

Effecten van kopersulfaat en zoutgehalte op (Halo)Phytophthora-besmetting en de zaadkieming van Groot zeegras (*Zostera marina*) Implicaties voor zeegrasherstel

A&W-rapport 2231



in opdracht van



Natuurmonumenten

Effecten van kopersulfaat en zoutgehalte op (Halo)Phytophthora-besmetting en de zaadkieming van Groot zeegras (*Zostera marina*)

Implicaties voor zeegrasherstel

A&W-rapport 2231

E.M. van der Zee, Altenburg & Wymenga
L.L. Govers, Rijksuniversiteit Groningen
J.P.Meffert, P.C.J. van Rijswick & W. Man in 't Veld, NWWA Wageningen
J.H.T. Heusinkveld & R. de Nooij, The Fieldwork Company
T. van der Heide, Radboud Universiteit

Foto Voorplaat

Zeegras, Foto A&W

E.M. van der Zee, Altenburg & Wymenga , L.L. Govers, Rijksuniversiteit Groningen, J.P.Meffert, P.C.J. van Rijswick & W. Man in 't Veld, NVWA Wageningen, J.H.T. Heusinkveld & R. de Nooij, The Fieldwork Company, T. van der Heide, Radboud Universiteit 2016

Effecten van kopersulfaat en zoutgehalte op (Halo)Phytophthora-besmetting en de zaadkieming van Groot zeegras (*Zostera marina*). Implicaties voor zeegrasherstel. A&W-rapport 2231

Altenburg & Wymenga ecologisch onderzoek, Feanwâlden

Opdrachtgevers**Natuurmonumenten**

Oostersingel 25

9401 JZ Assen

Telefoon 0592-30 50 50

Uitvoerders**Altenburg & Wymenga
ecologisch onderzoek
bv**

Postbus 32

9269 ZR Feanwâlden

Tel. 0511 47 47 64

info@altwym.nl

www.altwym.nl

**Nederlandse
Voedsel- en
Warenautoriteit**

Postbus 43006

3540 AA Utrecht

Tel. 0300-0388

**Radboud
Universiteit**

Comeniuslaan 4

6525 HP Nijmegen

Tel. 024- 361 61 61

**Rijksuniversiteit
Groningen**

Postbus 11103

9700 CC Groningen

Tel. 050-363 61 33

**The Fieldwork
Company**

Stockholmstraat 2B

9723 BC Groningen

Tel.050-750 33 90

© Altenburg & Wymenga ecologisch onderzoek bv. Overname van gegevens uit dit rapport is toegestaan met bronvermelding.

Projectnummer

2469

Projectleider

Els van der Zee

Status

Eindrapport

Autorisatie

Goedgekeurd

Paraaf

J. Latour

Datum

22-12-2016

Kwaliteitscontrole

E. Wymenga

Inhoud

Samenvatting	
1 Inleiding	1
1.1 Achtergrond	1
1.2 Vraagstelling	2
2 Materiaal en methode	3
2.1 Verzamelen van donormateriaal	3
2.2 Zaden verzamelen uit het zeegrasmateriaal	3
2.3 Experiment 1: Bewaar-experiment	3
2.4 Experiment 2: (<i>Halo</i>) <i>Phytophthora</i> reductie- experiment	4
2.5 Chemische analyses	7
2.6 (<i>Halo</i>) <i>Phytophthora</i> -analyses	7
2.7 Statistiek	8
3 Resultaten	9
3.1 Experiment 1: Bewaar-experiment	9
3.2 Experiment 2: (<i>Halo</i>) <i>Phytophthora</i> reductie-experiment	11
3.3 Uitzaaïen op Uithuizerwad	14
4 Conclusies en implicaties voor zeegrasherstel	15
4.1 Experiment 1: Bewaar-experiment	15
4.2 Experiment 2: (<i>Halo</i>) <i>Phytophthora</i> reductie- experiment	15
4.3 Uitzaaïen op Uithuizerwad	17
4.4 Aanbevelingen voor zeegrasherstel	17
5 Literatuur	18
<i>Bijlage 1 Literatuuroverzichten</i>	20
<i>Bijlage 2 Statistische resultaten</i>	22

Samenvatting

Phytophthora's zijn organismen die behoren tot de Oomycetes (waterschimmels) en plantenziektes veroorzaken, zoals de beruchte aardappelziekte. Recentelijk zijn er ook *Phytophthora*-soorten ontdekt bij Groot zeegras (*Zostera marina*) in Nederland en in andere Europese landen. Besmetting met deze oomycetes kan een serieus probleem vormen voor het herstel van de snel afnemende zeegrassvelden in Europa en wereldwijd. Recent onderzoek heeft namelijk aangetoond dat *Halophytophthora* sp. en *Phytophthora gemini*-besmetting een sterk negatief effect heeft op de zaadkieming van *Zostera marina*. Omdat het Nederlandse zeegrasherstelproject in de Waddenzee wordt uitgevoerd d.m.v. het uitzaaien van zeegraszaad, is het succes van dit project op dit moment volledig afhankelijk van een goede kiemkracht van deze zaden. Daarom was er de noodzaak om een methode te ontwikkelen waarmee *Halophytophthora* sp. en *Phytophthora gemini*-besmetting gereduceerd kon worden. Eerder onderzoek laat zien dat besmetting gereduceerd kan worden door de zaden gekoeld te bewaren over de winter en dat het verlagen van het zoutgehalte (saliniteit) van het water mogelijk een reducerend effect heeft. Daarnaast kan de besmetting mogelijk met koperverbindingen zoals kopersulfaten gereduceerd worden omdat dit als effectieve bestrijdingsmiddelen worden gebruikt bij andere soorten *Phytophthora*'s.

Het voorliggende onderzoek bestaat uit twee experimenten. In het eerste experiment wordt getest of zaden uit donormateriaal van Sylt op relatief grote schaal (duizenden zaden) bewaard kunnen worden over de winter in gekoeld zeewater en wat de effecten hiervan zijn op (*Halo*)*phytophthora* sp.- besmetting en zaadkieming. In het tweede experiment wordt op kleinere schaal (tientallen zaden) onderzocht of (*Halo*)*phytophthora* sp -besmetting gereduceerd kan worden door de zaden te behandelen met verschillende concentraties kopersulfaat (0-0,2-2 ppm) en/of zoutgehaltes (0,5-10-25 ppt) en wat hiervan de effecten zijn op de kieming.

Resultaten laten zien dat besmetting met (*Halo*)*Phytophthora* het kiemingspercentage van *Z. marina* verlaagt en de conditie van de kiempjes negatief beïnvloedt (meer bruine kiempjes die niet uitgroeien), waardoor de ontwikkeling van de kiemplantjes geremd wordt. Behandeling met kopersulfaat van de zaden reduceert besmetting tot wel 86%. De concentraties 0.2 ppm en 2 ppm kopersulfaat zijn beide even effectief. Behandeling met een laag zoutgehalte (0.5 ppt) remt de besmetting met 100%, maar zorgt ook voor een 9 x lagere groenkieming en heeft daarmee een sterk negatief effect op de ontwikkeling van kiemplantjes.

Dit onderzoek laat zien dat zeegraszaden goed bewaard kunnen worden over de winter onder gecontroleerde condities (gekoeld water van 6°C, ~25 ppt zoutgehalte) en dat (*Halo*)*Phytophthora* besmetting sterk gereduceerd kan worden d.m.v. een kopersulfaatbehandeling. Voor het uitzaaien en het bepalen van de overleving op het wad van de bewaarde zaden is nader vervolgonderzoek nodig.

1 Inleiding

1.1 Achtergrond

Phytophthora's zijn organismen die behoren tot de Oomycetes (waterschimmels). Over het algemeen zijn *Phytophthora*'s ziekteverwekkers (pathogenen) van tweezaadlobbige planten en zijn ze waardplantenspecifiek. Ze kunnen o.a. knolrot en bruinverkleuring en afsterving van bladeren en stengels veroorzaken (Erwin 1983). Besmetting door verschillende *Phytophthora*-soorten veroorzaakt jaarlijks dan ook ernstige schade aan landbouwgewassen en natuurlijke ecosystemen (Erwin 1983).

Recentelijk zijn er ook twee *Phytophthora*-soorten ontdekt in groot zeegras (*Zostera marina*) (Man in 't Veld *et al.* 2011). Dit zeegras was afkomstig uit de Zeeuwse Delta (Grevelingen) en besmet met *Phytophthora inundata* en met *Phytophthora gemini*, een nieuw ontdekte *Phytophthora*-soort (Man in 't Veld *et al.* 2011). Inmiddels is de aanwezigheid van *Phytophthora* in *Zostera marina* planten en zaden aangetoond op verschillende locaties (Man in 't Veld *et al.* 2012, Govers *et al.* 2015). Besmetting met deze oomycetes kan een serieus probleem vormen voor herstel van snel afnemende zeegrasvelden. Zaden van groot zeegrasplanten van Sylt, die gebruikt worden als donormateriaal voor zeegrasherstel in de Nederlandse Waddenzee, bleken ook besmet met *Phytophthora gemini* en *Halophytophthora* sp. *Zostera* (Man in 't Veld *et al.* 2012, Govers *et al.* 2015). Daarnaast heeft recent onderzoek aangetoond dat een (Halo)*Phytophthora* besmetting een sterk negatief effect heeft op de zaadkieming van *Zostera marina*. Besmette zaden bleken namelijk 6x minder kiemkrachtig dan niet-besmette zaden, wat kan zorgen voor een verlies van wel 42% van de zaadopbrengst (Govers *et al.* 2015; Govers *et al.* 2016). Omdat Nederlandse zeegrasherstelprojecten in de Waddenzee op dit moment volledig afhankelijk zijn van een goede kiemkracht van deze zaden, was er de noodzaak om een methode te ontwikkelen waarmee (Halo)*Phytophthora* -besmetting gereduceerd kan worden en de zaadopbrengst geoptimaliseerd kan worden.

De *Phytophthora* soorten die gevonden zijn op de groot zeegrasplanten en zaden van Sylt zijn *Phytophthora gemini* en *Halophytophthora* spp. (Govers *et al.* 2015; Govers *et al.* 2016). Hoewel voor deze soorten niet bekend is welke bestrijdingsmethoden effectief zijn, zullen bestrijdingsmiddelen die gebruikt worden voor andere *Phytophthora* soorten waarschijnlijk ook effectief zijn voor *Phytophthora gemini* en *Halophytophthora* spp omdat de soorten nauw verwant zijn aan elkaar. Er is al veel onderzoek gedaan naar de bestrijding van *Phytophthora*-soorten vanwege de enorme economische schade die deze pathogenen jaarlijks toebrengen aan landbouwgewassen. Veel voorkomende middelen die gezien worden als effectieve bestrijdingsmiddelen tegen *Phytophthora*'s zijn koperverbindingen zoals kopersulfaten en koperhydroxide (Howard *et al.* 1998, Meadows *et al.* 2011). Kopersulfaat zorgt ervoor dat de zoösporen van (Halo)*Phytophthora*-soorten worden geïnactiveerd (Howard *et al.* 1998) en koper kan ook de ontkieming van de sporangia negatief beïnvloeden (Leach 1966). Een methode die voor zeegras gebruikt zou kunnen worden, is de behandeling van zeegrasmateriaal met een kopersulfaatoplossing.

