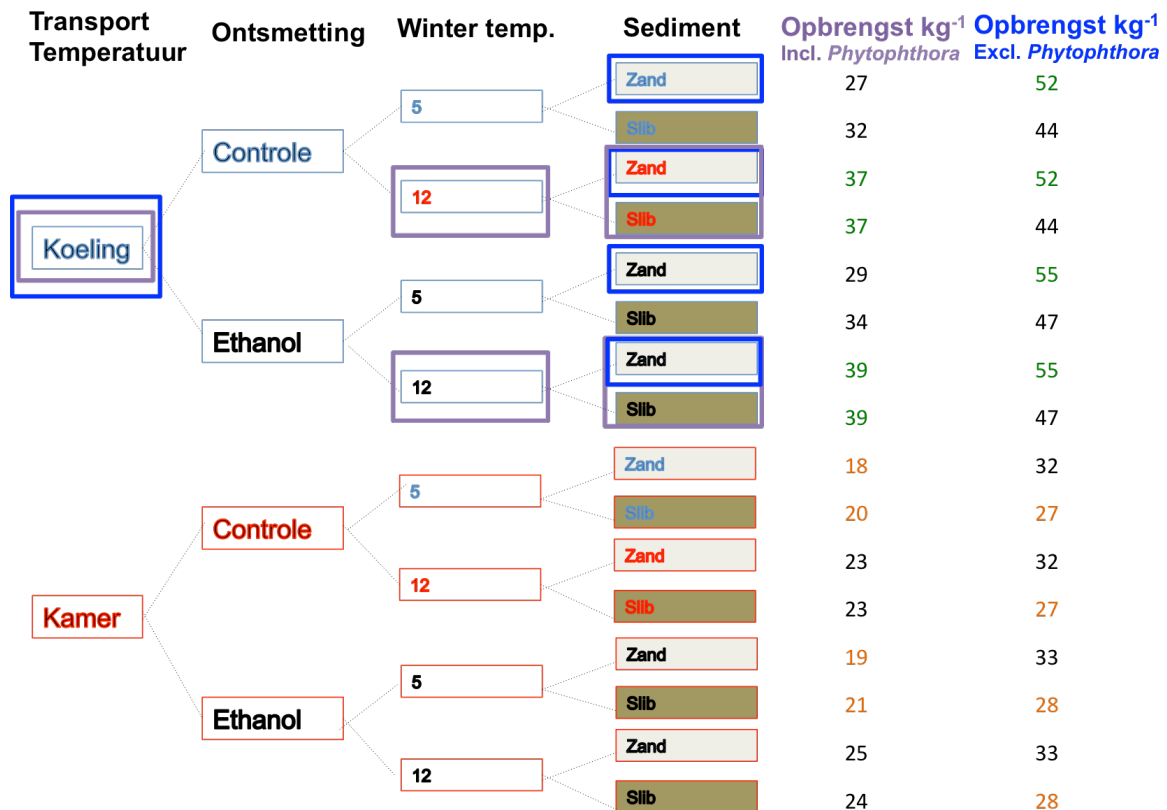
Aanvullend is ook apart gekeken naar de effecten van beide soorten: *Phytophthora gemini* en *Halophytophthora* spp. op de zaadkieming van *Z. marina* (Fig. 13b). Beide soorten bleken sterk negatieve effecten te hebben op de kiemkracht van de zaden, waarbij beide soorten even pathogeen bleken te zijn.



Figuur 13 a) totale besmetting van *Z. marina* uitgesplitst in de twee soorten *Phytophthora* en b) het totale percentage gekiemde zaden van besmette en niet-besmette zaden.

4.4 Rekenmodel zaadopbrengst kg⁻¹

Aan de hand van de significante effecten die zijn gevonden in het incubatie-experiment is een rekenmodel gemaakt waarbij verliezen door transport, rotting en *Phytophthora*-besmetting zijn meegenomen. Met dit model is de opbrengst gekiemde zaden kg⁻¹ verzameld zeegrasmateriaal berekend (Fig. 14). De hoogste opbrengst wordt gehaald met gekoeld bewaarde zaden en een warme winter (12°C): 37-39 zaden kg⁻¹ zeegras. Zaden bewaard bij kamertemperatuur en vervolgens bij een lage (5°C) wintertemperatuur geven de laagste opbrengst: 18-21 zaden kg⁻¹ zeegras. Uit het model blijkt dat de transporttemperatuur, wintertemperatuur en de *Phytophthora*-besmettingsgraad alle drie een belangrijke rol spelen.



Figuur 14 Resultaten rekenmodel: zaadopbrengst in aantal gekiemde zaden kg⁻¹ verzameld zeegrasmateriaal. In paarse kaders in aangegeven onder welke omstandigheden de hoogste opbrengst kan worden gehaald mét *Phytophthora*. In blauw staat aangegeven onder welke omstandigheden de hoogste opbrengst kan worden gehaald zónder *Phytophthora*.

