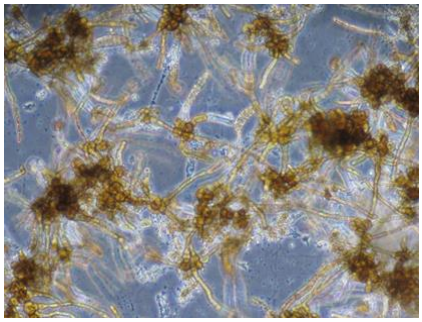
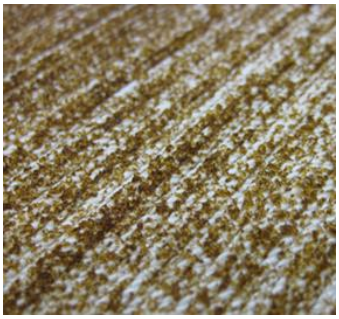
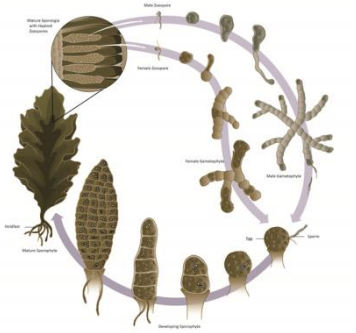
Europees visserijfonds: Perspectief voor een duurzame visserij
Dit project is geselecteerd in het kader van het Nederlands Operationeel Programma 'Perspectief voor een duurzame visserij' dat wordt medegefinancierd uit het EVF.

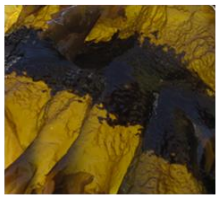
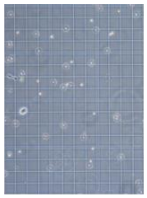
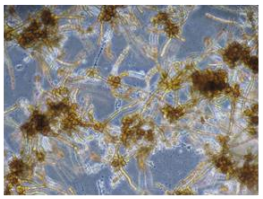
Eindrapportage Project
Zeewier Hatchery

Zeewier Vermeerdering en Selectie voor de Duurzame Zeeboerderij







30 november 2015

Hoofdaanvrager: Hortimare BV (ir. J. Schipper)

Medeaanvragers: Koninklijk Nederlands Instituut voor Zeeonderzoek (NIOZ)
Rijksuniversiteit Groningen (RUG)
Stichting Noordzeeboerderij

Europees visserijfonds: Perspectief voor een duurzame visserij
Dit project is geselecteerd in het kader van het Nederlands Operationeel Programma 'Perspectief voor een duurzame visserij' dat wordt medegefinancierd uit het EVF.

Inhoudsopgave

Samenvatting project Zeewier Hatchery 4

Inleiding 7

1. Kweektechniek: gametofyten, generatieve cyclus, instandhouding 10

1.1. Extractie van sporen en ontwikkeling t.b.v. verkrijgen van steriele cultures van gametofyten (bijlage L) 10

1.2 Ontwikkeling van de vermeerderingsmethode t.b.v. productie door inductie gametogenese met temperatuur en licht behandelingen 14

1.3 Instandhoudingsmethode om sporofyten jaarrond in tanks buiten te kweken (ouderlijke planten) 16

1.4. Ontwikkeling en toepassing van een kunstmatige inductie van sporenvorming bij sporofyten in een gecontroleerd systeem (methode Luning). (Bijlage M) 20

2. Selectiestrategie: welke benadering in selectie en veredeling kan het beste worden gekozen voor de beoogde kenmerken. Kruisingstechnieken en methoden. 23

2.1. Ontwikkelen van de selectiestrategie voor groeikracht, groeisnelheid, temperatuur gevoeligheid en eiwitgehalte. 23

2.2. Kenmerken bepalen van zeewieren en de bijbehorende selectiemethoden ontwikkelen (morfologische, biochemische en/of moleculaire testen) voor toepassing in projectfase op zowel sporofyt als gametofyt stadium 25

3. Verzamelen en identificeren van basismateriaal, opzetten van gametofytenklonen 28

3.1. Verzamelen van sporenmateriaal van diverse herkomsten (5) en morfotypes van *Saccharina latissima* en *Laminaria digitata*. 28

3.2. Opzetten en instandhouding van gametofytencultures die de gehele genenpool bevatten van de diverse herkomsten 30

3.3. Per herkomst en morfotype/eiwittype wordt uit het verzamelde materiaal als basismateriaal voor de kruisingen 5 mannelijke en 5 vrouwelijke gametofytenklonen gemaakt t.b.v. de volgende fase 35

4. Moleculaire karakterisering van het materiaal (soort en populatiestructuur) 36

5. Start van selectie, kruisingswerk en analyse van hybrids teneinde de methode en effectiviteit te beoordelen. 38

5.1. Toepassen van massaselectie op de 5 wildpopulaties op de gedefinieerde kenmerken in een open zee teelt 38

5.2. Maken van kruisingen tussen en binnen genenpools gebruikmakend van basis gametofytenklonen uit 3.2 en 3.3 39

5.3. Testen van de kruisingsproducten in tanks en op open zee. 44

6. Analyse van het kruisingswerk en toetsing daarvan aan de oorspronkelijke doelen en veredelingsstrategie. 48

6.1. Bepaling van het effect van selectie en milieu tussen kruisingen en de populatie waaruit deze sporofyten zijn geselecteerd. 48

6.2. Verkenning of bepaalde eigenschappen kunnen worden geselecteerd op het niveau van gametofyten, in relatie tot sporofyt nakomelingen. 52
7. Evaluatie en opzetten veredelingsprogramma voor korte en lange termijn. 54
7.1 Evaluatie van de selectie en veredeling strategieën 54
7.2. Vermeerdering van de beste selecties t.b.v. grootschalige testen. 56
7.3. Definiëren van een veredelingsprogramma waaruit al op korte termijn rassen beschikbaar komen en een programma met lange termijn perspectief. 57
8. Bijlagen 59
Bijlage A: 20150720 – optimal growth conditions (concentration Vs light) 59
Bijlage B: 20140130 - Variety in the width of gametophyte branches as method of trait recognition 59
Bijlage C: 20150108 – summary clone lines crossings (experimental fase) 59
Bijlage D: 20150220 – smearing of the clone lines 59
Bijlage E: 20151127 - The production of viable F1 offspring from available clone lines 59
Bijlage F: 20150907 – Potential crossings & trial run for gender check 59
Bijlage G: 20150908 - Induction experiment 59
Bijlage H: 20150922 – setup of large scale induction 59
Bijlage I: 20151019 – controle tubes induction 59
Bijlage J: Temperatuur weaning en schok effecten op de ontwikkeling van een Noors ecotype Saccharina latissima. 59
Bijlage K: Results 59
Bijlage L: Physiological responses of gametophytes and juvenile sporophytes of Saccharina latissima to environmental changes 59
Bijlage M: Artificial induction of sori in the kelp species Laminaria digitata (Phaeophyceae) and triggers for sexual reproduction. 59

Europees visserijfonds: Perspectief voor een duurzame visserij
Dit project is geselecteerd in het kader van het Nederlands Operationeel Programma 'Perspectief voor een duurzame visserij' dat wordt medegefinancierd uit het EVF.

Samenvatting project Zeewier Hatchery

In het kader van het project Zeewier Hatchery is er onderzoek gedaan naar de selectie en veredeling van zeewier voor open zee teelt in Europa. Hierbij zijn verschillende fases doorlopen, namelijk de ontwikkelfase, startfase, projectfase en eindfase. Het einddoel van dit project is om een duidelijke veredeling strategie voor korte en lange termijn op te zetten, waarbij de technieken en protocollen die ontwikkelt zijn binnen het project ondersteuning bieden. Hierbinnen speelt Hortimare een hoofdrol als veredelaar zijnde, met ondersteuning van onafhankelijke instituten (NIOZ, WUR) om de duurzaamheid en werkwijze te toetsen.