Naast een behandeling met kopersulfaatoplossing, kunnen mogelijk ook andere factoren besmetting van (Halo)*Phytophthora* tegengaan. Govers *et al.* (2015) laten zien dat gekoeld bewaren over de winter de besmetting van 99% naar 34% reduceert. Ontsmetten met ethanol lijkt ook (Halo)*Phytophthora*-besmetting te verminderen, maar had geen langdurige effecten waardoor het geen effectieve bestrijdingsmethode is (Govers *et al.* 2015; Govers *et al.* 2016). Daarnaast kan het verlagen van het zoutgehalte (saliniteit) van het water mogelijk een

natuurlijke methode zijn om besmetting tegen te gaan. Voor *Phytophthora polymorphica* is het namelijk bekend dat ze zeewater met uiteenlopende zoutgehaltes kunnen tolereren, maar dat hun groei beduidend lager ligt bij lage zoutgehaltes (Wilkens & Field 1993). Daarom wordt in dit onderzoek geëxperimenteerd met verschillende methodes om zaadoverleving te maximaliseren in een gecontroleerde omgeving (laboratorium) over de winter, om de zaden vervolgens in het voorjaar uit te zaaien.

1.2 Vraagstelling

Dit onderzoek bestaat uit twee experimenten.

In het Bewaar-experiment (Experiment 1): wordt getest of zaden uit donormateriaal van Sylt op relatief grote schaal (duizenden zaden) bewaard kunnen worden over de winter in gekoeld zeewater en wat de effecten hiervan op (*Halo*)*phytophthora* sp.- besmetting en zaadkieming zijn.

In het (Halo)Phytophthora reductie-experiment (Experiment 2): wordt op kleinere schaal (tientallen zaden) onderzocht of (*Halo*)*phytophthora* sp -besmetting gereduceerd kan worden door de zaden te behandelen met verschillende concentraties kopersulfaat (0-0,2-2 ppm) en/of zoutgehaltes (0,5-10-25 ppt) en wat hiervan de effecten zijn op de kieming.

2 Materiaal en methode

2.1 Verzamelen van donormateriaal

Het zeegrasmateriaal dat gebruikt is in dit experiment is verzameld op Sylt, op 5 september 2015, tijdens de tweede zeegraszaad-verzamelronde van het zeegrasherstelproject van 2015/2016. Vrijwilligers van Natuurmonumenten en 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). Dit zeegrasmateriaal is gekoeld (6°C) naar Nederland vervoerd op de dag nadat het materiaal is verzameld. Het percentage rijpe zaden van het zeegrasmateriaal was ten tijde van oogsten 39% (5921 rijpe zaden per kg geplukt zeegrasmateriaal ten opzichte van 9439 niet-rijpe zaden per kg geplukt zeegrasmateriaal).

2.2 Zaden verzamelen uit het zeegrasmateriaal

Direct na het transport naar Nederland, werden de zaadstengels verdeeld over 4 grote IBC tanks (1 m³) met zeewater, die goed werden belucht. In elke bak zat ongeveer 5 kg aan zeegrasmateriaal. Rijpe zaden vielen vervolgens uit de zaadstengels op de bodem van de IBC, waarbij een rooster met een maaswijdte van 5 mm grotendeels de stengels en het organisch materiaal scheidde van de zaden. Voor het (*Halo*) *Phytophthora* reductie-experiment werden na ongeveer drie weken 720 rijpe zaden geselecteerd (Xu *et al.* 2016). Voor het bewaar-experiment werden de overige zaden na ongeveer 4-6 weken verzameld (>80.000 zaden).

2.3 Experiment 1: Bewaar-experiment

In dit experiment wordt onderzocht of zeegraszaden uit donormateriaal van Sylt op relatief grote schaal (duizenden zaden) bewaard kunnen worden over de winter. Er is uitgebreid onderzoek gedaan naar het bewaren van *Z. marina* zaden ten behoeve van zeegrasherstel (zie literatuuroverzicht in Bijlage 1). Uit alle studies waarbij bewaartemperatuur als behandeling is meegenomen, blijkt dat het bewaren van zaden bij lage temperatuur 4-6°C de beste zaadkwaliteit en de hoogste kiemkracht oplevert (Marion & Orth 2008; Tanner *et al.* 2010; Kishima *et al.* 2011; Pan *et al.* 2014). Daarnaast zouden enigszins geaereerde omstandigheden (niet te sterk belucht) en een saliniteit van 20-30ppt optimaal zouden zijn voor zaadopslag van *Z. marina* (Marion & Orth 2008; Xu *et al.* 2016). De opslagduur zou ook beperkt moeten worden (dus niet meerjarige opslag), omdat de kwaliteit van de zaden in de tijd sterk achteruit gaat (Dooley & Wyllie-Echeverria 2013.) Marion & Orth (2010) rapporteren dat de hoogte van de laag zaden bij opslag niet hoger moet zijn dan 3-4 cm.

In het Bewaar-experiment zijn de hierboven beschreven condities aangehouden voor de zaadopslag (dunne laag zaden in gekoeld zeewater van 6 °C bij een saliniteit van 25 ppt). Het rijpe zaad uit de IBC's is verdeeld over 4 bakken (Fig 2.1). De zaden in bak 1 en 2 zijn na drie weken (26 september) uit de IBC's gehaald en de zaden in bak 3 en 4 zijn na 7 weken (24 oktober) uit de IBC's gehaald.



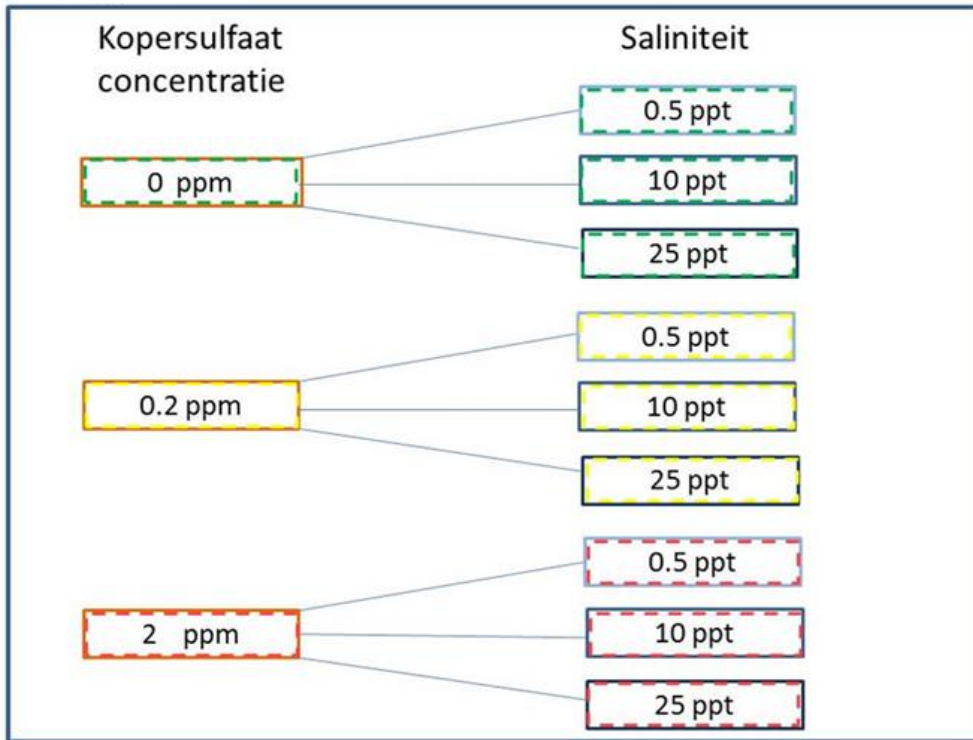
Figuur 2.1 Experiment 1: De vier bewaarbakken waarin *Z. marina* zaad koel werd bewaard tijdens de winter van 2015-2016.

2.4 Experiment 2: (Halo)Phytophthora reductie- experiment

Om te onderzoeken of kopersulfaat en/of zoutgehalte effect heeft op (*Halo*)*Phytophthora*-besmetting en zaadkieming van groot zee gras (*Zostera marina*), is de volgende experimentele opzet uitgewerkt:

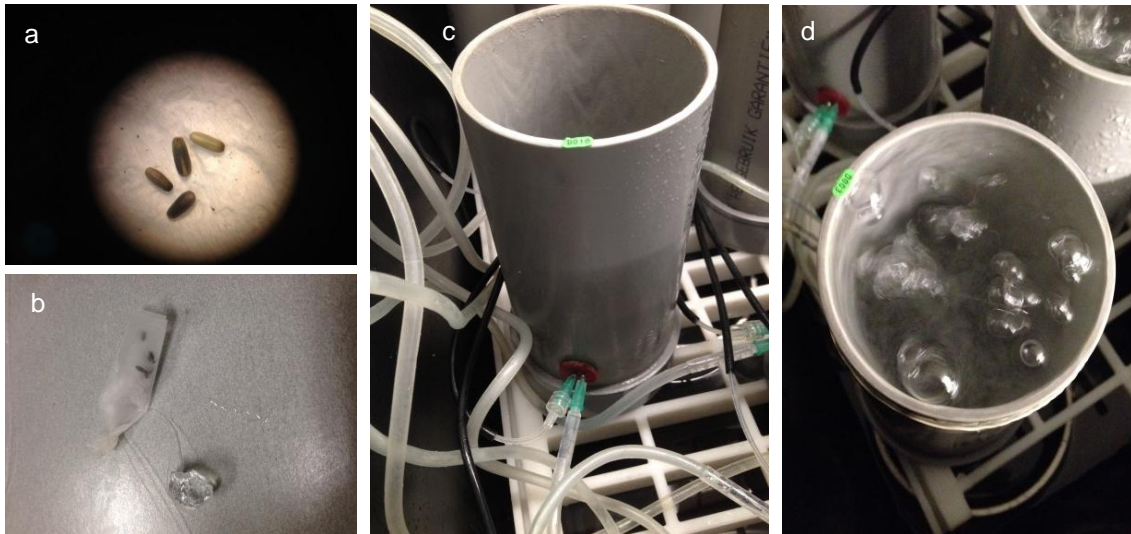
Zaden zijn bewaard in zout water met drie verschillende concentraties kopersulfaat: 0 ppm, 0.2 ppm en 2 ppm kopersulfaat (Fig. 2.2). Deze concentraties kopersulfaat werden gekruist met drie verschillende zoutgehaltes: 0.5 ppt, 10 ppt en 25 ppt zoutgehalte in het water (Fig. 2.2). Door deze behandelingen te kruisen heeft de opzet $3 \times 3 = 9$ behandelingen. Met elk 4 replica's per behandeling resulteert dit in 36 experimentele units in totaal.

Koeling 6 °C



Figuur 2.2 Experiment 2: Proefopzet van het (Halo)Phytophthora reductie-experiment. De opzet bestaat uit 3x3 = 9 behandelingen met elk 4 replica's.