Wanneer echter gekeken wordt naar de zaadopbrengst zonder *Phytophthora*, dus wanneer een methode ontwikkeld zou worden om *Phytophthora* uit te schakelen, dan vinden we gemiddeld een opbrengst die gemiddeld 42% hoger ligt dan mét *Phytophthora*. Voor sommige behandelingen is de winst in

opbrengst zelfs 89% (gekoeld/controle/5°C/zand). Gekoeld transport zonder *Phytophthora* is nog steeds een pré, maar nu speelt ook sedimenttype plotseling een rol; de opbrengst is nu hoger op zand dan op slib. Dit is een gevolg van een hoger zaadverlies door rotting in slibbig sediment, wat eerder werd gecompenseerd doordat *Phytophthora*-besmetting juist lager was in slibbig sediment. Na uitschakeling van *Phytophthora* speelt de wintertemperatuur geen rol meer, wat eerder wel zo was aangezien *Phytophthora*-besmetting hoger was bij een koude wintertemperatuur.

5. Conclusies & Implicaties voor zeegrasherstel

Recentelijk werd *Phytophthora* (*Phytophthora gemini* en *Phytophthora inundata*) in groot zeegras *Z. marina* aangetoond^{5,6}. Hoewel de meeste *Phytophthora*-soorten pathogeen zijn voor hun waardplanten¹, was er nog niets bekend over de mogelijke effecten van *Phytophthora*-besmetting op zeegrasgroei en -ontwikkeling. Omdat Nederlandse zeegrasherstelprojecten afhankelijk zijn van een succesvolle zaadkieming, was het noodzakelijk om de effecten van *Phytophthora* op de zaadkieming van groot zeegras te onderzoeken. In dit rapport zijn de volgende onderzoeksvragen gesteld:

(1) wat zijn de effecten van *Phytophthora*-besmetting op de kieming van groot zeegras, (2) welke omgevingsfactoren (sedimenttype, wintertemperatuur, transporttemperatuur) beïnvloeden dit, 3) zijn er maatregelen te treffen om eventuele gevolgen van *Phytophthora*-besmetting te beperken, en (4) wat zijn de mogelijke gevolgen voor de zeegrasherstel.

5.1 Effecten van *Phytophthora*-besmetting op de zaadkieming

In het experiment hebben we een zeer sterk negatief effect van *Phytophthora*-besmetting op de zaadkieming gevonden: besmette zaden hadden een 6x zo lage kans om te kiemen (4%) als niet-besmette zaden (23%). Beide aangetroffen soorten, *Phytophthora gemini* en *Halophytophthora* spp. bleken even pathogeen te zijn.

5.2 Invloed van omgevingsfactoren op *Phytophthora*-besmetting en zaadkieming

Opvallend genoeg blijkt dat *Phytophthora*-besmetting afneemt tijdens de winter. Waar vóór aanvang van het experiment nog 99% van alle zaden besmet was, is dit na incubatie nog 'slechts' 34%.

In het experiment hebben we ook de invloed van verschillende factoren op *Phytophthora*-besmetting en zaadkieming onderzocht: transporttemperatuur, wintertemperatuur en sedimenttype. Transporttemperatuur was voornamelijk van invloed op de initiële zaadopbrengst, waarbij de opbrengst van gekoeld bewaarde zaden 1.8 x hoger was dan de opbrengst van bij kamertemperatuur bewaarde zaden.

Wintertemperatuur was van invloed op de *Phytophthora*-besmettingsgraad: *Phytophthora*-besmetting was lager (24%) bij een hoge (12°C) wintertemperatuur dan bij een lage (5°C) wintertemperatuur (42%).

Tot slot was ook het sedimenttype (slib vs. zand) van invloed op de besmettingsgraad. De *Phytophthora*-besmetting was aanzienlijk hoger op zandig sediment (43%) dan op slibbig sediment (24%), waarschijnlijk omdat *Phytophthora*'s ook niet van de zuurstofloze (en dus vaak sulfide-rijke) omstandigheden in slibrijke sedimenten houden. Aanvullend was sedimenttype ook van invloed op het weggroten van de zaden, waarbij er in slibbig sediment méér zaden weggroten dan in zandig sediment (29 vs. 16%).