Gedurende de ontwikkelfase werden kweektechnieken ontwikkeld welke in het kader staan van extractie van sporen, vermeerderingsmethodes voor gametofyten, instandhoudingmethodes en inductie van sporenvorming bij sporofyten. Daarnaast werden de eerste selectiestrategieën geïdentificeerd, waarbij de ontwikkeling van protocollen voor kenmerk bepaling van zeewier en kruising methodes centraal stonden. De kweektechnieken voor zowel gametofyten als sporofyten zijn op het moment robuust te noemen. Het lukt ons om vanuit ouder sporofyten sorus te induceren, deze sorus te extraheren en daarmee schone, goed groeiende gametofyt cultures op te zetten. Daarnaast zijn er de faciliteiten aanwezig waarmee er het gehele jaar rond sporofyten in leven gehouden kunnen worden, in de vorm van het Nederlands Zeewier Onderzoekcentrum. Er zijn verbeterpunten aanwezig, namelijk dat de instandhouding van gametofyt cultures langer dan 1-1.5 jaar momenteel niet vaak lukt. Dit ligt aan infecties die er op treden of door verlies van fertiliteit van de gametofyten. Een mogelijke oplossing hiervoor is verder media optimalisatie waarin vitamines een rol moeten spelen. Daarnaast gaan er elke zomer nog altijd veel sporofyten dood door herbivoren, wat duidt dat schoonmaak protocollen nog verder aangescherpt moeten worden en vaker uitgevoerd moeten worden. Een uitgebreide studie naar verschillende strategieën die in de landbouw gebruikt worden laat zien dat merker-geassisteerd selectie de toekomst moet worden voor zeewier veredeling. Verder blijkt het gebruik van triploïdie om het ras te beschermen en duurzaamheid te garanderen een zeer goede optie, omdat hierdoor geen natuurlijke verspreiding van het zeewier naar de lokale populaties kan plaats vinden. Echter zal er voor de korte termijn gebruik gemaakt gaan worden van klassieke veredeling, waarbij er door middel van fenotypering protocollen en gametofyt kloonlijn kruising rassen geselecteerd kunnen worden. De methodologie die nodig is voor het uitvoeren van merker-geassisteerd veredelen moet namelijk nog voor een groot deel uitgezocht worden, aangezien er op het moment weinig bekend is van de relatie tussen DNA merkers en gevonden zeewier eigenschappen.

De startfase bestaat uit het identificeren en verzamelen van basis materiaal voor het opzetten van gametofyt kloonlijnen van tenminste vijf locaties rond Europa. Daarnaast is er een populatie genetica studie uitgevoerd van het zeewier *Saccharina latissima* (suikerwier), waarbij de soort werd geïdentificeerd, de populatie in kaart werd gebracht op genetisch niveau en gekeken wordt hoe deze populaties met elkaar in contact staan. Het verzamelen van basis materiaal is uiteindelijk zeer succesvol verlopen met in totaal tien locaties (Texel NL, Oosterschelde NL, Solund NO, Zuid NO, Bodø NO, Sound of Kerrera SC, Cleggan Bay IR, Funningsfjørdur FI, Bretagne F, Aarhus DK). Van vrijwel al deze locaties zijn ondertussen mannelijke en vrouwelijke kloonlijnen opgezet. Bovendien heeft de populatie studie die uitgevoerd is door het NIOZ, in samenwerking met Hortimare, laten zien dat er sprake is van duidelijk afzonderlijke zeewier populaties binnen Europa, voor de bovengenoemde locaties. Dit betekent dat er dus geen uitwisseling van genen plaats vindt via natuurlijke processen en dat dit dus ook voorkomen moet worden als men op grote schaal zeewier gaat telen in open zee. Deze vondst heeft feitelijk de werkwijze van Hortimare bevestigd aangezien Hortimare alleen lokaal basis materiaal gebruikt voor het kweken van rassen welke binnen een straal van 100 km van de originele bron geplant worden.

Gedurende de projectfase werd het feitelijke selectie en kruisingswerk gestart met als doel selecties/kruisingen te verkrijgen die uniformer zijn, een hogere groeikracht en opbrengst geven, en hoger proteïne gehalte bezitten. Daarnaast heeft er een uitgebreide analyse van deze kruisingen plaats gevonden op zowel sporofyt als gametofyt niveau en is deze getoetst aan de oorspronkelijke doelen en veredelingsstrategie. Daartoe heeft er massaselectie plaats gevonden op de 10 genoemde wild populaties op de vorige pagina, waarbij sporofyten geselecteerd werden op specifieke fenotypische eigenschappen. Van dit basis materiaal zijn vervolgens kloonlijnen opgezet welke op laboratorium, tank en open zee schaal zijn getest. Er was aangegeven dat hierbij tenminste 2 generaties getest worden, maar helaas is deze doelstelling niet behaald aan het einde van het project. De tweede generatie is op het moment nog in de gametofyt fase en zal pas komend voorjaar uitgeplant worden. De reden voor deze vertraging is dat er in het begin van het project tegenslagen waren met het over zomeren van sporofyten aangezien de juiste buitenfaciliteiten voor die tijd niet aanwezig waren, waardoor geen nieuwe gametofyt kloonlijnen opgezet konden worden van de eerste generatie in de eerste 2 jaar van het project. Ondertussen zijn er al meerdere kruisingen getest in tanks welke een significant verschil in groei lieten zien en bovendien over het algemeen uniformer zijn dan wild populatie cultures. Een select aantal van deze kruisingen is geanalyseerd op eiwit gehalte en compositie. Dit betekent dat er een eiwit samenstelling van *Saccharina latissima* bekend is voor selectie doeleinden. Daarnaast is er ook de soort *Laminaria digitata* (vingerwier) geanalyseerd op eiwit gehalte en compositie, wat veredeling van deze soort in de toekomst voor eiwitten gemakkelijker maakt. Daadwerkelijke verschillen in eiwit gehalte zijn er tot nu toe nog niet gevonden. Dit is te verklaren aan het feit dat er tot nu toe nog gewerkt is met de massaselectie methode, waarbij er willekeurige kruisingen gemaakt worden met een geringe kans dat daar daadwerkelijk een kruising tussen zit met een verhoogd eiwit gehalte. De analyse van de gametofyt kloonlijnen laat verder zien dat er significante verschillen zijn tussen deze kloonlijnen in morfologie tussen locaties en soorten. De relatie van deze morfologie met de uitgroei van de hybride sporofyten is echter niet concluderend, want er zijn geen duidelijke trends zichtbaar.

In de eindfase van het project heeft er een evaluatie en het opzetten van het veredelingsprogramma voor de korte en lange termijn plaats gevonden. Hierbij zijn de veredelingsstrategieën welke gevonden en getest zijn binnen het project geëvalueerd. Daarnaast is er de nadruk gelegd op de strategie zoals deze in de toekomst geïmplementeerd gaat worden. De huidige aanpak van Hortimare zoals deze ontstaan is door het project Zeewier Hatchery blijkt een solide aanpak om ervoor te garanderen dat er op korte termijn zeewier rassen beschikbaar komen voor de Europese markt. Het gebruik van gametofyt kloonlijnen zorgt ervoor dat er op relatief eenvoudige en snelle manier kruisingen gemaakt kunnen worden voor specifieke locaties binnen Europa. Het maken van deze kruisingen voor specifieke locaties blijkt uiterst belangrijk, aangezien er binnen Europa sprake is van afhankelijke populaties zeewier. De invloed van gen verspreiding tussen die populaties op lokale ecosystemen is onbekend. Dit maakt de strategie van aanpak van Hortimare duurzaam. De kruisingen laten al snel een verhoogde uniformiteit met hoge groeikracht zien, wat onderdeel is van de hoofd doelstelling. De implementatie van het meten van eiwit gehalte en dit incorporeren in het veredeling traject zal nog enige ontwikkeling vragen, maar kan al snel gerealiseerd worden. In het kader van deze korte termijn strategie zijn er op het moment grootschalige testen bezig in zowel open zee (Solund, Noorwegen) als in tanks (Texel, Nederland), waarbij meer dan 20 kruisingen van *Saccharina latissima* getest zullen worden. Daarnaast vindt er opschaling plaats van in totaal 26 mannelijke en vrouwelijk kloonlijnen van verschillende soorten (*Saccharina latissima* en *Alaria esculenta*) en oorsprongen (Nederland, Noorwegen, Faroe eilanden). Naast de korte termijn strategie is er ook een lange termijn veredelingsstrategie opgezet. Hierbij gaat merker-geassisteerd selectie een zeer belangrijke rol spelen en zal deze selectie ondersteund worden met polyploïdie inductie binnen de ontwikkelde rassen en duurzaamheid toetsing door