Voor het (Halo)Phytophthora reductie-experiment zijn eerst rijpe zaden uitgezocht onder de binoculair op basis van een bruine kleur en stevigheid van de zaden (Fig 2.3a)(Xu *et al.* 2016). De zaden werden vervolgens in nylon theezakjes (Fig. 2.3b) in de waterkolom gehangen. Per unit zijn 20 zaden opgehangen verdeeld over twee zakjes. Een glaskraal diende als anker zodat de zakjes ongeveer halverwege de kolom hingen. Elke experimentele unit bestond uit een kolom van ongeveer 0,5 liter (Fig.2.3c) (Van der Heide *et al.* 2012). Het water werd goed belucht d.m.v. een individueel beluchtingssysteem en elke unit had een eigen wateraanvoer (Fig. 2.3c&d). De experimentele units werden geplaatst in grote lege tanks, zodat overtollig water kon overstromen, waardoor een continu doorstroomsysteem ontstond. Het water in de experimentele units werd om de dag volledig verversd door een gereguleerd pompsysteem (4 x per dag ingeschakeld voor 25 min, 5 ml/min), dat water vanuit een centrale 'behandelingsbak' (9 bakken in totaal voor alle behandelingen, 50L per bak) naar de units pompte (Fig. 2.2&2.4). Na de incubatie van 3 maanden zijn 10 zaden getest op *Phytophthora*-besmetting en kiemkracht en de resterende 10 zaden per behandeling werden uitgezaaid in gecontroleerde plots op het wad bij Uithuizen (Groningen).



Figuur 2.3 a) Rijpe zaden, b) zaden in nylon theezakjes, c) experimentele unit met lucht en watertoevoer via een membraam aan de onderzijde en d) beluchting van de units.



Figuur 2.4 Experimentele units in de zwarte bakken met toevoerbakken in het rek daaronder

2.4.1 Uitzaaïen op het Uithuizerwad

Uit elke experimentele unit (36x) zijn 10 zaden uitgezaaid op het wad bij Uithuizen (Groningen, coördinaten) op 18 maart 2016. Vanuit de units zijn de zaden overgebracht in papieren,

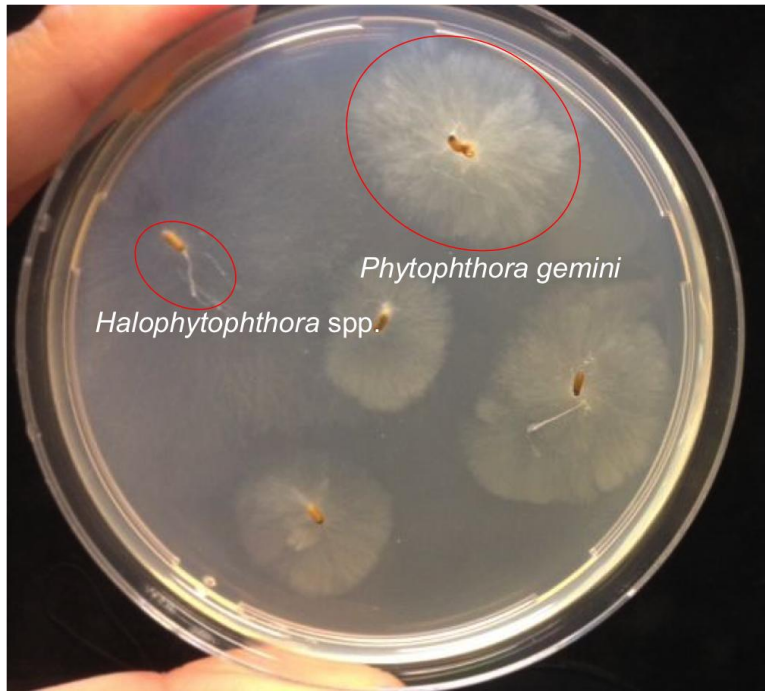
makkelijk afbreekbare theezakjes. Vervolgens zijn deze papieren theezakjes ~ 1 cm diep ingegraven en vast gezet met ankerpinnen van gegalvaniseerde ijzerdraad in plots van 1 bij 1 meter. De 36 plots zijn random verdeeld over 2 rijen van 18 plots met vergelijkbare droogvalduur en sedimentcondities. Tussen de plots zat 1 meter ruimte en tussen de rijen 2 meter. Plots zijn gemarkeerd met 2 korte pvc-buizen. Op 8 april, 4 juni en 6 juli 2016 heeft monitoring van de plots plaatsgevonden. Na het beëindigen van de proef werd in de experimentele units langzaam de saliniteit opgevoerd naar ~25-30 ppt zodat de zaden konden wennen aan veldomstandigheden.

2.5 Chemische analyses

De doorlooptijd van het behandelingswater uit de negen toevoerbakken was ongeveer drie weken (25 dagen). Kopersulfaat (CuSO_4) werd aan de centrale behandelingsbakken toegevoegd en elke week gecontroleerd met behulp van een kopertest (Hanna Copper High Range Checker® HC - HI702, JBL Cu Koper Test Set®). Bij aanvang van het experiment, liepen koperconcentraties snel af door de absorptie van koperionen in de plastic bakken, waardoor de concentraties aangevuld moesten worden. Na een opstartperiode van twee weken, bleven de koperconcentraties echter constant. Zoutbehandelingen werden aangemaakt met demiwater en Tropic Marin® synthetisch zeezout. Zoutgehalten werden elke week bepaald met de YSI 556 Handheld Multiparameter.

2.6 (Halo)Phytophthora-analyses

Na ongeveer 80 dagen ($\pm 2,5$ maanden) is het Bewaar-experiment (Experiment 1) beëindigd en na 105 dagen ($\pm 3,5$ maanden) is het (Halo)Phytophthora reductie-experiment (Experiment 2) beëindigd. Voor het Bewaar-experiment zijn de zaden in de vier opslagbakken (Fig. 2.1) getest op aanwezigheid van *P. gemini* en/of *Halophytophthora* sp. (35 zaden per bak, bewaard per bak in een 20 ml potje met 5 ml zeewater). Voor het (Halo)Phytophthora reductie-experiment is een van de twee nylon theezakjes uit elke experimentele unit gehaald. Vervolgens zijn de zaden uit het zakje gehaald en overgebracht in 20 ml potjes met een bodempje water van de betreffende experimentele behandeling. De zaden zijn vervolgens, direct na oogsten, naar het Phytophthora-lab 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. 2.5). 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. Daarnaast is ook de kleur van het kiemplantje genoteerd.



Figuur 2.5 Besmette zaden op een testplaat waarbij duidelijk een verschil te zien is tussen de snelgroeivende *Halophytophthora* spp. en de rosetvormende *Phytophthora gemini*.

2.7 Statistiek

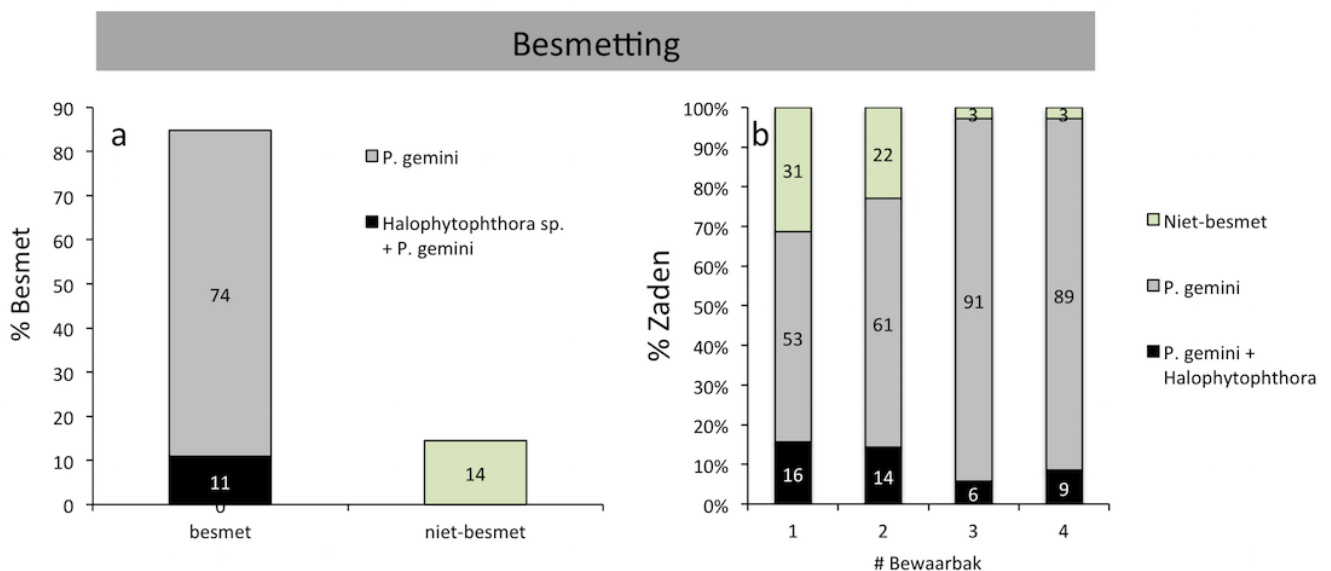
De resultaten van het Bewaar-experiment en van het *Phytophthora* reductie-experiment zijn statistisch getest met generalized linear mixed models (GLMM, lme4-package in R 3.01) met een binomiale verdeling (waarbij de uitkomst steeds was of een zaad wel/niet besmet was en vervolgens wel/niet gekiemd en groen wel/niet of bruin wel/niet gekiemd). De behandelingen zijn hierin als fixed factors meegenomen en de experimentele units als random factor. Bij de effecten op kieming is ook besmetting meegenomen als fixed factor. Bij het selecteren van de beste modellen is eerst het volledige model getest, waarbij alle behandelingen en interacties tussen behandelingen (kopersulfaat concentratie / saliniteit) zijn meegenomen. Vervolgens zijn stapsgewijs steeds de niet-significante behandelingen en interacties uit het model verwijderd, te beginnen met de 3-weg interacties (koperconcentratie * saliniteit*besmetting). Op deze wijze is het statistische model steeds verder gereduceerd totdat alleen nog significante factoren (en eventuele interacties) over waren (Crawley 2012). Totale *Phytophthora*-effecten en verschillen in effecten tussen soorten zijn aanvullend geanalyseerd met Chi-square (χ^2) tests. 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.*