5.3 Maatregelen om *Phytophthora*-besmetting te beperken

De ethanol-behandeling was in eerste instantie bedoeld om pathogenen op de zaden, zoals bacteriën, schimmels én *Phytophthora*'s, te verwijderen⁷. Na de voorbehandeling bleek echter al dat dit niet gelukt was en dat de ethanol-behandeling slechts max. 40% reductie van *Phytophthora* had opgeleverd. Echter na de incubatie, was deze reductie niet meer waarneembaar. De natuurlijke reductie van *Phytophthora*-besmetting tijdens de winter (van 85% naar 34%) bleek veel sterker dan het marginale effect van de ethanol-

behandeling. Dit marginale effect van ethanol op *Phytophthora*-besmetting wordt mogelijk veroorzaakt doordat *Phytophthora* zich vooral in het zaad blijkt te bevinden (niet op de zaadhuid) (pers. observatie NVWA). Ethanol-behandeling blijkt in ieder geval niet geschikt om *Phytophthora*-besmetting te beperken. Omdat beperking van *Phytophthora*-besmetting de zaadopbrengst sterk kan verhogen, loont het om op zoek te gaan naar een andere ontsmettingsmethode. Dit wordt behandeld in sectie 5.

5.4 Implicaties voor zeegrasherstel

Phytophthora-besmetting blijkt een sterk negatief effect (6x) te hebben op de zaadkieming van *Zostera marina*. Wanneer dit in een model wordt doorgerekend, waarbij ook alle behandelingseffecten in acht worden genomen, kunnen we de effecten van alle verliesposten (transport, rotting, besmetting) bepalen (sectie 3.4) mét en zonder *Phytophthora*. Hieruit blijkt dat de zaadopbrengst (aantal gekiemde zaden kg^{-1} verzameld zeegrasmateriaal) gemiddeld 42% lager is mét dan zonder *Phytophthora* – afhankelijk van de behandeling kan de opbrengst zelf tot 90% hoger uitvallen zonder *Phytophthora*. *Phytophthora* vormt dus een behoorlijke verliespost, ook voor het zeegrasherstelproject. Bovendien is niet bekend of *Phytophthora*-besmetting niet toch een effect heeft gehad op andere verliesposten zoals het weggroten van de zaden. Wellicht zijn zaden die eerder besmet waren met *Phytophthora*, maar na incubatie niet meer aantoonbaar, tóch ook verminderd kiemkrachtig. Andere verliesposten (bijv. door bioturbatie, van ontkieming tot zaailing, rijping zaden) die een rol spelen in het zeegrasherstelproject worden momenteel ook nog slecht begrepen. Behalve het reduceren van de verliespost door *Phytophthora*, zou het reduceren van andere verliesposten ook een enorme winst kunnen opleveren voor de totale opbrengst van het project. Daarom is het noodzakelijk om óók andere verliesposten beter te begrijpen en oplossingen te genereren om deze te beperken.

5.5 Vergelijking met schattingen rapport voorstudie

Op basis van onze werkelijke gemeten gegevens kunnen we ook een vergelijking maken met de geschatte gegevens over verliesposten en opbrengst zoals beschreven in de voorstudie door Erftemeijer & van Katwijk¹³. In dit rapport is een schatting gemaakt van de verschillende natuurlijke verliesposten, waarbij het totale verlies is geschat op 99%, als gevolg van de volgende verliesposten zijn:

1. Wegdrijven zaadstengels (80%)
2. Verliezen sediment (90%)
3. Kieming en eerste overleving (45%)
4. Zomerverliezen (10%)

Hierbij is de aanname gedaan, op basis van literatuur en veldmetingen in Nederland, dat een plant gemiddeld 100 zaden produceert. Echter uit veldmetingen in Sylt is gebleken dat één *Z. marina* plant uit Sylt gemiddeld 25 zaden produceert (per. comm. The Fieldwork Company). Als we nu een vergelijking willen maken met de door ons berekende opbrengst per kg moet dit worden omgerekend (zie kader).

Kader: Rekenscenario uitzaaioproef 2014 (getallen zullen van jaar tot jaar verschillen)

Uit metingen (RU en tFC) blijkt dat één *Z. marina*-plant uit Sylt in september 2014 gemiddeld rond de **3 g** (versgewicht) woog, wat neerkomt op **ongeveer 333** planten kg^{-1} .

Per plant werden er in het veld ongeveer 25 zaden per plant geteld, wat betekent dat er in potentie **8325** zaden kg^{-1} geproduceerd zouden worden.

Wij vonden echter na gekoeld transport en strenge selectie onder de binoculair max. **267** rijpe zaden kg^{-1} wat een verlies is van 97% vóóordat de zaden de winter ingaan (waarbij we de verliespost 'wegdrijven zaadstengels' niet meerekenen, omdat de stengels bij het uitzaaien in drijvende zakken op de locaties worden gehouden).