onafhankelijke onderzoeksinstituten. Voor het merker-geassisteerd selecteren moeten er echter nog eerst verbanden gelegd gaan worden tussen DNA merkers en fenotypische eigenschappen van het zeewier. De eerste stappen hiervoor zijn gezet binnen het project Zeewier Hatchery, omdat er uitgebreide fenotypering protocollen zijn ontwikkelt. Echter voor het ontwikkelen van de DNA merkers is er de hulp van gespecialiseerde bedrijven uit de landbouwsector nodig, welke de connecties kunnen maken tussen fenotypering en genotypering van het zeewier. Daarnaast zal het onderzoek naar ploïdie niveau in zeewierrassen ondersteund moeten gaan worden door onafhankelijke instituten zodat zij deze rassen kunnen toetsen op fertiliteit en dus verspreiding van deze rassen in het wild. Daarbij hoort het toetsen van de veredelingsstrategie op duurzaamheid door lokale populaties te vergelijken met de gebruikte rassen op die locatie. Ook hiervoor is er binnen Zeewier Hatchery door het NIOZ een belangrijke eerste stap gezet door deze wild populaties genetisch in kaart te brengen waar Hortimare op het moment werkt.

Europees visserijfonds: Perspectief voor een duurzame visserij
Dit project is geselecteerd in het kader van het Nederlands Operationeel Programma 'Perspectief voor een duurzame visserij' dat wordt medegefinancierd uit het EVF.

Inleiding

De teelt van zeewier zowel in zee als op land heeft grote belangstelling bij zowel industrie als overheden. Zeewierteelt kan worden ingezet als alternatief eiwitplatform voor de food en feed industrie en is een bron van vele, soms nog onbekende, metabolieten met toepassing in farmacie, cosmetica en functional foods. De kwaliteit van de eiwitten en vetzuren maakt het bijzonder geschikt voor gebruik in visvoer. Tegelijk kan de teelt van zeewier worden ingezet als waterzuiveringsysteem bijvoorbeeld naast een viskwekerij zowel in open zee als in recirculatiesystemen. Er wordt zodoende een dubbele opbrengst verkregen. Dit concept is succesvol onderzocht en toegepast in Canada (Chopin, 2011) en Chili (FAO, 2009).

Voor toepassing in Nederlandse kustwateren is het concept van de Duurzame Zeeboerderij ontwikkeld. Een geïntegreerde benadering waarin de teelt van zeewier een kernactiviteit is en viskwekerij en schelpdieren kweek kan worden ingepast. Het zeewier zorgt dan voor de opname van nutriënten en voorziet de visteelt van eiwitten t.b.v. het voer waarmee dit alles op duurzame wijze kan functioneren. Tevens zijn speciale vormen van visserij mogelijk tussen of onder de zeewiervelden. Voor dit plan heeft het consortium o.l.v. Hortimare de volle medewerking van Rijkswaterstaat en is de eerste locatie vergund.



Impressie van de halfopen structuur van de zeeboerderij.

In diverse projecten wordt aan deze teeltconcepten gewerkt en samengewerkt zoals door de aanvrager Hortimare, in Nederland en daarbuiten: door Agentschap NL is aan twee consortia, waaronder Hortimare, een opdracht verleend de komende 2 jaar praktijkonderzoek uit te voeren naar de teelt van zeewier voor de Nederlandse kust en daarvoor systemen te ontwikkelen (SBIR project 'Duurzame Zeeboerderij'). De voorbereidingen worden getroffen om daadwerkelijk een grootschalige proefboerderij op de Noordzee in te richten. De eerste teeltresultaten van de WUR (PRI) in de Schelphoek laten zien dat ook onder Nederlandse omstandigheden een goede groei en ontwikkeling van de kelpsoorten kan worden verkregen.

De Stichting Noordzeeboerderij behartigt dit belang en verwerft draagvlak en financiering hiervoor (o.a. aanvraag in regeling Investeringen in Aquacultuur). Rijkswaterstaat heeft het idee van de 'Meervoudige Zeeboerderij' op 22 maart 2011 beloond met een eerste prijs in een competitie om voorstellen voor meervoudig gebruik van de Noordzee (foto).



Ook internationaal zijn er kleinere en grotere initiatieven om de zeewierteelt van de grond te krijgen. In Noorwegen is een project geïnitieerd door Hortimare samen met een groep zalmkwekers op het gebied van geïntegreerde aquacultuur. Dit is succesvol verlopen en krijgt dit jaar een

vervolg. Via initiatieven in Denemarken is een EU 7e kaderprogramma project goedgekeurd waarin zeewier als onderdeel wordt onderzocht i.s.m. Hortimare en Deltares (Mermaid). Een tweede project geïnitieerd vanuit België naar innovatieve teeltsystemen met betrokkenheid van Hortimare en ECN is ook goedgekeurd.

Uitgangsmateriaal voor de zeewierteelt

Met betrekking tot het selecteren, veredelen en kwaliteitsverbetering van uitgangsmateriaal lopen er nog geen projecten voor Europese toepassingen. Hortimare BV vervult op dit moment binnen Nederland en al deze projecten een sleutelrol in de levering van het uitgangsmateriaal.

Omdat Nederland sterk inzet op het ontwikkelen van de zeewierteelt en het verkrijgen van een internationale positie hierin, o.a door toeleveranciers (machines, teeltsystemen, uitgangsmateriaal); dienstverlening en verwerkingstechnologie, is het hebben van een degelijke basis, namelijk het uitgangsmateriaal, van evident belang.

Om voldoende teeltrendement te verkrijgen is een uniforme groei en ontwikkeling van het gewas vereist met liefst een zo hoog mogelijke opbrengst in biomassa of bijv. de doel componenten zoals eiwit. Een goede kwaliteit uitgangsmateriaal heeft daarmee dus een direct positief effect op het succes van de andere ondernemingen/projecten die deze keten proberen te ontwikkelen.

Wat dat betreft is een directe vergelijking te maken met de land- en tuinbouw waar teelt en veredeling niet zijn te scheiden. Nederland neemt internationaal een sterke positie in op het gebied van uitgangsmateriaal door de aanwezigheid van innovatieve veredelingsbedrijven en een sterke onderzoekspoot in de plantenveredeling bij Wageningen UR.

De kwaliteit van uitgangsmateriaal is ook al in de onderzoeksfase van de zeewierteelt van eminent belang omdat daarmee uiteindelijk de vergelijking tot stand wordt gebracht tussen de diverse proefnemingen. Om die vergelijkbaarheid te optimaliseren is het beste om met een standaardselectie/ras te werken en in ieder geval dit materiaal afdoende te karakteriseren om de onderzoeken in de toekomst vergelijkbaar te houden. Deze selectie/ras bestaat nog niet, zelfs een aanzet daartoe is niet gegeven.

Er is door Hortimare inmiddels technologie ontwikkeld om de bruinwieren Saccharina latissima en Laminaria digitata op enige schaal te vermeerderen via de gehele sexuele cyclus en daarna de gametofyten op lijn of andere dragermaterialen aan de teeltsystemen te bevestigen. De basis om een selectie en veredelingsprogramma te starten is daarmee gelegd.

Aan de selectie en veredeling van zeewieren is in de Westerse wereld nog vrijwel geen aandacht gegeven. Genetisch onderzoek is al wel uitgevoerd o.a. aan de RUG en in het bijzonder ook in Frankrijk (Station Biologique de Roscoff, CEVA in Bretagne), maar rassen zijn daaruit niet ontwikkeld.