3 Resultaten

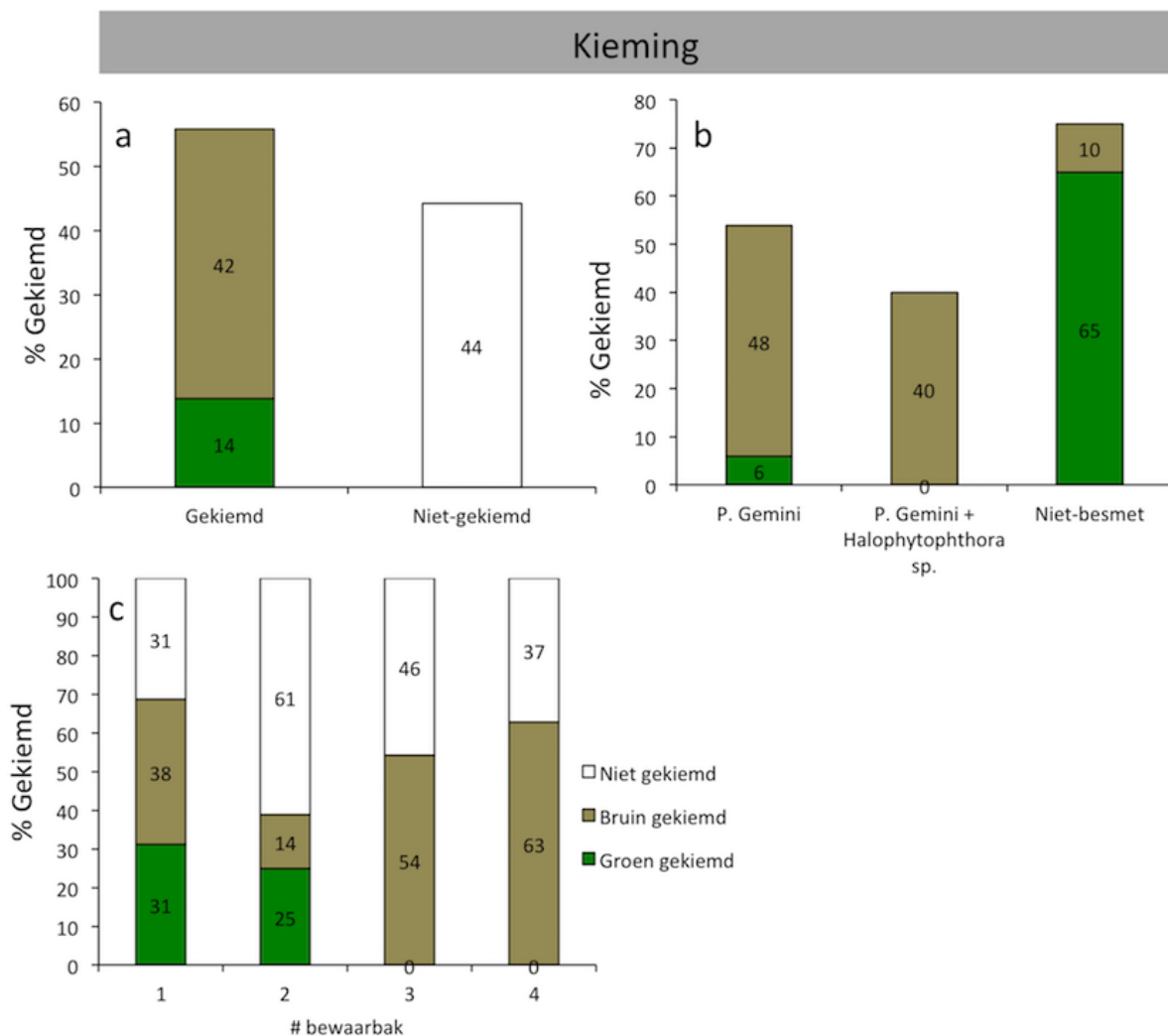
3.1 Experiment 1: Bewaar-experiment

3.1.1 Besmettingspercentages

In totaal was 86% van alle zaden in de bewaarbakken besmet door *P. gemini* (74%) of *P. gemini* + *Halophytophthora* sp. (11%) (Fig. 3.1a). Er waren geen zaden door alléén *Halophytophthora* sp. besmet. De besmettingspercentages verschilden tussen de bakken (Fig.2.1 & 3.1b). Bak 1 & 2 hadden de grootste aantallen niet-besmette zaden (31 en 22% respectievelijk), terwijl slechts 3 % van de zaden niet-besmet was in bak 3 & 4. In bak 1-4 was respectievelijk 53, 61, 91, en 89% van alle zaden besmet met *P. gemini* en 16, 14, 6, 9% door zowel *P. gemini* als *Halophytophthora* sp.



Figuur 3.1 a) Totale *Phytophthora gemini* en *Halophytophthora*-besmetting in de bewaarbakken en b) besmetting per bak.



Figuur 3.2 Kiemiingspercentages van de zaden in de bewaarbakken. Groen gekiemde zaden groeien door en bruin gekiemde zaden vormen alleen een minuscuul kiempje, maar groeien niet door. a) Gemiddelde kiemiingspercentages over alle bewaarbakken, onderverdeeld in groen gekiemd, bruin gekiemd en niet-gekiemd, b) het gemiddelde percentage gekiemde zaden bij besmetting of niet-besmetting, onderverdeeld in soort besmetting en c) het totaal kiemende zaden per bewaarbak, onderverdeeld in groen gekiemd, bruin gekiemd en niet-gekiemd.

3.1.2 Kiemiingspercentages

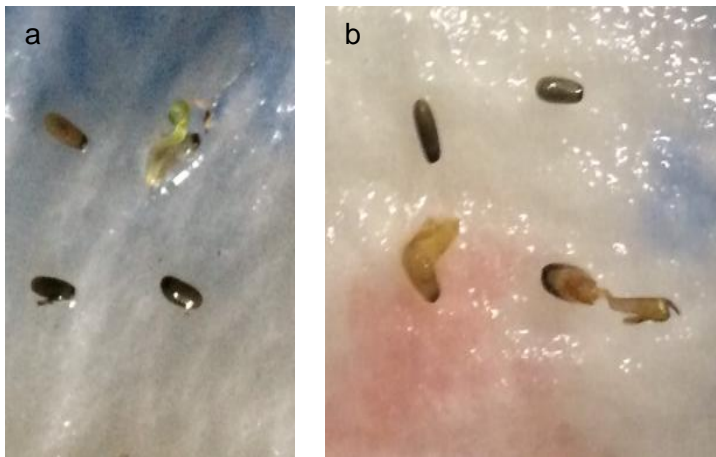
In totaal (alle bakken samen) kiemde 56% van alle zaden (Fig 3.2a). Echter, slechts 14% van de zaden in alle bewaarbakken samen had een groen kiempje, terwijl 42% van alle zaden bruin kiemde. De kleur van het jonge kiempje lijkt een maat te zijn voor de door ontwikkeling van de kiem. De NVWA heeft geen enkel bruin kiempje door zien groeien, terwijl alle groene kiempjes zich wél verder ontwikkelden (Fig. 3.3). Om deze reden beschouwen we alleen de groen gekiemde zaden als succesvol ontkiemde zaden die door kunnen groeien tot een plant.

De kiemkleur, en dus het succesvol ontwikkelen van de kiemplantjes, wordt beïnvloed door besmetting. Van de door *P. gemini* besmette zaden kiemde 48% van de zaden bruin vs. 6% van de zaden die groen kiemden (Fig 3.2b). Van de *P. gemini* + *Halophytophthora* sp. besmette zaden kiemde alle zaden bruin (40% kieming) en was het kiemingssucces dus 0%

(Fig 3.2b). In contrast tot besmette zaden kiemden de meeste niet-besmette zaden groen (65%) en maar 10% bruin (Fig 3.2b). Niet-besmette zaden kiemden dus bijna **11x** vaker (65%) dan door *P. gemini* besmette zaden (6%). Ook tussen de bakken verschilden de kiemingspercentages. Alleen in bak 1-2 kiemden zaden groen (31 en 25% resp.) en in de andere bakken slechts bruin (Fig 3.2c).

Vergelijking met 2014-2015 zaden

Govers *et al.* (2015) heeft in 2014 *Z. marina* zaden getest op kiemkracht na bewaren over de winter (januari 2015). Van deze zaden kiemde 23% van de niet-besmette zaden en 4% van de besmette zaden (6x minder kieming van besmette zaden). De kieming van de niet-besmette zaden van februari 2016 was 65% (Fig 3.2b), dus bijna 3x zo hoog als de kieming van de 2014-2015 zaden (23 vs. 65%).



Figuur 3.3. a) Groen- en b) bruin-kiemende *Z. marina* zaden

3.2 Experiment 2: (Halo)Phytophthora reductie-experiment

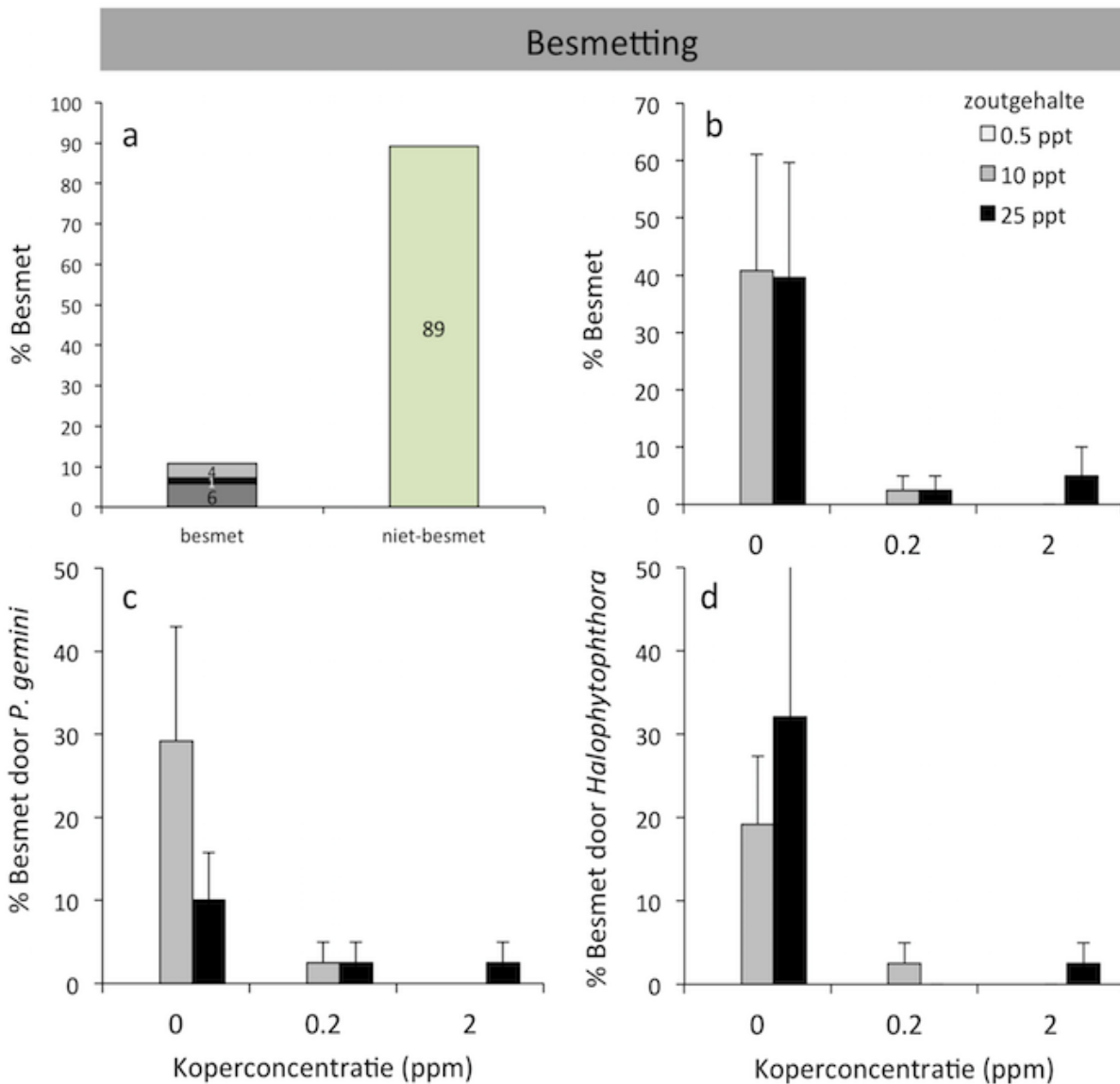
3.2.1 Besmettingspercentages

Na afloop van de experimentele behandeling zijn per experimentele unit in het (Halo)Phytophthora reductie-experiment 10 zaden gescoord op besmetting door *P. gemini* en/of *Halophytophthora* sp. In het reductie-experiment was in totaal slechts 11% van alle zaden besmet, waarvan 6% door *Halophytophthora* sp., 4% door *P. gemini* en 1% door zowel *Halophytophthora* sp. én *P. gemini*. 89% van alle zaden was niet-besmet (Fig. 3.4a). Besmettingspercentages in de units van het (Halo)Phytophthora reductie-experiment (Experiment 2) lagen dus na de experimentele periode veel lager dan in de bakken van het Bewaar-experiment (Experiment 1) (11% vs. 86%).