Dit betekent dat 1) er waarschijnlijk nog een groot verlies plaatsvond doordat zaden die in de aanzet wel geproduceerd waren, niet tot volledige ontwikkeling kwamen ('rijpen'), 2) er wellicht al rijpe zaden uit de zaadstengels zijn gevallen voordat deze geplukt werden, en/of 3) er een overschatting is gemaakt van het aantal initieel geproduceerde zaden kg^{-1} en/of een onderschatting van het totaal aantal vitale zaden na transport (te strenge selectie onder de binoculair).

In de winter vinden wij vervolgens een verlies van 85-90% door weggroting en *Phytophthora*-besmetting, wat vergelijkbaar is met de verliezen in het sediment die ook in de voorstudie zijn genoemd. Echter, in onze berekening zijn nog niet de mogelijke zaadverliezen door bioturbatie meegenomen, die in de voorstudie op 5-10% zijn geschat.

Uiteindelijk vonden wij in ons experiment ná de winter gemiddeld **30** gekiemde zaden kg^{-1} zeegras. Hierbij zijn we uitgegaan van een hoge wintertemperatuur vanwege milde winter van 2014-2015, en hebben we een gemiddeld effect van transporttemperatuur meegenomen, omdat de zaden in werkelijkheid bij gem. 14°C zijn vervoerd en bewaard (en niet zoals in het experiment bij 4 of 20°C). Dit betekent dat er tussen zaadaanleg en kieming een verlies van **99,64%** plaatsvond, wat betekent dat **3,6 op de 1000 geproduceerde zaden kiemt**. Daarbij komen nog extra verliesposten van de eerste overleving van gekiemde planten (geschat op 45% in de voorstudie) en de zomeroverleving (10%). Daarmee zou de opbrengst uiteindelijk uitkomen op **1,8 zaadproducerende planten per 1000 geproduceerde zaden** (22,42 geogoste planten nodig om één zaadproducerende plant te produceren).

Het lijkt er op dat er in de voorstudie een onderschatting is gemaakt van het aantal benodigde zaden. De schatting was dat voor het uitzaaien in 2014 er **11.250.000** zaden nodig zouden zijn (om in totaal op 2,25 ha uit te zaaien). Met deze berekeningen zou dat betekenen dat dit slechts ongeveer **20.250** zaaddragende planten zal opleveren (uitgaande van het gemiddelde aantal zaadopbrengst). Dit zou uiteindelijk in de zomer resulteren in een dichtheid van 0.9 plant m^{-2} (berekend per uitgezaaid areaal) in plaats van de beoogde 2.5 plant m^{-2} in de voorstudie.

Echter, de ongeveer **400 kg** zeegras materiaal wat in 2014 op 2,5 ha uitgezaaid is, zou volgens onze berekeningen slechts **1,068,000** zaden bevatten, wat ongeveer **1922** planten zal opleveren. Dit komt tot een dichtheid van $0.09 \text{ plant m}^{-2}$, **een 28x zo lage dichtheid als beoogd**.

Het is dus **zeer aan te bevelen om de hoeveelheid benodigd materiaal nog eens te herzien** op basis van onze huidige kennis van verliesposten, de nog onzekere verliesposten nauwkeuriger in kaart te brengen / te kwantificeren en te zoeken naar methodes die de opbrengst verhogen (zie 5. Aanbevelingen en vervolgstappen). **Met een herziening van de methodes/beoogde hoeveelheid materiaal kan een grote winst gemaakt worden met betrekking tot de opbrengst van het herstelproject.**

n.b. De bovenstaande berekening is gebaseerd op metingen van één jaar (2014) en een zeer strenge zaadselectie. De absolute getallen zullen van jaar tot jaar verschillen, maar ook tussen verzamelmomenten (augustus v.s. September)