In Azie is de noodzaak tot veredelen echter wel onderkend en bestaan er zogenaamde hatcheries voor. De zeewierveredeling wordt daar al enkele decennia toegepast ondermeer bij Laminaria japonica. Deze veredelingsprogramma's kunnen als voorbeeld dienen voor dit project (Chaoyuan, 1987)

Duurzaamheid

Duurzaamheid is uitgangspunt bij alle nieuwe ontwikkelingen op zee. Zeewierteelt is in principe al duurzaam omdat gebruik wordt gemaakt van de aanwezige nutriënten en geen chemische

gewasbescherming wordt toegepast. Zeewieren, mits geoogst, dragen direct bij aan vermindering van de eutrofiering door opname van nutriënten.

De zeewiersoorten die zich in open zee kunnen laten telen zijn meestal kelpsoorten. Deze komen op de Noordzee algemeen voor en bestaan uit een aantal min of meer geïsoleerde populaties. De Nederlandse populatie kelp is vrijwel geheel verdwenen. Voor de teelt zullen dus ook genotypen van andere plaatsen rond de Noordzee (Schotland, Noorwegen, Duitsland) moeten worden verkregen. De vraag die beantwoord moet worden is in hoeverre er gebruik kan worden gemaakt van deze herkomsten en of deze op verantwoorde wijze met elkaar kunnen worden gekruist zonder significante negatieve ecologische effecten.

Europees visserijfonds: Perspectief voor een duurzame visserij
Dit project is geselecteerd in het kader van het Nederlands Operationeel Programma 'Perspectief voor een duurzame visserij' dat wordt medegefinancierd uit het EVF.

1. Kweektechniek: gametofyten, generatieve cyclus, instandhouding

1.1. Extractie van sporen en ontwikkeling t.b.v. verkrijgen van steriele cultures van gametofyten (bijlage L)

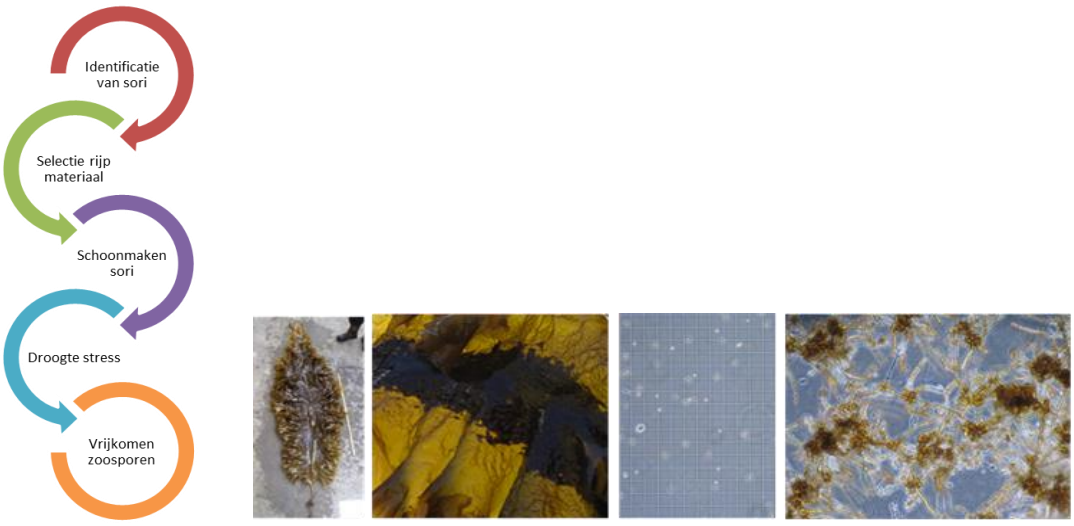
Voor de meerjarige instandhouding van gametofyt cultures draait het om steriliteit en gezondheid. Bij onze protocollen van zoöspore extractie en de daaropvolgende gametofyte cultures draait het vooral om steriliteit. Een infectie is namelijk de voornaamste reden van de gezondheidsafnames binnen gametofyt cultures en vieze cultures zijn erg moeilijk weer schoon te krijgen.

Binnen Hortimare zijn er twee belangrijke ontwikkelingen die ervoor gezorgd hebben dat steriliteit en de gezondheid van onze gametofyt cultures gemaximaliseerd zijn. Ten eerste is de zoöspore extractie geperfectioneerd voor schonere en succesvollere extracties. Ten tweede is een grote slag gemaakt in de gametofyt opslag in de vorm van het gebruiken van titerplaten.

Zoöspore extractie

Bij de spoor extractie zijn er twee doelstellingen die zo goed mogelijk verwezenlijkt dienen te worden. Ten eerste moeten zoveel mogelijk sporen worden geëxtraheerd. De sporen groeien namelijk allemaal uit tot gametofyten, waarbij dus een goede extractie automatisch resulteert in grotere hoeveelheden biomassa's in de bioreactoren. Ten tweede is het heel belangrijk dat de sporen oplossing zo steriel mogelijk is. De zoösporen komen uit levend zeewier blad en zit dus tevens vol met andere organismes zoals micro algen, diatomeeën, en andere micro organismes. Het protocol is bedoelt om beide doelstellingen zo goed mogelijk uit te voeren en wordt wijdverbreid gezien als het belangrijkste extractie protocol in de zeewier industrie van Europa. Verder uitdieping op dit onderwerp is te vinden in Hoofdstuk 1.4.

Extractie protocol



figuur 1; schematische representatie van het extractie protocol

Herkenning van rijpe sorus

Rijp zeewier wordt gekenmerkt door sorus (*Fig.2*). Het zijn de donkerbruine delen op de normaliter goudbruine frond van het zeewier.



figuur 2; Een duidelijke donkerebruine band die de sorus aanduidt.

Selectie van rijp materiaal

Snij de stukken met rijpe sorus die nodig zijn voor extractie. Het is niet nodig om de gehele plant te oogsten voor de collectie van rijpe sorus. Het meristeem (meest proximale deel vanaf stipe) van de plant zou achter moeten blijven zodat de plant verder kan groeien.

Schoon maken van Sorus

- Schoon maken van weefsel met een tissue om fouling (e.g. epiphyten) te verwijderen.
- Sorus 15 minuten in hypochloriet laten rusten. Tijd is afhankelijk van de hoeveelheid fouling op het blad.
- Na de hypochloriet stap de sorus schoonmaken in gesteriliseerd zeewater. Dit gaat in 3 opeenvolgende stappen die naast elkaar geplaatst staan.
    - Kort enkele malen dopen in maatbeker zodat gros van hypochloriet van sorus af is.
    - Sorus verder wassen door de sorus te laten rusten in volgende maatbeker met steriel zeewater (paar minuten).
    - Laatste was stap in maatbeker gevuld met steriel zeewater (paar minuten).

Droogte stress

- Droog het gesteriliseerde blad met een tissue onder steriele werkomstandigheden.
- Plaats de drooggedepte blad op een tissue in een sluitbare bak.
- Leg extra tissue op het blad zodat al het vocht wordt geabsorbeerd
- Codeer de extractie
- Plaats de bak met sorus in opslag (8-10 °C) voor minimaal 16 uur

Afgifte van de zoösporen door rijpe sorus

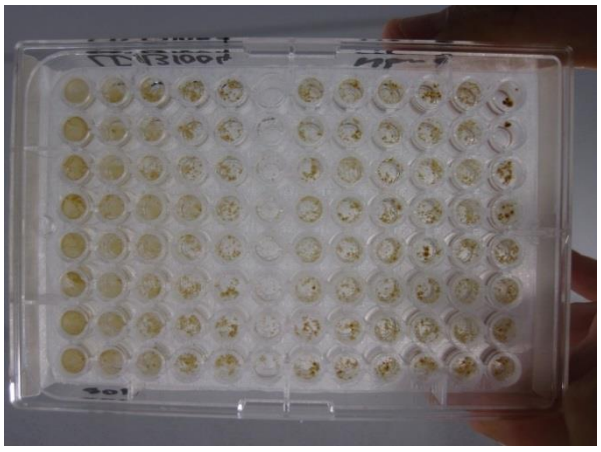
- Schat de rijpheid van de sorus aan de hand van de bruine plekken die het blad heeft achtergelaten op de tissue
- Plaats de stukken sorus in erlenmeyers samen met de juiste ratio van steriel zeewater

- Bepaal hoe snel de culture ondoorschijnend (wolkerig) wordt. Bij snelle extractie van zoösporen dient de extractie kort te zijn om fouling te minimaliseren
- Bepaal de mobiliteit van de zoösporen d.m.v. een microscoop. Bepaal de hoeveelheid zoösporen in de culture.
- Plaats de culture in rood licht (16:8) bij een temperatuur van tussen de 8 en 12 °C.