Totale besmettingspercentages zijn beïnvloed door zowel de zout- als de koperbehandelingen (Fig. 3.4b): de 0.5 ppt zoutbehandeling (zoet water) had als resultaat dat 0% van de zaden besmet was aan het einde van de proef, vs. gemiddeld 14 en 16% besmetting in de 10 en 25 ppt zoutbehandelingen. De koperbehandeling verminderde succesvol de totale besmettingspercentages met respectievelijk 9 en 6x minder besmetting in de 0.2 en 2 ppm koperbehandelingen dan in de 0 ppm koperbehandeling (36% besmetting). De 0.2 ppm

koperbehandeling was net zo effectief als de 2.0 ppm koperbehandeling in het reduceren van de totale besmettingspercentages.

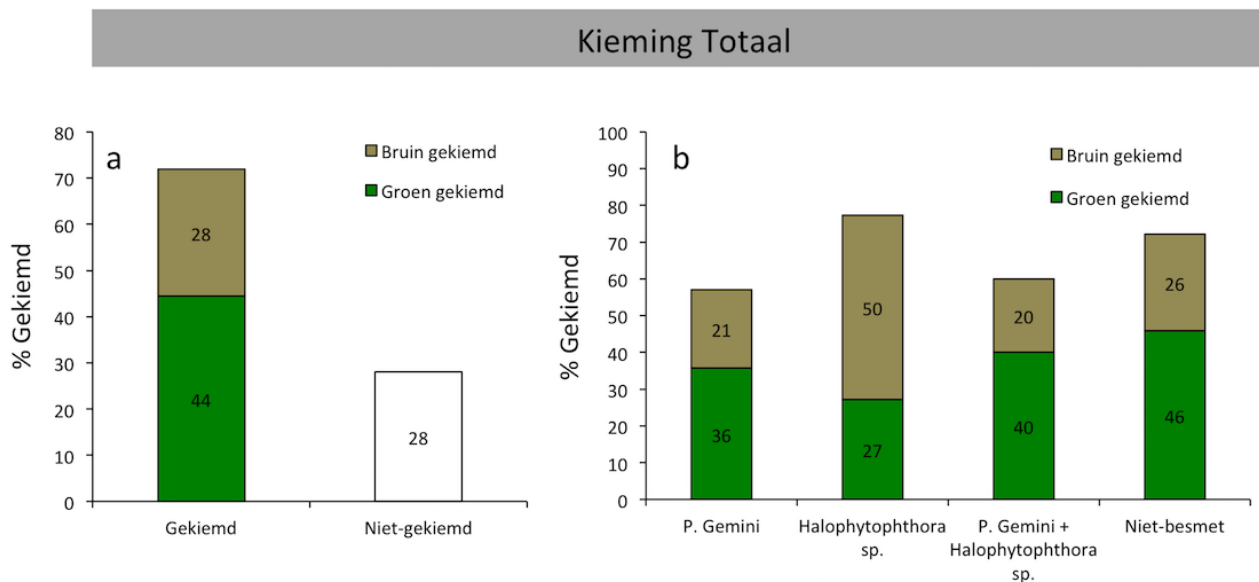
Van de niet met koper behandelde zaden bleef 36% besmet aan het eind van het experiment, wat een besmettingsreductie laat zien van 2,5 x, alleen al door zaden te bewaren in gekoeld zeewater. Er is geen verschil in de effecten van behandeling tussen zaden die besmet zijn met *Halophytophthora* sp., en *P. gemini* (Fig. 3.4c&d).



Figuur 3.4 Besmettingspercentages van de zaden in het reductie-experiment. a) Totale besmettingspercentages van alle zaden samen (donkergrijs staat voor besmetting door *Halophytophthora* sp., lichtgrijs voor besmetting door *P. gemini* en zwart voor besmetting door beide oomyceten), b) besmettingspercentages uitgesplitst per experimentele behandeling, c) besmettingspercentages *Phytophthora gemini* per behandeling en d) besmettings-percentages *Halophytophthora* sp. per behandeling. De resultaten van de 0.5 ppt zoutbehandeling zijn niet zichtbaar omdat deze overal 0% waren.

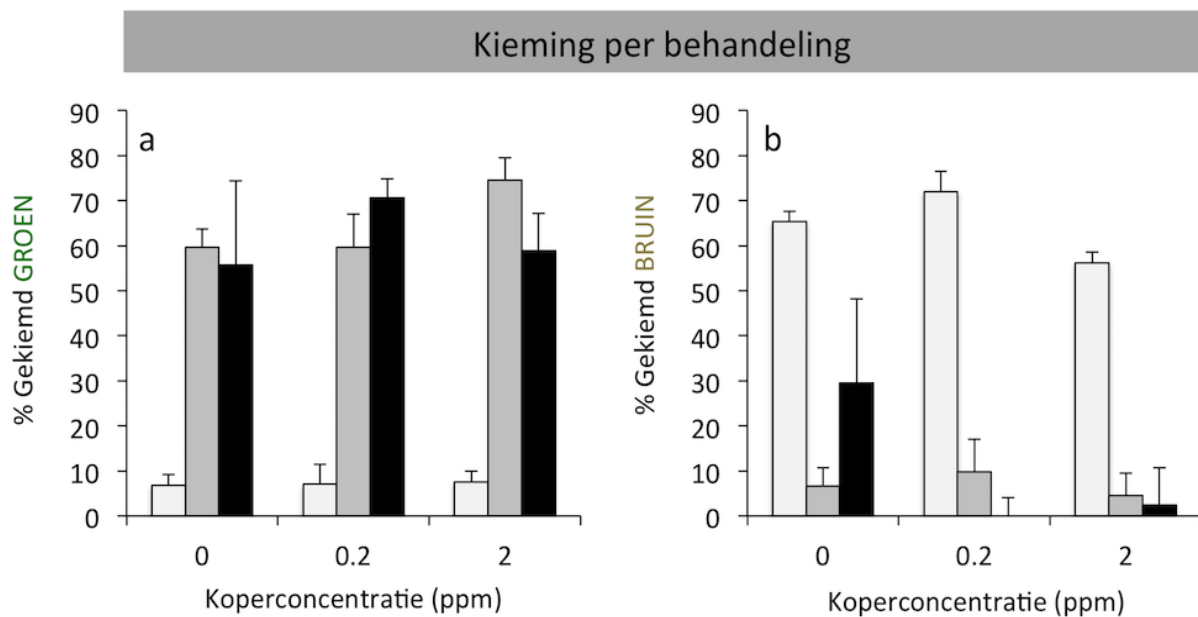
3.2.2 Kiemingspercentages

In totaal kiemde 72% van alle zaden in de proef en 28% van de zaden kiemde niet. Van de 72% van zaden die wel kiemden, was 28% bruin en 44% groen. (Fig. 3.5a). De groen-kieming in het (*Halo*)*Phytophthora* reductie-experiment (Experiment 2) is daarmee 3.1 x hoger dan in het Bewaar-experiment (Experiment 1) (44 vs. 14 %). Van de door *Halophytophthora* sp. besmette zaden kiemde maar 27% groen (1.7x minder kieming in vergelijking met niet-besmette zaden), van de door *P. gemini* besmette zaden 26% (1.8x minder) en van de door zowel *P. gemini* als *Halophytophthora* sp. besmette zaden kiemde 40% groen (1.2x minder). Het gaat hierbij echter om zeer weinig besmette zaden (41 totaal, 14 besmet door *P. gemini*, 22 besmet door *Halophytophthora* sp., 5 besmet door beide, verdeeld over 9 behandelingen) in vergelijking met niet-besmette zaden (n= 342). Hierdoor zijn de effecten van de afzonderlijke (*Halo*)*phytophthora* soorten op de kieming niet met 100% zekerheid vast te stellen.



Figuur 3.5 Kiemingspercentages zaden koperexperiment a) Totale kiemingspercentages van alle zaden onderverdeeld in groen, bruin en niet-gekiemde zaden en b) kiemingspercentages

Kiemingspercentages werden beïnvloed door zowel infectie als zoutgehalte (Fig. 3.6). Dit gold voor zowel groenkieming als bruinkieming. Geïnfecteerde zaden kiemden minder vaak dan niet-geïnfecteerde zaden (1.5x minder). Infectie in de experimentele units van dit (*Halo*)*Phytophthora* reductie-experiment (Experiment 2) lijkt minder negatieve effecten te hebben gehad op de zaadkieming dan in de bakken van het Bewaar-experiment (Experiment 1) (1.5x minder kieming in het experiment vs. 11x minder kieming in bewaarbakken). Effecten verschilden niet tussen (*Halo*)*Phytophthora* soorten. De koperbehandeling had geen direct effect op kieming (Fig. 3.6), maar alleen een indirect effect door *Phytophthora*-besmetting te reduceren. Echter, zoutgehalte had wel een sterk effect op zaadkieming (Fig. 3.6): zaden die bij een zoutgehalte van 0.5 ppt waren bewaard kiemden 9x minder groen en 7x vaker bruin dan zaden die bij 10 en 25 ppt waren bewaard.



Figuur 3.6 Overzicht van de kiemingspercentages per behandeling. a) Groen gekiemde zaden en b) bruin gekiemde zaden per behandeling.

3.3 Uitzaaien op Uithuizerwad

Na het uitzaaien op het wad bij Uithuizen is er in 3 van 36 plots, 1 groot zee gras plantje terug gevonden. De plantjes in deze 3 plots stonden er zowel op 4 juni als op 6 juli 2016. Door de zeer lage opkomst kan niet getest worden of de kopersulfaat en zoutgehaltebehandelingen effect hadden op kieming en groei in het veld.



Figuur 3.7 a) Plots op Uithuizerwad en b) Groot zee gras in één van de plots

4 Conclusies en implicaties voor zeegrasherstel

In dit onderzoek zijn twee experimenten uitgevoerd. Het eerste experiment laat zien dat zeegraszaden op relatief grote schaal bewaard kunnen blijven over de winter, mits onder de juiste omstandigheden (zie paragraaf 4.4). Het tweede experiment laat zien dat (*Halo*)*Phytophthora*-besmetting van zeegraszaden sterk gereduceerd kan worden (met 86 %) door kopersulfaat toe te voegen aan het zeewater waarin de zaden bewaard worden.