6. Aanbevelingen en vervolgstappen

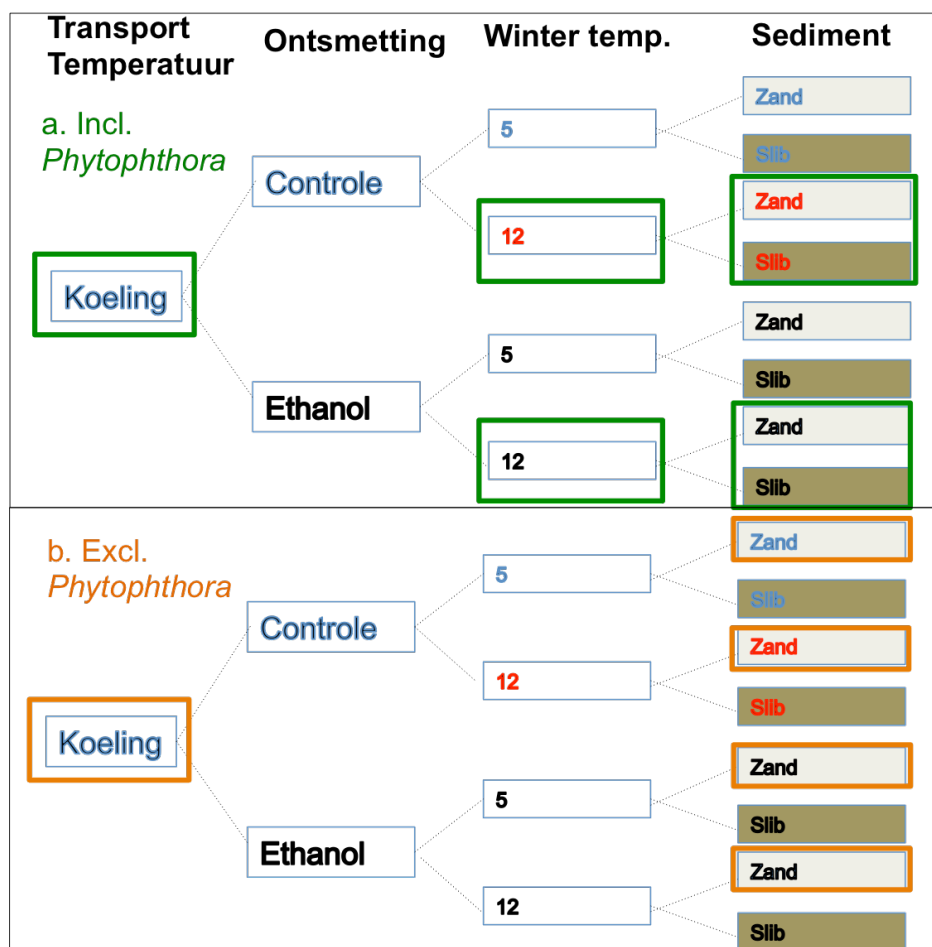
Uit ons onderzoek en het daaropvolgende rekenmodel zijn de volgende aanbevelingen/conclusies naar voren gekomen (Fig. 15):

1. Gekoeld transport van zaden verhoogd de opbrengst met 64%
2. Zaadopbrengst is 24% hoger na warmere winters
3. Mét *Phytophthora*-besmetting doet het type sediment waarop de zaden worden uitgezaaid (zand vs. slib) er niet toe
4. Een kritische herziening van berekeningen van het benodigd materiaal voor de herstelprojecten is vereist

- In kaart brengen andere verliesposten herstelproject (bijv. bioturbatie, zaadrijping, verlies kiemplanten)

Wanneer *Phytophthora*-besmetting zou kunnen worden uitgeschakeld veranderen de conclusies/aanbevelingen 2 en 3 als volgt:

- Uitzaaien op zandig sediment zorgt voor een 18% hogere zaadopbrengst
- Geén effect van wintertemperatuur op de zaadopbrengst



Figuur 15 Aanbevelingen optimale condities voor hoogste opbrengst a) incl. *Phytophthora* en b) excl. *Phytophthora*

Vervolg

1. Uit ons onderzoek blijkt duidelijk dat *Phytophthora*-besmetting een grote verliespost vormt voor zeegrasherstel. Daarom is het aan te bevelen om te investeren in de ontwikkeling van een methode die *Phytophthora*-besmetting uitschakelt of vermindert. Een methode die gemakkelijk toepasbaar is, is de behandeling van zeegrasmateriaal met een kopersulfaatoplossing. Kopersulfaat zorgt ervoor dat de zoösporen van (*Halo*)*Phytophthora*-soorten worden geïnactiveerd¹⁴ en koper kan ook de ontkieming van de sporangia negatief beïnvloeden¹⁵. Het is daarom sterk aan te bevelen om de bruikbaarheid van deze methode verder te onderzoeken.
2. Eveneens is het noodzakelijk om te achterhalen of de planten die in het veld (in de Nederlandse Waddenzee) tot kieming komen *Phytophthora* bij zich dragen, om inzicht te verschaffen in hoe en of *Phytophthora* ook na kieming de overleving van zeegrasplanten beïnvloedt. Dit is ook van belang om te achterhalen of het toevoegen van besmette zaden uit Sylt (donorpopulatie) aan een mogelijk onbesmette populatie (herstelpopulatie) gevolgen heeft voor zeegrasherstel.
3. Door middel van dit onderzoek is een aantal verliesposten in kaart gebracht die van belang zijn voor zeegrasherstel (transport, rotting, *Phytophthora*-besmetting). Er is echter nog een aantal verliesposten waarvan we geen goede schatting hebben, zoals beschreven in de voorstudie voor het zeegrasherstelproject uit 2011¹³. Voor toekomstige zeegrasherstelmaatregelen is het van belang dat ook deze verder in kaart worden gebracht, om zodoende de slagingskansen van deze projecten te verhogen (zoals besproken in de werksessies litoraal zeegras 27-01-2015 en 17-02-2015). Aanvullende monitoring in het veld, waarbij zowel in het voorjaar als in de zomer het aantal planten per uitzaailocatie gedetailleerd wordt bepaald, kan dit jaar al direct meer inzicht verschaffen in: (1) de verliesposten van kieming tot volwassen plant, en (2) de overleving van volwassen planten tot zaadzetting. Samengevat zijn dit naar onze inschatting de belangrijkste factoren waar we nog onvoldoende over weten:

- Verliespost zaadaanzet tot rijp zaad
- Verliespost bioturbatie
- Verliespost kieming -> zaailing
- Verliespost zaailing -> volwassen plant
- Overleving volwassen planten
- Zaadproductie volwassen planten
- Timing zaadproductie/zaadrijping (bepalend voor oogsten)

7. Referenties

- 1 Erwin, D. C. *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology, and pathology*. (American Phytopathological Society Press, 1983).
- 2 Haas, B. J. e. a. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature* **461**, 393-398 (2009).
- 3 Rizzo, D. M., Garbelotto, M., Davidson, J. M., Slaughter, G. M. & Koike, S. T. *Phytophthora ramorum* as the Cause of Extensive Mortality of *Quercus* spp. and *Lithocarpus densiflorus* in California. *Plant Disease* **86**, 205-214 (2002).
- 4 Rizzo, D. M. & Garbelotto, M. Sudden Oak Death: Endangering California and Oregon Forest Ecosystems. *Frontiers in Ecology and the Environment* **1**, 197-204 (2003).
- 5 Man in 't Veld, W. A., Rosendahl, K. C., Brouwer, H. & de Cock, A. W. *Phytophthora gemini* sp. nov., a new species isolated from the halophilic plant *Zostera marina* in the Netherlands. *Fungal biology* **115**, 724-732, doi:10.1016/j.funbio.2011.05.006 (2011).
- 6 Man in 't Veld, W. A. & Meffert, J. Exotische en hybride *Phytophthora* soorten als mogelijke bedreiging voor natuurlijke ecosystemen. *De Levende Natuur* **Maart**, 45-48 (2012).
- 7 Hanssen, L. S. A. M. & van Katwijk, M. M. Ontsmettingsmethodiek voor zeegraszaden met het oog op een mogelijke herintroductie van Groot Zeegras (*Zostera marina*) in het Grevelingemeer. (Ecoscience, 2010).
- 8 van Aken, H. M. Variability of the water temperature in the western Wadden Sea on tidal to centennial time scales. *J. Sea Res.* **60**, 227-234, doi:10.1016/j.seares.2008.09.001 (2008).
- 9 Lamers, L. P. M., Tomassen, H. B. M. & Roelofs, J. G. M. Sulfate-induced eutrophication and phytotoxicity in freshwater wetlands. *Environmental Science & Technology* **32**, 199-205 (1998).
- 10 Crawley, M. J. *The R Book*. (Wiley, 2012).
- 11 Lamers, L. P. *et al.* Sulfide as a soil phytotoxin - a review. *Front Plant Science* **4**, 268, doi:10.3389/fpls.2013.00268 (2013).
- 12 Govers, L. L. *et al.* Toxic effects of increased sediment nutrient and organic matter loading on the seagrass *Zostera noltii*. *Aquatic Toxicology* **155**, 253-260
- 13 Erftemeijer, P. L. A. & Van Katwijk, M. M. Zeegrasproef Waddenzee: grootschalig zeegrasherstel in de Nederlandse Waddenzee door middel van zaadverspreiding. (Deltares, 2010).
- 14 Howard, K., Colquhoun, I. J. & Hardy, G. The potential of copper sulfate to control *Phytophthora cinnamomi* during bauxite mining in Western Australia. *Australasian Plant Pathology* **27**, 51-58 (1998).
- 15 Leach, S. S. Effects of copper and copper fungicide soil residues on *Phytophthora infestans*. *American Potato Journal* **43**, 431-438 (1966).

APPENDIX: statistische resultaten

Statistische resultaten zijn weergegeven in de onderstaande tabellen. P-waardes geven de significantie niveaus aan, waarbij waarde met $P < 0.05$ als significant zijn aangemerkt. Alleen significante interacties zijn weergegeven in de tabellen. Statistische methodes zijn beschreven in sectie 2.5. Significantiecodes: $P < 0.001$ ***, $0.001 < P < 0.01$ **, $0.01 < P < 0.05$ *.