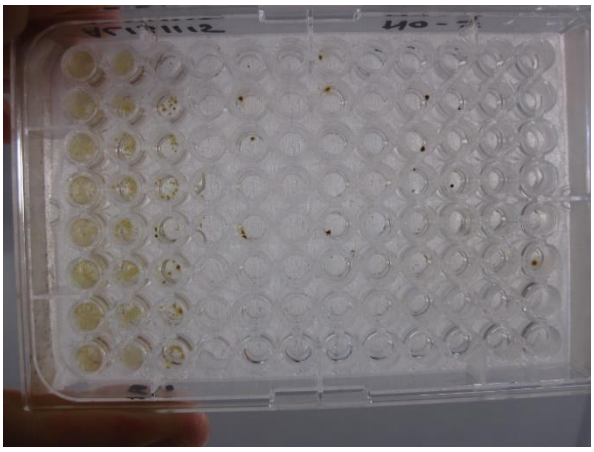
Instandhouding van schone cultures.

Zoals eerder opgemerkt zijn de gametofyt cultures erg vatbaar voor infecties. Daaropvolgend is de gezondheid van diezelfde cultures essentieel voor het succes van het veredelingswerk als ook het productie werk. Het is namelijk van groot belang dat cultures niet voor maar één jaar, maar voor zo lang mogelijk te gebruiken zijn. 100% steriele extracties zijn onmogelijk en om steriele cultures te genereren moeten andere methodes worden gebruikt. Hortimare heeft gekozen voor cultuur steriliteit door de zoöspoor extract te verdunnen in titerplaten.

Gametofyten worden geïsoleerd uit de extractie door verdunningsreeksen te doen in 96-wells titerplaten. Deze methode heeft meerdere voordelen. Ten eerste kan op deze manier een gametofyt efficiënt en met zekerheid geïsoleerd worden voor veredelingswerk. Deze methode zorgt ervoor dat verdere klonering van de gametofyt met zekerheid resulteert in een culture die genetisch identiek is. Ten tweede is dit een uitstekende manier om infecties uit je verdere culture te houden die na de sporenextractie nog wel aanwezig was in de culture. De verdunningsreeks resulteert voor het veredelingswerk in *Fig.3* en voor de productie in titerplaten zoals in *Fig.4*



figuur 3; verdunde gametofyt cultures ten behoeve van schone productie cultures.



figuur 4; geïsoleerde gametofyten na een verdunningsreeks ten behoeve van het veredelingswerk

Om de reinheid/gezondheid van de cultures te optimaliseren is gekozen voor risicospreiding d.m.v. titerplaten. Zoals in de vorige alinea al vermeld is, zijn 96wells micro-titerplaten ideaal om de consequenties van infecties in te dammen. De hoeveelheid wells van een titerplaat vergroot de kans aanzienlijk dat er een well is die niet is geïnfecteerd. Uit de gezonde well kan dan bij noodzaak een nieuwe titerplaat worden gemaakt zonder infectie.

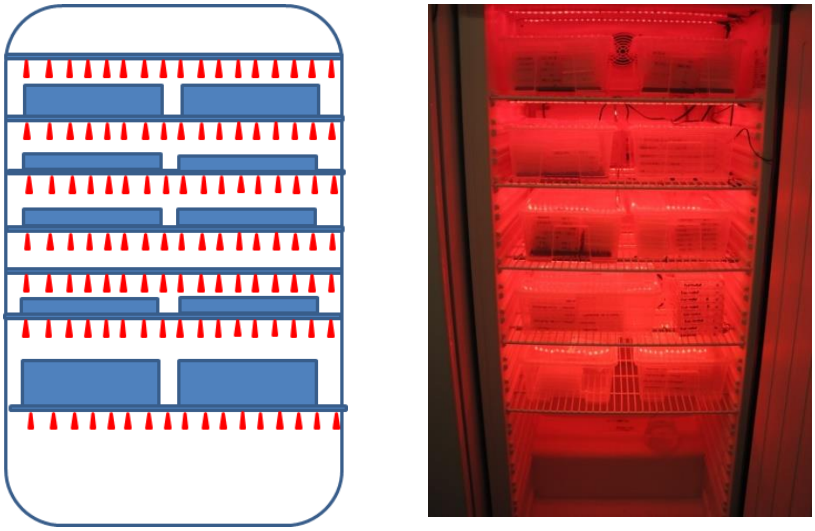
Deze vorm van risico spreiding kan doorgevoerd worden bij het opschalen. Daarom is de opeenvolgende opschaalstap na de micro-titerplaat een 24well macro-titerplaat. Hierin wordt nog steeds gebruik gemaakt

van meerdere wells, maar is de inhoud van de well vanzelfsprekend groter. Deze vervolg stap bouwt een dubbele zekerheid in omdat je niet alleen hoeft terug te vallen op een naburige well binnen een titerplaat, maar omdat nu ook de macro-titerplaat als veiligheidsbuffer fungeert voor de micro-titerplaat. Daarom is ook gekozen voor een strategie waarin de macro-titerplaat en micro-titerplaat in verschillende incubatoren zitten.

Opslag van grote hoeveelheden verschillende cultures.

De opslag van grote hoeveelheden gametofyt cultures kan voor problemen zorgen in de toekomst omdat dit, in tegenstelling tot zaadopslag van landplanten, niet zomaar in bulk gedaan kan worden. Alle gametofyten moeten op het moment verzorgd worden d.m.v. licht, het regelmatig verversen van zeewater en het regelmatig toevoegen van nutriënten. Verder zijn de cultures erg vatbaar voor infecties die na infectie erg moeilijk weer schoon te krijgen zijn.

De 96 wells titerplaat is ideaal om de benodigde hoeveelheid benodigde ruimte te minimaliseren dat nodig is om cultures te bewaren. Deze micro-titerplaat is klein, compact en handbaar, die naast een optimale grootte ook erg handig is tegen infecties zoals hierboven is beschreven. Deze titerplaten worden opgestapeld in sluitbare doorschijnende dozen in een incubator *(Fig.5)*. Deze dozen zijn bedoeld om verdamping van de titerplaten te minimaliseren. De setup in de incubator is bedoeld om ruimte en licht influx te optimaliseren. Dit resulteert in een gelaagde structuur waarbij de led's op z'n kop geplaatst worden onder roosters *(Fig.5)*. Onder elke set van led's staat een doorschijnenede doos met de titerplaten. Elke stapel titerplaten is maximaal 7 titerplaten hoog zodat de onderste titerplaat ook licht ontvangt. Logischerwijs zal de volgorde van titerplaten door de tijd heen veranderen zodat elke titerplaat vergelijkbare hoeveelheden licht ontvangt.



figuur 5; Schematische overzicht (links) van een incubator die zowel kloonlijnen als ook productie titerplaten bevat. Rode LEDs zijn afgeschilderd als rode driehoekjes en schijnen naar beneden door de blauwe (doorschijnende) dozen. De daadwerkelijke incubator is gefotografeerd en geplaatst naast de schematische tekening (rechts)

1.2 Ontwikkeling van de vermeerderingsmethode t.b.v. productie door inductie gametogenese met temperatuur en licht behandelingen

Gametogenese is de vorming van mannelijke en vrouwelijke gameten. In het geval van de ontwikkelingen binnen het zeewier Hatchery project resulteert dit in optimalisatie van twee gebieden.