4.1 Experiment 1: Bewaar-experiment

Samenvatting resultaten

In totaal was 86% van alle zaden in de bakken van het Bewaar-experiment besmet door *P. gemini* of *P. gemini* + *Halophytophthora* sp. De besmettingspercentages verschilden tussen de bakken. De bakken 1 & 2 (met zaden die na 3 weken uit het donormateriaal gehaald waren) hadden de grootste aantallen niet-besmette zaden (31 en 22% respectievelijk), terwijl slechts 3 % van de zaden niet-besmet was in bak 3 & 4 (met zaden die na 7 weken uit het donormateriaal gehaald waren). In totaal kiemde 56% van alle zaden. Echter, slechts 14% van alle zaden in de bakken van het Bewaar-experiment had een groen kiempje, terwijl 42% van alle zaden bruin kiemde. Ook tussen de bakken verschilden de kiemingspercentages. Alleen in bak 1 & 2 kiemden zaden groen en in de andere bakken slechts bruin. Er zit dus een groot verschil in besmettings- en kiemingspercentages tussen de bakken 1 & 2 en 3 & 4. Een verklaring hiervoor zou kunnen zijn dat in de bakken 3 & 4 organisch materiaal zich langer heeft opgehoopt waardoor er mogelijk rotting in de IBC's is ontstaan. Hierdoor heeft *Phytophthora* zich sneller kunnen uitbreiden.

Conclusie

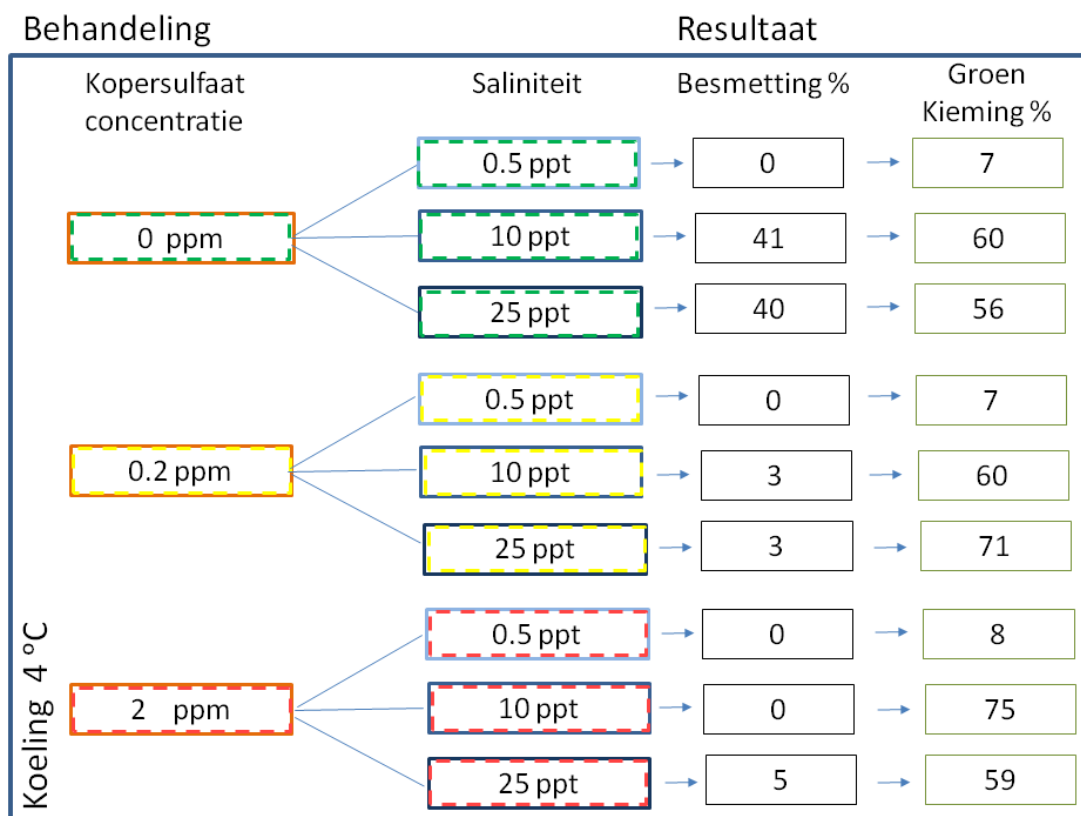
1. Besmetting met *Phytophthora* verlaagt het kiemingspercentage en beïnvloedt negatief de conditie van de kiempjes (meer bruine kiempjes) waardoor de ontwikkeling van de kiemplantjes geremd wordt.
2. Om (*Halo*)*Phytophthora*-besmetting te beperken is het belangrijk om de periode tussen het verzamelen van het donormateriaal en het scheiden van de zaden van het materiaal zo kort mogelijk te houden.

4.2 Experiment 2: (*Halo*)*Phytophthora* reductie- experiment

Samenvatting resultaten

In het (*Halo*)*Phytophthora* reductie-experiment was in totaal slechts 11% van alle zaden besmet. De 0.5 ppt zoutbehandeling (zoet water) had als resultaat dat 0% van de zaden besmet was aan het einde van de proef vs. gemiddeld 14 en 16% besmetting in de 10 en 25 ppt zoutbehandelingen (Fig. 4.1). De koperbehandeling verminderde succesvol de totale besmettingspercentages (Fig. 4.1). De 0.2 ppm koperbehandeling was net zo effectief als de 2.0 ppm koperbehandeling in het reduceren van de totale besmettingspercentages. In totaal kiemde 72% van alle zaden in de proef, waarvan 28% bruin en 44% groen kiemde. Geïnfecteerde zaden kiemden minder vaak dan niet-geïnfecteerde zaden. Echter, zoutgehalte had ook een sterk effect op zaadkieming: zaden die bij een zoutgehalte van 0.5 ppt waren bewaard kiemden minder groen dan zaden die bij 10 en 25 ppt waren bewaard (Fig. 4.1). Mogelijk komt dit door algen die gedijen in het 'zoete' water en concurreren met

(Halo)Phytophthora, maar zelf ook een negatief effect hebben op de kieming. Een slijmerige laag om de zaden onderschrijft dit idee. De koperbehandeling zelf had geen direct effect op kieming. Besmettingspercentages in de units van het (Halo)Phytophthora reductie-experiment (Experiment 2) lagen na de experimentele periode veel lager dan in de bakken van het Bewaar-experiment (Experiment 1) na dezelfde periode. Dit wijst er op dat het bewaren van kleine hoeveelheden zaden (10-20 zaden) met dagelijks vers water tot minder besmetting leidt dan het bewaren van grote hoeveelheden zaden (duizenden zaden) met minder vaak vers water.



Figuur 4.1. Overzicht van effecten van de verschillende behandelingen op besmettingspercentage en kieming. Bij de kieming gaat het om de zaden die succesvol groen kiemden.

Conclusies

1. Behandeling met kopersulfaat van de zaden reduceert besmetting met 86% en heeft geen direct (negatief) effect op de kieming.
2. De concentraties 0.2 ppm en 2 ppm kopersulfaat zijn even effectief.
3. Behandeling met zoet/brak water remt de besmetting met 100%, maar zorgt ook voor een 9 x lagere groenkieming en heeft daarmee een sterk negatief effect op de ontwikkeling van kiemplantjes.
4. Voor het bewaren op grotere schaal is het belangrijk om niet te veel zaden per bak te bewaren en de bewaarbakken van een continue waterdoorstroming te voorzien.

4.3 Uitzaaien op Uithuizerwad

Samenvatting resultaten

Door de zeer lage opkomst in het veld kon niet getest worden of de kopersulfaat- en zoutgehaltebehandelingen effect hadden op kieming en groei in het veld. Het lijkt er echter op dat de zaden in een vroeg stadium al verloren zijn gegaan. De drie zaden die uitgroeiden tot plant overleefden in ieder geval wel van mei tot juli.

Conclusie

Om meer te weten te komen over de kieming en groei in het veld van zaden die met kopersulfaat zijn behandeld, is meer onderzoek nodig.

4.4 Aanbevelingen voor zeegrasherstel

Dit onderzoek leidt tot de volgende aanbevelingen:

1. Het bewaren van zaad gedurende de winter kan (*Halo*)*Phytophthora* besmetting reduceren en het kiemingspercentage vergroten, mits de volgende stappen worden gevolgd:
 - a. Rijpe zaden zo snel mogelijk uit het donormateriaal halen om besmetting met (*Halo*)*Phytophthora* te beperken.
 - b. Niet te veel zaden per bak bewaren en de bewaarbakken voorzien van een continue waterdoorstroming.
 - c. Zaden gekoeld bewaren (6°C) in zout water met een saliniteit van ~25 ppt.
 - d. Zaden met kopersulfaat (0,2 ppm) behandelen gedurende de bewaarperiode.
2. Op basis van de veldproef is nog niet met zekerheid te zeggen of zaden die bewaard zijn over de winter en behandeld zijn met kopersulfaat en vervolgens uitgezaaid zijn in het voorjaar, beter overleven in het veld dan onbehandelde zaden die zijn uitgezaaid in het najaar met de BUDS (buoy deployed seeding)-methode (Pickerell *et al.* 2005). Het bewaren over de winter heeft echter wel veel potentie voor zeegrasherstel door de lagere (*Halo*)*Phytophthora*-besmetting en de hogere kiemingspercentages. De zaaimethode van 'behandelde' zaden moet daarom nader onderzocht worden. Hierbij kan gedacht worden aan experimenten in het voorjaar met deze zaden in BUDS, injecteren van zaden in de bodem of het aanbrengen van een platte structuur op/in het wad met daarin de zaden.
3. Tijdens het experiment is gedurende een langere tijd kopersulfaat toegevoegd en verwachten we dat een korte toediening van kopersulfaat weinig effect zal hebben. Veldproeven met behandeling van zeegrasplanten met kopersulfaat (ontsmetten van zeegrasvelden ed.) zijn om die reden af te raden. Als gevolg van stroming en getij zal kopersulfaat maar heel kort werkzaam kunnen zijn in een zeegrasveld.
4. Op basis onze resultaten is voor de volgende punten nader onderzoek nodig:
 - a. Zaaimethode in het veld van zaden die bewaard zijn over de winter.
 - b. Overleving en kieming van zaden in het veld die zijn bewaard over de winter en zijn behandeld met kopersulfaat.
 - c. Overleving van kieming naar zaailing naar volwassen plant.