I. Voorbehandeling

Tabel 1 Resultaten χ^2 -test zaadkieming voorbehandeling besmet vs.niet-besmet

	observed	expected
ontkieming niet-besmet	6	7.2
ontkieming besmet	42	40.8
	<i>P</i>	
Chi ²	0.627625805	

Tabel 2 Resultaten GLMM “geminipretreat” met beste model voor de effecten op de zaadbesmetting: gemini ~ temp + ethanol

	Estimate	Std. Error	Z value	Pr(> z)	
(Intercept)	0.2293	0.5044	0.455	0.649416	
tempR	-0.5238	0.3661	-1.431	0.152525	
ethanolethanol	-1.3832	0.3747	-3.692	0.000223	***

Tabel 3 Resultaten GLMM “halophytophthora pretreat” met beste model voor de effecten op de zaadbesmetting: halo ~ temp + ethanol

	Estimate	Std. Error	Z value	Pr(> z)	
(Intercept)	1.9774	0.3904	5.066	4.07E-07	***
tempR	-0.8789	0.3708	-2.37	0.017764	*
ethanolethanol	-1.2481	0.377	-3.311	0.000931	***

Tabel 4 Resultaten χ^2 -test zaadkieming voorbehandeling Halophytophthora vs.P. gemini

	observed	expected
ontkieming halo	11	11.07142857
ontkieming gemini	4	3.974358974
	<i>P</i>	
Chi ²	0.980034946	n.s.

II. Sedimenteigenschappen

Tabel 8 Resultaten onafhankelijke T-testen voor %OM sediment en mediane korrelgrootte (D50)

	t	Df	p
%OM	-72.6442	4.227	1.044e-07***
D50	67.6434	3.084	5.394e-06***

Tabel 9 Resultaten Sulfideconcentraties porievocht, tweeweg-ANOVA met log-getransformeerde data waar outliers uit verwijderd zijn.

	Df	Sum sq	Mean sq	F value	Pr(>F)	
temp	1	11.198	11.1976	3.8615	0.054656	.
sed	1	9.651	9.6511	3.3282	0.07374	.
temp:sed	1	20.946	20.9465	7.2235	0.009593	**
Residuals	53	153.688	2.8998			

III. Incubatie

Rotting

Tabel 10 Resultaten GLMM “seed retrieval” met beste model voor de effecten op de teruggevonden zaden: seed_retrieved ~ pretreat + pretemp + temp + sed + (1 | unitnr) + pretreat:pretemp

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)	
(Intercept)	0.6905	0.2457	2.810	0.00495	**
pretreatethanol	0.6720	0.2987	2.250	0.02448	*
pretempR	0.8852	0.3096	2.859	0.00425	**
temp12	0.3195	-0.2200	-1.452	0.14638	
sedsand	0.9692	0.2274	4.263	2.02e-05	***
pretreatethanol:pretempR	0.9128	-0.4442	-2.055	0.03988	*

Besmetting

Tabel 11 Resultaten GLMM “contamination” met beste model voor de effecten op besmette zaden: contaminated_total ~ pretreat + pretemp + temp + sed + (1 | unitnr) + pretreat:pretemp

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)	
(Intercept)	-0.7677	0.2849	-2.695	0.00705	**
pretreatethanol	-0.2316	0.3225	-0.718	0.47273	
pretempR	0.6792	0.3115	2.18	0.02923	*
temp12	-0.9923	0.2296	-4.322	1.55E-05	***
sedsand	0.9891	0.2313	4.276	1.90E-05	***
pretreatethanol:pretempR	-1.1647	0.4573	-2.547	0.01087	*

Tabel 12 Resultaten GLMM “contamination_gemini” met beste model voor de effecten op besmette zaden: contaminated_gemini ~ pretreat + pretemp + temp + sed + (1 | unitnr) + pretreat:pretemp

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)	
(Intercept)	-1.3564	0.3636	-3.731	0.000191	***
pretreatethanol	-0.1795	0.4086	-0.439	0.660436	
pretempR	0.692	0.3905	1.772	0.076385	.
temp12	-0.9781	0.299	-3.272	1.07E-03	**
sedsand	0.8937	0.2991	2.988	2.81E-03	**
pretreatethanol:pretempR	-1.6577	0.6093	-2.721	0.006514	**

Tabel 13 Resultaten GLMM “contamination_halophytophthora” met beste model voor de effecten op besmette zaden: contaminated_halo ~ pretreat + pretemp + sed + (1 | unitnr)

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)	
(Intercept)	-1.7993	0.3898	-4.616	3.92E-06	***
pretreatethanol	-0.9492	0.3864	-2.457	0.01401	*
temp12	-1.095	0.3888	-2.817	0.00485	**
sedsand	1.2919	0.3997	3.232	0.00123	**

Kieming

Tabel 14 Resultaten GLMM “germination” met beste model voor de effecten op zaadkieming: germination_total ~ contaminated_total + (1 | unitnr)