Ten eerste moet er gekeken worden naar inductie optimalisatie binnen de voortplanting van gametofyten. Een succesvolle inductie is namelijk wanneer er binnen een zo kort mogelijke periode na inductie een zo groot mogelijke voortplantingssucces is. In het geval van onze gametofyt cultures van zeewier betekend dit dus zoveel mogelijk sporofyten per gametofyt.

Ten tweede betekend de gametogenese op het niveau van de gametofyt dat de biomassa van de gametofyten zelf zo snel mogelijk moet kunnen worden vermeerderd. Meer biomassa betekend meer oogonia en resulteert dus uiteindelijk in meer sporofyten na inductie.

Induceren van voortplanting bij gametofyten

De inductie van gametofyt cultures wordt geïnitieerd door het gebruik maken van blauw licht in plaats van het rode licht van de opslag fase. In combinatie met een juiste temperatuur gaan de gametofyten over in het vormen van voortplantingsorganen. In het geval van de mannelijke gametofyt wordt er sperma geproduceerd. In het geval van de vrouwelijke gametofyt worden er oogonia geproduceerd. Logischerwijs hangt een succesvolle inductie samen met de hoeveelheid oogonia die bevrucht worden en na een periode van tijd succesvol tot sporofyten zijn gevormd.

De concentratie van de hoeveelheid gametofyten per ml zeewater blijkt tevens cruciaal te zijn wanneer gekeken wordt naar de succes van inductie. Inductie blijkt minder succesvol naarmate de concentratie gametofyt omhoog gaat. Resultaten in bijlage A laten zien dat dit het geval is.

Daarnaast bleek dat de samenstelling van het medium van grote invloed is op de ontwikkeling van oogonia en uitgroei van sporofyten. Er bleek dat de medium compositie zoals deze gebruikt werd in het verleden een negatief effect te hebben op de inductie van de gametofyten en uitgroei van de sporofyten (zie bijlage L). De aanwezigheid van een breed spectrum antibiotica (kanamycine) die doorgaans toegevoegd werd aan gametofyt cultures om bacterie groei tegen te gaan bleek de groei van de sporofyten significant te remmen. Als gevolg van dit onderzoek zijn toen de protocollen voor de inductie van gametofyten aangepast, waarbij het antibiotica weg gelaten wordt zodra de cultures geïnduceerd worden. Verder kwam er naar voren dat vitamine toevoeging een positief effect kan hebben op de fertiliteit van cultures naarmate deze ouder worden. Er bestaat nog altijd het probleem dat oude cultures (>1 jaar oud) moeilijker geïnduceerd kunnen worden. De gedachte is dat omdat er momenteel geen vitamines in het standaard medium toegevoegd worden, waardoor de culture levensvatbaarheid verliest over tijd. Echter is er nog meer onderzoek nodig naar dit fenomeen aangezien het uitgevoerde onderzoek geen overduidelijke resultaten op leverde. Een mogelijke oorzaak hiervan is dat er oude vitamine stocks gebruikt werden.

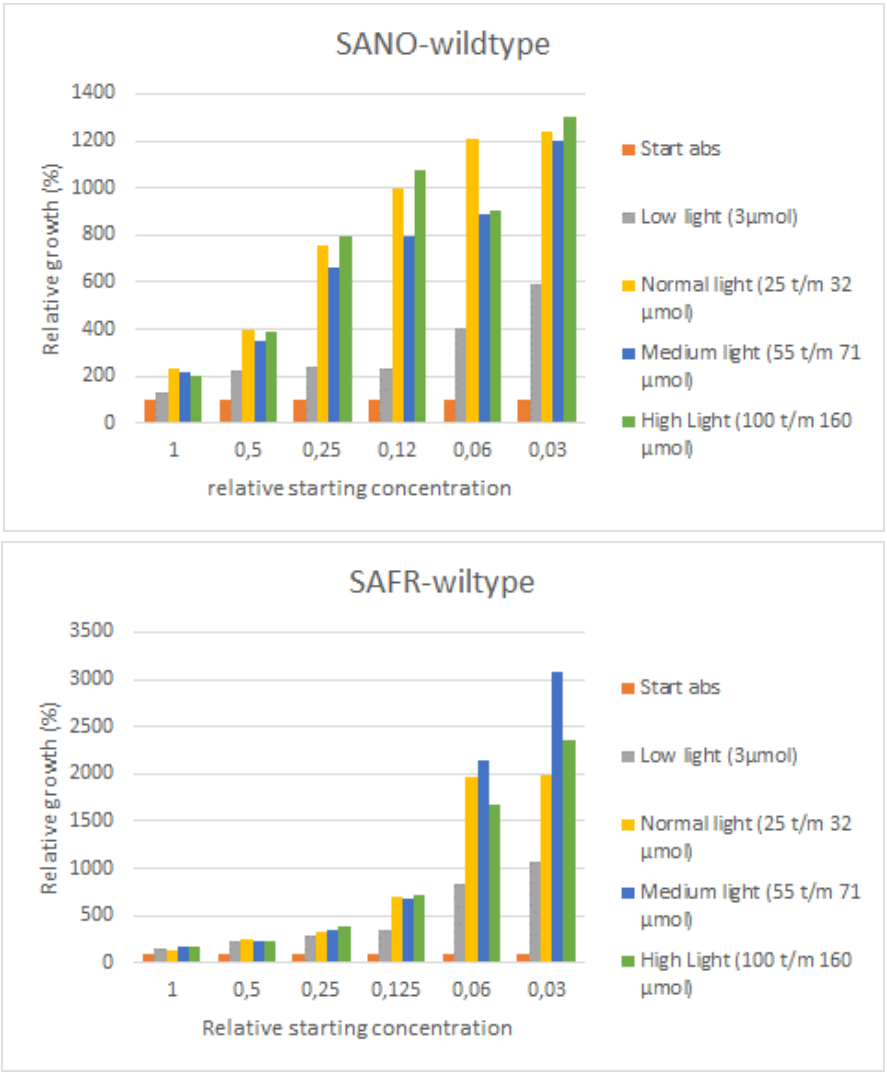
Groeisnelheid van gametofyt cultures optimaliseren

Gametofyt cultures moeten naast succesvol induceren ook zo snel mogelijk groeien zodat de tijd tussen zoöspoor extractie en het planten van zeewierlijnen geminimaliseerd wordt. Dit is belangrijk voor het veredelingswerk als wel het leveren van een lokale wildtype aan een zeewierboer.

De groeisnelheid wordt onder andere bepaald door de hoeveelheid licht, de aanwezige nutriënten, en de initiële concentratie van de gametofyt culture. Om hoge groeisnelheden te bereiken moeten alle 3 de variabelen geoptimaliseerd worden.

Licht moet horizontaal worden opgehangen in de incubatoren met titerplaten. Uiteindelijk zou het ideaal zijn als elke titerplaat individueel belicht kan worden. Dit is echter financieel als wel ruimte technisch niet mogelijk en er is dus gekozen voor een inrichting waar elke niveau van licht 7 opgestapelde titerplaten belicht. Circulatie van de titerplaten moet zorgen voor een zo evenredig mogelijk behandeling per culture.

Wel is er onderzoek gedaan naar de optimale licht intensiteit. Dit verschilt logischerwijs per origine (*e.g.* Frankrijk of Noorwegen). Maar in het kort ligt het optimum ergens tussen de 30 en 160 micromol licht (*Fig.6*). Verder onderzoek is nodig om de lichtintensiteit per locatie en soort te optimaliseren.



figuur 6; Twee staafdiagrammen met de relatieve groei (y-as) ten opzichte van de relatieve start concentratie (x-as) en licht intensiteit (legenda).Hierbij is het duidelijk te zien dat de relatieve groei enorm toeneemt naarmate de relatieve start concentratie afneemt. Ook zijn er indicaties te zien dat er voor beide cultures een optimale lichtintensiteit is. Voor de Noorse culture is dit tussen de 30 en 160 µmol en voor de Franse culture is dit tussen de 55 en 71 µmol.