5 Literatuur

- Crawley, M. J. *The R Book*. (Wiley, 2012).
- Delefosse, M., & Kristensen, E. Burial of *Zostera marina* seeds in sediment inhabited by three polychaetes: laboratory and field studies. *Journal of Sea Research* 71:41-49. 10.1016/j.seares.2012.04.006 (2012).
- Dooley, F. D., Wyllie-Echeverria, S. & Van Volkenburgh, E. Long-term seed storage and viability of *Zostera marina*. *Aquatic Botany* 111, 130-134 (2013).
- Eriander, L., Infantes, E., Olofsson, M., Olsen, J.L., and Moksnes, P.O. Assessing methods for restoration of eelgrass (*Zostera marina* L.) in a cold temperate region. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 479:76-88 (2016).
- Erwin, D. C. *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology, and pathology*. (American Phytopathological Society Press, (1983).
- Govers, L. L., Meffert, J.P., Van Rijswijk, P.C.J., Man in 't Veld, W., Heusinkveld, J.H.T., Van Katwijk, M.M., Bouma, T.J & Van der Heide, T. Effecten van *Phytophthora spp.*-besmetting op de zaadkieming van groot zeegras (*Zostera marina*). Radboud Universiteit (2015).
- Govers, L.L., Man in 't Veld W., Meffert J.P., Bouma, T.J., Van Rijswijk P.C.J., Heusinkveld J.H.T., Orth R.J., Van Katwijk M.M., & Van der Heide T. Marine *Phytophthora* species can hamper conservation and restoration of vegetated coastal ecosystems. *Proceedings of the Royal Society B*. DOI: 10.1098/rspb.2016.0812 (2016)
- Guest, D. & Grant, B. The complex action of phosphonates as antifungal agents. *Biological Reviews* 66, 159-187 (1991).
- Harwell, M.C., & Orth, R.J. Eelgrass (*Zostera marina* L.) seed protection for field experiments and implications for large-scale restoration. *Aquatic Botany* 64:51-61 (1999).
- 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).
- Infantes, E., Eriander, L., & Moksnes, P.O. Eelgrass (*Zostera marina*) restoration on the west coast of Sweden using seeds. *Marine Ecology Progress Series* 546:31-45. 10.3354/meps11615 (2016).
- Kishima, J., Harada, S. & Sakurai, R. Suitable water temperature for seed storage of *Zostera japonica* for subtropical seagrass bed restoration. *Ecological Engineering* 37, 1416-1419 (2011).
- Leach, S. S. Effects of copper and copper fungicide soil residues on *Phytophthora infestans*. *American Potato Journal* 43, 431-438 (1966).
- 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).
- 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).
- Marion, S. R. & Orth, R. J. Innovative Techniques for Large-scale Seagrass Restoration Using *Zostera marina* (eelgrass) Seeds. *Restoration Ecology* 18, 514-526, (2008).
- Meadows, I. M., Colburn, G. C. & Jeffers, S. N. Evaluation of a copper hydroxide-based algicide to eliminate propagules of *Phytophthora spp.* in naturally infested streams in South Carolina, USA: a preliminary report. *New Zealand Journal of Forestry Science* 41S, S3-S5 (2011).
- Pan, J., Jiang, X., Li, X., Han, H., Zhang, Z., Li, Z., Yu, S., Song, S., Wu, R., Jiang, Y., Zhao, N., and Yang, G. An effective method for collecting and storing seeds from *Zostera marina* (Eelgrass) in the Yellow Sea, China. *Restoration Ecology* 22, 716-722 (2014).

- Pickerell, C., Scott, S. & Wyllie-Echeverria, S. Buoy-deployed seeding: demonstration of a new eelgrass (*Zostera marina* L.) planting method. *Ecological Engineering* 25, 127-136 (2005).
- Tanner, C. E. & Parham, T. Growing *Zostera marina* (eelgrass) from seeds in land-based culture systems for use in restoration projects. *Restoration Ecology* 18, 527-537 (2010).
- Van der Heide, T., Govers, L.L., de Fouw, J., Olf, H., van der Geest, M., van Katwijk, M.M., Piersma, T., van de Koppel, J., Silliman, B.R., Smolders, A.J.P., and van Gils, J.A. A three-stage symbiosis forms the foundation of seagrass ecosystems. *Science* 336:1432-1434 (2012).
- Van Katwijk, M.M., & Wijgergangs, L. Effects of locally varying exposure, sediment type and low-tide water cover on recruitment from seed. *Aquatic Botany* 80:1-12. 10.1016/j.aquabot.2004.04.003. (2004).
- Wilkens, S. & Field, C. C. Effect of varying sea-water salinity on growth kinetics of *Phytophthora polymorphica*. *Mycol. Res.* 97: 1135-1139 (1993).
- Xu, S., Zhou, Y., Wang, P., Wang, F., Zhang, X., and Gu, R. Salinity and temperature significantly influence seed germination, seedling establishment, and seedling growth of the eelgrass *Zostera marina* L. *PeerJ* (2016).

Bijlage 1 Literatuuroverzichten

Literatuuroverzicht bewaarmethodes *Z. Marina* zaden

Soort	Temperatuur (optimum)	Saliniteit (Optimum)	Anders	Bron
<i>Z. marina</i>	Highest germination at 4°C storage (in contrast to 21-24 and 23-28°C).	Highest germination during storage at 12 ppt (vs. 20 and 30 ppt). Low seed survival at higher temperatures and low salinity. High seed survival at 20-30ppt	Aeration: max yield with low air (not too oxygenated) Viability: a fall rate >5 cm s ⁻¹ seems to predict germination success (firm seeds).	Marion & Orth 2010 Chesapeake, US
<i>Z. Marina</i>	Highest germination rate after storage at 4°C (vs. 14, 20°C)	Highest germination rate after storage at high (44.7 ppt) salinity (vs. 31.2, 37.4).		Pan et al. 2014 Yellow Sea, China
<i>Z. japonica</i>	Seeds stored at lower temperatures (4°C vs. 23°C) had higher germination potential	n.a.	Seeds stored at high temperature seemed degraded by bacteria and mold	Kishima et al. 2011 Japan
<i>Z. marina</i>	Cold storage of seeds prior to planting enhanced germination and seedling survival			Tanner & Parham 2010 Chesapeake US
<i>Z. capricorni</i>	Seed germination wast faster at higher temperatures (26°, 16° vs. 6°C)	Under constant temperature (16°C), salinity did not affect seed germination	Seeds germinated faster under anaerobic then under aerobic conditions	Brenchley & probert 1998 Australia
<i>Z. capricorni</i>	Temperature did not affect seed germination at low (1-10ppt) salinities, but at higher salinities (20-40 ppt), seeds only germinated at low temperatures (<15°C).	Low salinities (1-10ppt) promoted rapid seed germination	Most successful storage was at 5-10°C in aerated water.	Conacher et al. 1994 Australia
<i>P. japonicus</i>	Seeds stored at 4°C had the highest germination rates (vs. -20°,30°), but showed rapid decreased germination after 60 days and n germination after 180 days			Park et al. 2014 South Korea
<i>Z. marina</i>			Seed viability steadily decreased over time.	Dooley et al. 2013

			Viability of fresh seeds was approximately 77%, whereas of 4 year old seeds only 32% was viable. Germination rates were consistent with, but lower than viability rates. (15% after 3 years).	Washington, US
<i>Z. marina</i>	Highest germination after storage at 4°C (vs. -20 and 30°C and room temperature)		High germination rates until 10-60 days of storage, but rapidly decreasing germination rates after an no germination after 240 days.	Park 2014 South Korea
<i>Z. marina</i>			Seed germination was triggered by anaerobic conditions and seasonal temperature changes (~15°C).	More et al. 1993

Literatuuroverzicht behandeling/reductie *Phytophthora* spp.

<i>Phytophthora</i>	Host	Fungicide	Reference
<i>P. capsici</i>	Summer squash	Application of fungicide in soil drenches was more effective than foliar application. No fungicide completely prevented symptoms. Drenches of fluopicolide, mandipropamid, dimethomorph limited plant death and prevented yield loss	Meyer & Hausbeck 2013
<i>Phytophthora</i>		Most species of <i>Phytophthora</i> were found to be sensitive to phosphonates. Phosphonates are salts or acids of phosphonic acid (HPO(OH) ₂). However large variations observed in different media and growth stages. Difference is vulnerability among species: <i>P. Clandestina</i> , <i>P. Cinamomi</i> , <i>P. Citricola</i> are the most vulnerable. <i>P. Capsici</i> , <i>P. Infestans</i> , <i>P. Megasperma</i> the least.	Guest et al. 1991
<i>P. cinnamomi</i>	Avocado	Phosphonic acid was injected in trunks to control <i>P. cinnamomi</i>	Guest et al. 1991
<i>Phytophthora</i> spp.		Algicides containing copper hydroxide (Cu(OH) ₂) were used to treat stream water naturally containing <i>Phytophthora</i> species. The algicide was effective and lethal to zoospores, sporangia and chlamydospores of <i>Phytophthora</i> at a range (5-22°C) of temperatures	Meadows et al. 2011
<i>P. cinnamomi</i>	Forest	Copper sulfate (CuSO ₄) was used to eradicate <i>P. Cinnamomi</i> in Australian forest soils with concentrations up to 5 g CuSO ₄ /kg soil (within 2h).	Howard et al. 1998

Bijlage 2 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: $P < 0.001$ ***, $0.001 < P < 0.01$ **, $0.01 < P < 0.05$ *.

Bewaar-experiment

Besmetting bewaarbakken

Tabel 1 resultaten χ^2 test vergelijking besmetting bewaarbakken

		Baknummer			
	verwacht	observed_1	observed_2	observed_3	observed_4
P. Gemini	74	53	61	89	89
Halo+gemini	11	16	14	9	9
niet-besmet	14	31	22	3	3
	P	1.1784E-06	0.02766	0.0017	0.0017
		***	*	*	*

Tabel 2 resultaten GLMM verschillen in totale besmettingspercentages tussen trays

	Estimate	Std. Error	z	P	
(Intercept)	-0.3668	0.5733	-0.64	0.522357	
tray	1.0084	0.2885	3.495	0.000474	***

Tabel 3 resultaten GLMMs verschillen besmettingspercentages tussen trays voor *P. gemini* en *P. gemini + Halophytophthora sp.*-besmetting afzonderlijk

<i>P. gemini</i>					
	Estimate	Std. Error	z	P	
(Intercept)	-0.7397	0.4816	-1.536	0.124567	
tray	0.7846	0.2071	3.789	0.000151	***
<i>P. Gemini + Halophytophthora sp.</i>					
	Estimate	Std. Error	z	P	
(Intercept)	-1.3566	0.6323	-2.145	0.0319	*
tray	-0.31	0.2541	-1.22	0.2226	n.s.

Kieming bewaarbakken

Tabel 4 resultaten χ^2 tests vergelijking kieming besmette zaden (observed *P. gemini* of *P. gemini* + *Halophytophthora* sp.) tegenover niet-besmette zaden (verwacht)

P. gemini		
	verwacht	observed
groen kieming	65	6
bruin kieming	10	48
niet-gekiemd	25	46
	<i>P</i>	1.10803E-47

P. Gemini + Halophytophthora		
	verwacht	observed
groen kieming	65	0
bruin kieming	10	40
niet-gekiemd	25	60
	<i>P</i>	5.03458E-45

Tabel 5 resultaten χ^2 test vergelijking kieming bewaarbakken

	verwacht	observed_1	observed_2	observed_3	observed_4
groen kieming	14	31	25	0	0
bruin kieming	42	38	14	54	63
niet-gekiemd	44	31	61	46	44
		1.7771E-06	3.27062E-08	0.000167072	5.87428E-06
		***	***	***	***

Tabel 6 resultaten GLMMs voor verklaring kieming_groen aan de hand van infectie voor totaal geïnfecteerd en apart voor infectie door *P. gemini*. Niet apart voor besmetting door *Halophytophthora* omdat er geen zaden alléén door *Halophytophthora* geïnfecteerd waren.

germinated_green ~ infected					
	Estimate	Std. Error	z value	P	
(Intercept)	0.5269	0.5777	0.912	0.362	
infected	-3.5467	0.6419	-5.525	3.29E-08	***
germinated_green ~ infected_gemini					
	Estimate	Std. Error	z value	P	
(Intercept)	0.5255	0.579	0.908	0.364	
infected_gemini	-3.537	0.6421	-5.509	3.62E-08	***

Tabel 7 resultaten GLMMs voor verklaring kieming_bruin aan de hand van infectie voor totaal geïnficeerd en apart voor infectie door *P. gemini*. Niet apart voor besmetting door *Halophytophthora* omdat er geen zaden alléén door *Halophytophthora* geïnficeerd waren

germinated_brown ~ infected					
	Estimate	Std. Error	z value	P	
(Intercept)	-2.1276	0.7872	-2.703	0.00688	**
infected	2.0259	0.7741	2.617	0.00886	**
germinated_brown ~ infected_gemini					
	Estimate	Std. Error	z value	P	
(Intercept)	-2.1258	0.7924	-2.683	0.0073	**
infected_gemini	2.0024	0.7749	2.584	0.00976	**

Vergelijking 2014-2015

Tabel 8 Resultaten χ^2 test vergelijking 2014-2015 en 2015-2016 zaden

	2014-2015	2015-2016
	verwacht	observed
kieming niet-besmet	23	65
kieming besmet	4	6
	P	1.20206E-18

Phytophthora reductie-experiment

Besmetting reductie-experiment

Tabel 9 Resultaten χ^2 test vergelijking besmetting bewaarbakken en besmetting proef

	bewaarbakken	proef
	verwacht	observed
Halophytophthora sp.	0.1	6
P. gemini + Halophytophthora	11	1
P. gemini	74	4
niet-besmet	14	89
	P	2.2518E-174

Tabel 10 Resultaten GLMM voor de verklaring besmet_totaal door de experimentele behandelingen (saliniteit + koper). Deze tabel geeft de resultaten weer voor het beste model (laagste AIC).