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)	
(Intercept)	-1.2612	0.153	-8.241	2.00E-16	***
contaminated_total	-2.1576	0.4395	-4.91	9.13E-07	***

Tabel 15 Resultaten GLMM “germination_gemini” met beste model voor de effecten op zaadkieming: germination_total ~ gemini + (1 | unitnr)

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)	
(Intercept)	-1.2498	0.15	-8.331	2.00E-16	***
gemini	-1.6769	0.4824	-3.476	5.08E-04	***

Tabel 16 Resultaten GLMM “germination_halophytophthora” met beste model voor de effecten op zaadkieming: germination_total ~ halophytophthora + (1 | unitnr)

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)	
(Intercept)	-1.2823	0.1603	-7.997	1.27E-15	***
halophytophthora	-2.9289	1.0211	-2.868	0.00413	**

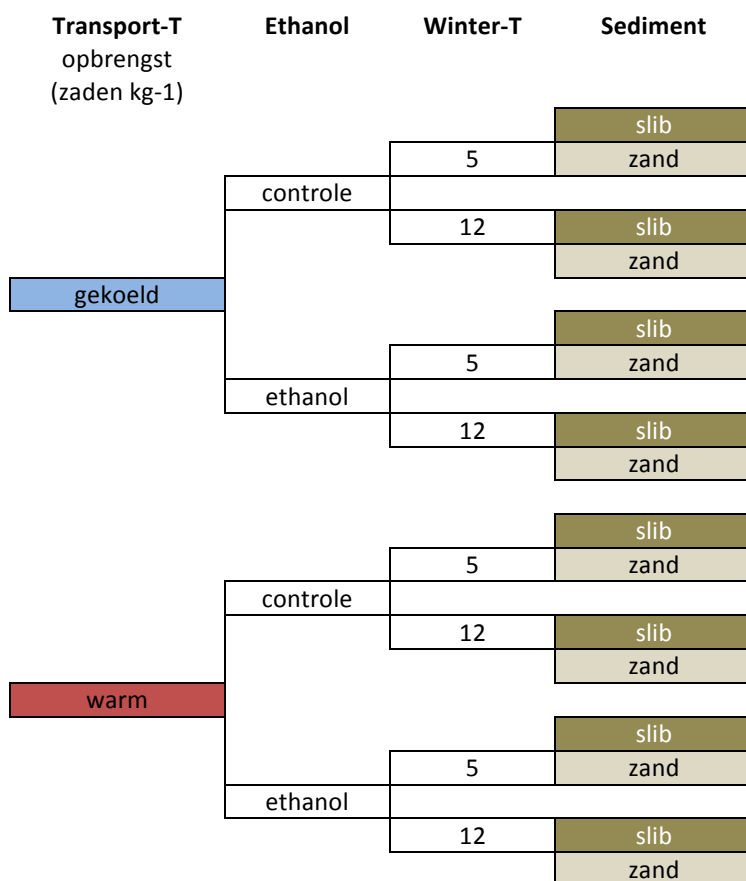
Tabel 17 Resultaten χ^2 –test zaadkieming incubatie besmet vs.niet-besmet

	observed	expected
ontkieming niet-besmet	77	55.24
ontkieming besmet	7	28.76
	<i>P</i>	
Chi^2	5.64E-07	***

	observed	expected
ontkieming met <i>Halophyto.</i>	2	2.60
ontkieming met <i>P. gemini</i>	5	4.07
	<i>P</i>	
Chi^2	0.55	n.s.

IV. Rekenmodel

Figuur A.1 Proefopzet en basis voor het rekenmodel



Tabel 18 Effect sizes transport (verliespost I)

Transport		Zaden kg ⁻¹	Effect
	warm	150	0.56179775
	gekoeld	267	1

Tabel 19 Effect sizes behandelingen 'wegrotten zaden' (verliespost II)

Wegrotten			Effect
Transporttemperatuur	warm	0.840625	1
	gekoeld	0.775	0.921933086
Ethanol	Wel	0.828125	1
	Niet	0.7875	0.950943396
Wintertemperatuur	12	1	1

	5	1	1
Sediment	Slib	0.7125	0.850746269
	Zand	0.8375	1
extra reductie rotting			0.965452844

Tabel 20 Effect sizes behandelingen 'Phytophthora-besmetting' (verliespost III)

Phytophthora-besmetting			
		<i>Besmetting</i>	<i>Effect</i>
Transporttemperatuur	warm	0.320213294	0.927
	gekoeld	0.345374504	1.000
Ethanol	Wel		1.000
	Niet		1.000
Wintertemperatuur	12	0.244233631	0.580
	5	0.421354167	1.000
Sediment	Slib	0.238169643	0.557
	Zand	0.427418155	1.000
Extra reductie "Wintereffect"			0.562