Nutriënten moeten met enige regelmaat worden toegevoegd in de titerplaten. De toevoeging van nutriënten loopt gelijk met de verversing van zeewater. Dit is om en nabij de 6 keer per jaar. Bij

regelmatigere verversing zal de groeisnelheid hoger zijn. Maar gezien de relatief geringe toename van groeisnelheid bij verversen en de tijd/kosten van het verversen is gekozen voor maar 6 keer per jaar.

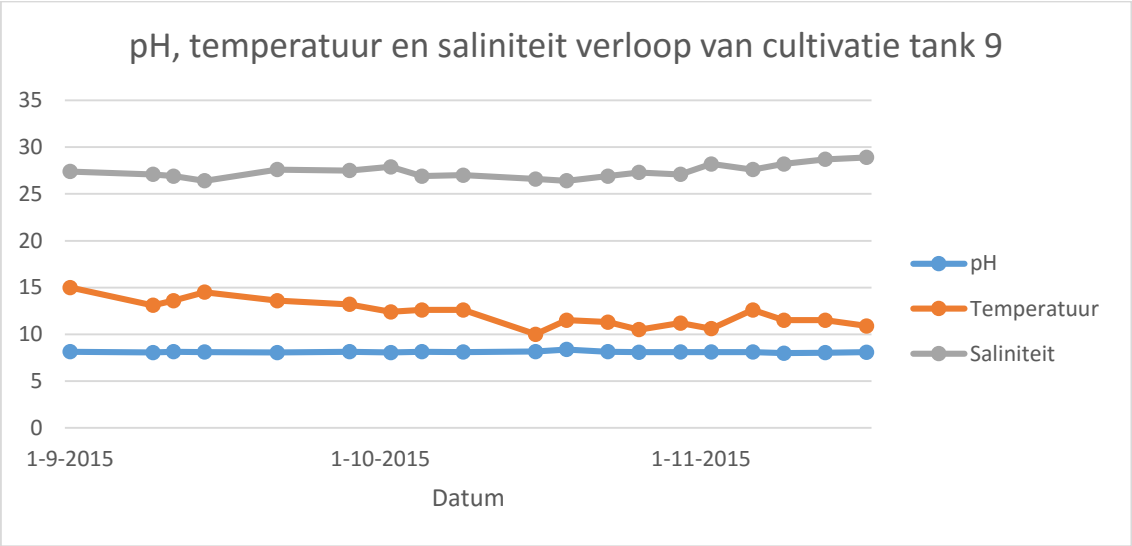
De initiële concentratie van de gametofyt culture is erg belangrijk voor de gezondheid van de gametofyt culture als wel de groeisnelheid van de gametofyt culture. Gedane experimenten laten namelijk zien dat een relatief lagere startconcentratie resulteert in aanzienlijke toenames in groeisnelheid (*Fig.6*). Verdere informatie omtrent deze experimenten is te vinden in bijlage A.

1.3 Instandhoudingsmethode om sporofyten jaarrond in tanks buiten te kweken (ouderlijke planten)

Voor het succesvol kweken van zeewier zijn er methodes en faciliteiten nodig om het jaar rond volwassen sporofyten te kunnen laten groeien. Het gebruik van zeewiervelden in open zee is hiervoor geen optie gezien de hevige concurrentie druk die optreedt gedurende de zomermaanden tegen het zeewier, onder andere door microalgen, herbivoren en overgroeiende organismes. Daarom zijn er binnen het project Zeewier Hatchery meerdere methodes en faciliteiten ontwikkelt om sporofyten gedurende het gehele jaar te kunnen kweken. Tot deze methodes behoren een monitoring programma voor controle van de cultivatie tanks, schoonmaak protocollen, behandeling van het zeewier tegen herbivoren, en quarantaine van nieuw inkomend zeewier vanuit de zee. De faciliteiten die ontwikkelt zijn voor zowel binnen als buiten, en daarbij behoren het zeewiercentrum, en de klimaatkamers binnen. Elk van deze methodes en faciliteiten zal apart behandelt worden.

Monitoring programma voor controle van de bakken

Om ervoor te zorgen dat het zeewier in de cultivatie tanks in optimale conditie blijft is er een monitoring opgezet waarbij elke 2-3 dagen de saliniteit, temperatuur en pH worden gemeten in elke tank. Deze 3 parameters zijn het belangrijkste gebleken voor de gezondheid van het wier en zijn relatief eenvoudig te meten. De ideale waardes voor saliniteit liggen tussen de 26-32 promille ($^0/_{00}$), voor temperatuur 3-15 °C (afhankelijk van jaargetijde), en voor pH tussen 8.0-8.5. Onderstaand is een voorbeeld van de data te zien *(Fig.7)*, aan de hand van deze data bepalen wij wat er gebeuren moet per tank. Wanneer een te lage saliniteit geconstateerd wordt als gevolg van hevige regen zal de verversing van het zeewater verhoogt worden, bij te hoge water temperatuur zal er extra koeling verzorgd worden, en wanneer de pH te laag/hoog wordt zal de beluchting aangepast worden zodat de carbonaat buffer aanwezig in het zeewater weer gestabiliseerd wordt.



figuur 7; Monitoring data van cultivatie tank 9 in het zeewiercentrum van de afgelopen maanden. De pH en saliniteit zijn beide stabiel, de afnemende temperatuur trend is te verklaren gezien het winter wordt. Gedurende de gehele periode zijn alle parameters binnen de richtlijnen gebleven.

Schoonmaak protocollen

Tijdens de monitoring van de cultivatie tanks worden deze ook beoordeelt op hoe vuil ze zijn, met betrekking tot aangroei van organismen op de wanden. Deze aangroei verschilt per seizoen, waarbij vooral in de zomermaanden door verhoogde temperatuur en extra licht inval er wildgroei plaats vindt van draadalgen en diatomeeën. Elke cultivatie tank wordt minimaal eens per 2-3 weken gereinigd waarbij het zeewier uit de tanks wordt gehaald en geïnspecteerd op de aanwezigheid van herbivoren. Daarna wordt de tank leeg gepompt, waarbij het zeewater wordt behandelt door de zeewierbiofilter die zich bevindt aan het einde van de installatie. De tank wordt met een hogedruk reiniger compleet schoongespoten en wanneer nodig behandelt met een lichte chlooroplossing om hardnekkige organismen te verwijderen. Vervolgens wordt de tank weer vol gepompt met nieuw zeewater en worden de zeewieren terug geplaatst.

Behandeling van zeewier tegen herbivoren

Vooral gedurende de zomer zullen aanwezige herbivoren in de cultivatie tanks sterk in aantal toenemen. Het is uiterst belangrijk dat deze zo spoedig mogelijk verwijdert worden, want anders worden de zeewieren compleet opgegeten in een tijdsbestek van een aantal dagen. De herbivoren die aanwezig kunnen zijn in de tanks zijn (nap)slakken (Gastropoda) en vlokreeftjes (Amphipoda). Naast het regelmatig schoonmaken van de tanks hebben wij een andere methode in ontwikkeling om deze herbivoren te verwijderen. In deze methode worden de zeewieren behandelt met een ammonium oplossing. Uit onderzoek en literatuur studie is gebleken dat de tolerantie van zeewieren vele malen hoger is hiertegen dan die van herbivoren. Dit stelt ons in de gelegenheid om op relatief eenvoudige manier de herbivoren dood te maken zonder de zeewieren te beschadigen. Bovendien vormt het ammonium na behandeling geen extra problemen, aangezien het zeewier deze stof als stikstofbron zal gaan gebruiken waardoor er bij het uitstromen van het zeewater geen ammonium meer aanwezig zal zijn.