	Estimate	Std.Error	z value	P	
(Intercept)	-6.2586	1.7463	-3.584	0.000339	***
saliniteit	0.198	0.0897	2.208	0.027269	*
koper	-2.5447	1.2592	-2.021	0.043288	*

Tabel 11 Resultaten GLMMs besmetting apart voor besmetting door *P. gemini* en *Halophytophthora* sp.

infected_gemini ~ salinity * copper					
	Estimate	Std.Error	z value	P	
(Intercept)	-3.1531	1.09108	-2.89	0.00385	**
koper	-16.6206	10.51784	-1.58	0.11405	
saliniteit	0.01579	0.05504	0.287	0.77416	
koper:saliniteit	0.62502	0.42216	1.48	0.13873	
infected_halo ~ salinity + copper					
	Estimate	Std.Error	z value	P	
(Intercept)	-6.648	1.9708	-3.373	0.000743	***
koper	-1.9277	1.2158	-1.586	0.112845	
saliniteit	0.15	0.0868	1.728	0.084039	.

Tabel 12 Resultaten GLMMs per besmettingstype (*P. gemini* en *Halophytophthora* sp.) zónder de 0.5 ppt zoutbehandeling.

infected_gemini ~ salinity * copper					
	Estimate	Std.Error	z value	P	
(Intercept)	0.21882	1.04819	0.209	0.8346	
koper	-24.64033	10.68573	-2.306	0.0211	*
saliniteit	-0.12673	0.05739	-2.208	0.0272	*
koper:saliniteit	0.96136	0.42944	2.239	0.0252	*
infected_halo ~ copper					
	Estimate	Std.Error	z value	P	
(Intercept)	-3.25765	0.00166	-1962	<2e-16	***
koper	-1.76441	0.00166	-1063	<2e-16	***

Kieming reductie-experiment

Tabel 13 resultaten χ^2 test vergelijking kieming bewaarbakken vs. Kieming proef

	bewaarbakken	proef
	expected	observed
Groen gekiemd	14	44
Bruin gekiemd	42	28
niet-gekiemd	44	28
	<i>P</i>	5.80468E-17

Tabel 14 resultaten χ^2 test vergelijking kieming per besmettingstype met gemiddelde kiemingspercentages en met kiemingspercentages bewaarbakken

	gemiddeld	<i>P. Gemini</i>	<i>Halophytophthora sp.</i>	beide	niet-besmet
	Expected	Observed	Observed	Observed	Observed
groen gekiemd	44	26	27	40	46
bruin gekiemd	28	16	50	20	0
niet gekiemd	28	58	23	40	54
	<i>P</i>	2.01612E-10	4.22971E-06	0.02032093	4.5455E-12
		***	***	*	***
	bewaarbakken	<i>P. Gemini</i>	<i>Halophytophthora sp.</i>	beide	niet-besmet
	Expected	Observed	Observed	Observed	Observed
groen gekiemd	14	26	27	40	46
bruin gekiemd	42	16	50	20	0
niet gekiemd	44	58	23	40	54
		2.01445E-07	7.43745E-06	8.58152E-14	3.18808E-26
		***	***	***	***

Tabel 15 resultaten χ^2 test vergelijking kiemingspercentages besmette zaden (per type) met niet-besmette zaden voor alle kiemingstypen en voor alleen groen-gekiemde zaden

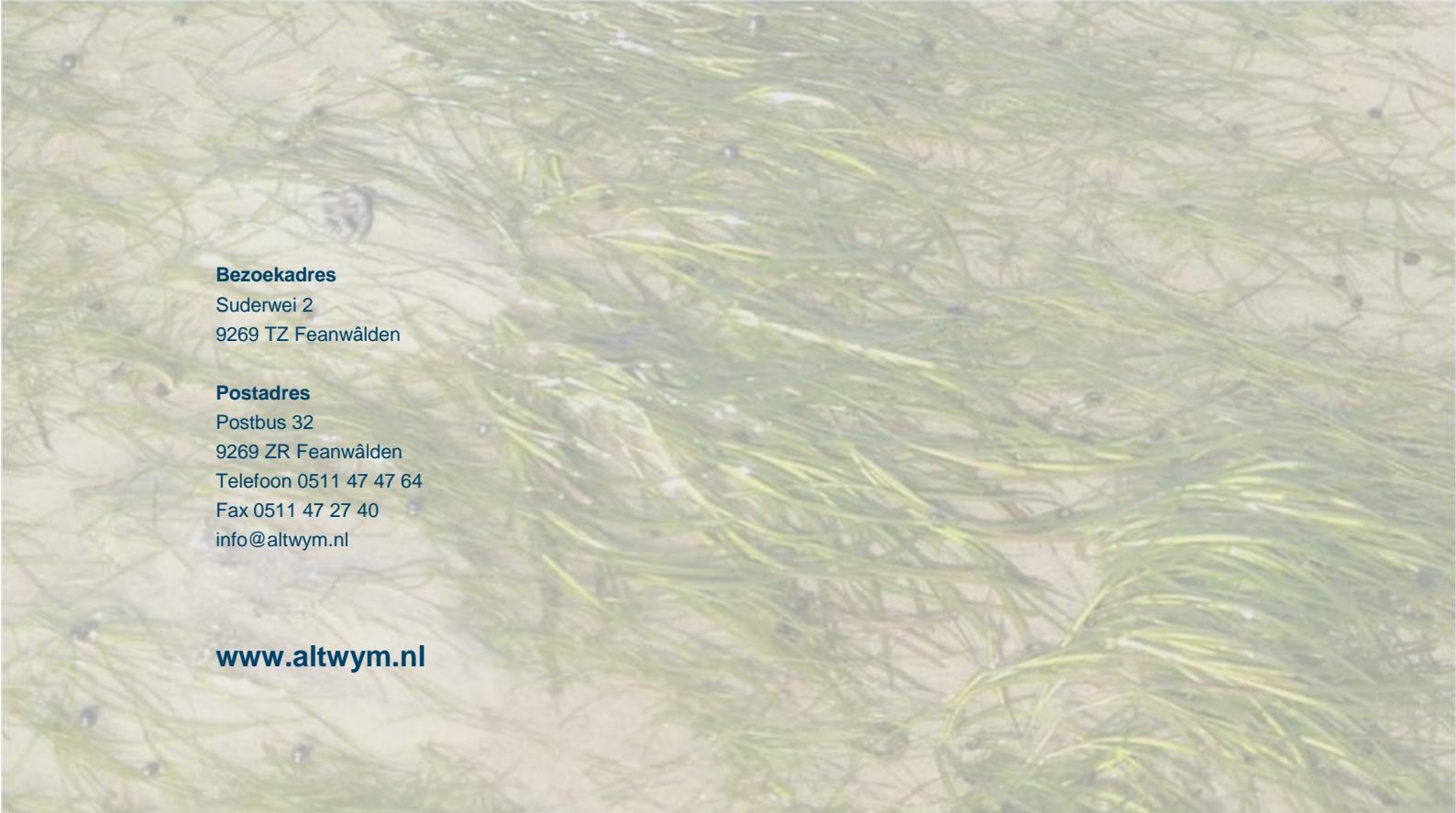
	niet-besmet	<i>P. Gemini</i>	<i>Halophytophthora sp.</i>	beide
groen gekiemd	46	26	27	40
bruin gekiemd	0	16	50	20
niet gekiemd	54	58	23	40
	<i>P</i>	1.33357E-07	1.46663E-23	2.49805E-06
		***	***	***
	niet-besmet	<i>P. Gemini</i>	<i>Halophytophthora sp.</i>	beide
groen gekiemd	46	26	27	40
rest	54	74	73	60
	<i>P</i>	5.9987E-05	0.000137725	0.228644262
		***	***	ns

Tabel 16 Resultaten GLMMs voor verklaring kieming_groen door besmetting_totaal, besmetting_gemini en besmetting_groen

germination_green ~ salinity + infected_total					
	Estimate	Std.Error	z value	P	
(Intercept)	-1.62992	0.34468	-4.729	2.26E-06	***
saliniteit	0.11793	0.02155	5.473	4.43E-08	***
Besmetting_totaal	-1.51093	0.51248	-2.948	0.0032	**
germination_green ~ salinity + infected_gemini					
	Estimate	Std.Error	z value	P	
(Intercept)	-1.67838	0.36313	-4.622	3.80E-06	
saliniteit	0.11297	0.02243	5.037	4.72E-07	***
Besmetting_totaal	-1.17272	0.59974	-1.955	0.0505	***
					.
germination_green ~ salinity + infected_halo					
	Estimate	Std.Error	z value	P	
(Intercept)	-1.64461	0.33274	-4.943	7.71E-07	***
saliniteit	0.1134	0.02054	5.52	3.38E-08	***
Besmetting_totaal	-1.24891	0.61323	-2.037	0.0417	*

Tabel 17 Resultaten GLMMs voor verklaring kieming_bruin door besmetting_totaal, besmetting_gemini en besmetting_groen

germination_brown ~ salinity + infected_total					
	Estimate	Std.Error	z value	P	
(Intercept)	0.08339	0.44373	0.188	0.851	
salinity	-0.21269	0.04099	-5.189	2.12E-07	***
infected_total	3.03694	0.76403	3.975	7.04E-05	***
germination_brown ~ salinity + infected_gemini					
	Estimate	Std.Error	z value	P	
(Intercept)	0.03272	0.50514	0.065	0.9483	
salinity	-0.1794	0.03988	-4.498	6.84E-06	***
infected_gemini	1.80359	0.83877	2.15	0.0315	*
germination_brown ~ salinity + infected_halo					
	Estimate	Std.Error	z value	P	
(Intercept)	0.11893	0.40641	0.293	0.7698	
salinity	-0.18924	0.03528	-5.363	8.17E-08	***
infected_halo	2.65652	0.78022	3.405	0.000662	***



Bezoekadres

Suderwei 2
9269 TZ Feanwâlden

Postadres

Postbus 32
9269 ZR Feanwâlden
Telefoon 0511 47 47 64
Fax 0511 47 27 40
info@altwym.nl

www.altwym.nl