Quarantaine van nieuw inkomend zeewier vanuit zee

Aangezien de aanwezigheid van andere organismen het zeewier kan beschadigen en de zorg dat er geen plagen ontstaan in de bakken, wordt verzameld zeewier vanuit zee voor veredeling doeleindes eerst in

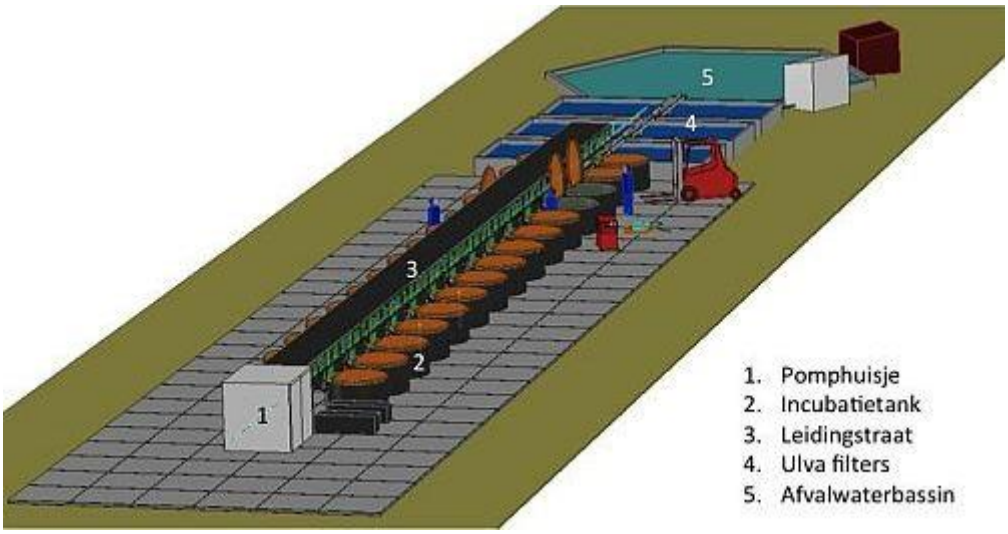
quarantaine geplaatst. Dit geldt ook voor gecultiveerd zeewier uit zee wat na oogst in leven gehouden wordt voor selectie en veredeling. Elke locatie krijgt zo zijn eigen tank waarin gedurende de eerste periode gemonitord wordt hoe de zeewieren zich houden in de tanks en of er andere organismen aanwezig zijn die schadelijk zijn voor de zeewieren. Waar nodig wordt het zeewier behandelt tegen herbivoren. Als alles OK wordt bevonden kunnen cultivatie tanks vervolgens eventueel samengevoegd worden om ruimte te besparen, waarbij zeewieren duidelijk van te voren gelabeld worden. Naast het voorkomen van plagen in de tanks zorgt deze methode er ook voor dat invasieve soorten geen kans krijgen zich te verspreiden via ons tank systeem. Aangezien er zeewieren vanuit heel Europa verzamelt worden, en deze zeewieren vaak ongenodigde lifters met zich mee dragen, bestaat er de kans dat er soorten mee genomen worden naar de locatie op Texel (Nederland), die niet van nature voorkomen in de omgeving van Texel. Door deze quarantaine maatregels voorkomen wij dat deze invasieve soorten zich kunnen huisvesten in onze tanks, en als gevolg kan ons systeem dus niet functioneren als infectiebron voor invasieve soorten in de Waddenzee.

Het Nederlands Zeewier Onderzoekcentrum



figuur 8; Cultivatie tanks in het zeewiercentrum (© Klaas Timmermans NIOZ)

Gedurende dit project zijn er cultivatie tanks voor buiten ontwikkelt en gebouwd. Deze tank designs zijn vervolgens geïntegreerd in het Nederlands Zeewier Onderzoekcentrum. Dit centrum is in nauwe samenwerking tussen het NIOZ en Hortimare tot stand gekomen en bestaat uit 26 cultivatie tanks (elk 1600 liter), 3 zeewier biofilter tanks en bijbehorende systemen voor het reguleren van water temperatuur, beluchting en aanvoer van verversing zeewater. Elke tank bevat een beluchting systeem waarmee het zeewier voortdurend in beweging blijft. Bovendien zorgt deze beluchting voor gasuitwisseling in het zeewater, zodat koolstofdioxide waardes en pH constant blijven. De tanks zijn volledig geïsoleerd en bevat in de wanden een koelring systeem dat verwarmd/verkoeld met behulp van aardwarmte bronnen die speciaal hiervoor zijn geslagen naast het centrum. Door deze bronnen kan het zeewater in de bakken gedurende het gehele jaar tussen de 10-15 ° Celsius gehouden worden, zelfs op warme zomerdagen. Bovendien is hiermee een minimale energiebehoefte van het zeewiercentrum gegarandeerd. Gefilterd zeewater en perslucht worden vanuit een centrale leidingstraat aangeleverd en met behulp van deksels kan het licht niveau aangepast worden in de tanks. Het water dat vervolgens uit de tanks stroomt wordt behandelt in een biologische zeewierfilter met daarin zeesla (*Ulva lactuca*), waarna het wordt teruggepompt in de Waddenzee. Er is voor zeesla gekozen omdat deze soort zeewier uitstekende absorberende kwaliteiten heeft voor rest nutriënten en een zeer hoge groei snelheid kan behalen.



figuur 9;Schematische overzicht van het Nederlands Zeewier Onderzoekcentrum

Binnen faciliteiten

Naast de uitgebreide buiten faciliteiten in het zeewiercentrum is er ook ontwikkeling van verschillende systemen binnen geweest om vooral kleinere sporofyten (onder de 10 cm) te over zomeren. Hiervoor zijn kleinschalige replica's gemaakt van de cultivatie tanks buiten, zonder koelsysteem aangezien deze kleine tanks in een klimaatkamer staan. In deze kleine tanks kunnen zeewierlijnen opgehangen worden zodat deze onder gecontroleerde omstandigheden uit kunnen groeien, zeer essentieel voor de selectie en veredeling van zeewierrassen. Daarnaast is er een systeem opgezet waarbij grote cultivatie flessen worden gebruikt (*Fig.10*). Deze flessen stellen ons in staat om nieuw geïnduceerd materiaal naar voldoende grootte te laten groeien zodat deze eventueel geplant kunnen worden op dragers (bijv. touw).

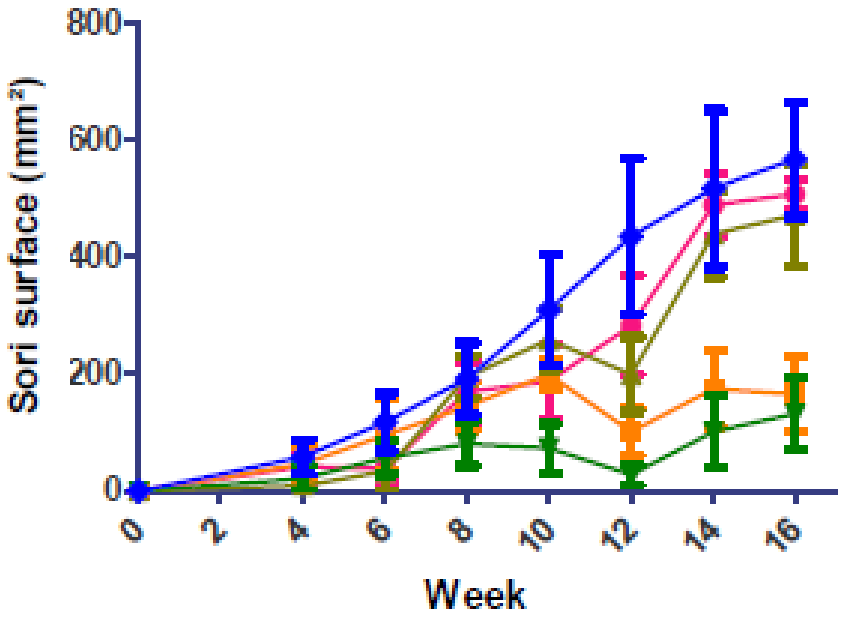


figuur 10; Voorbeeld van cultivatie reactor met daarin jonge Saccharina latissima (2-5cm)

1.4. Ontwikkeling en toepassing van een kunstmatige inductie van sporenvorming bij sporofyten in een gecontroleerd systeem (methode Luning). (Bijlage M)

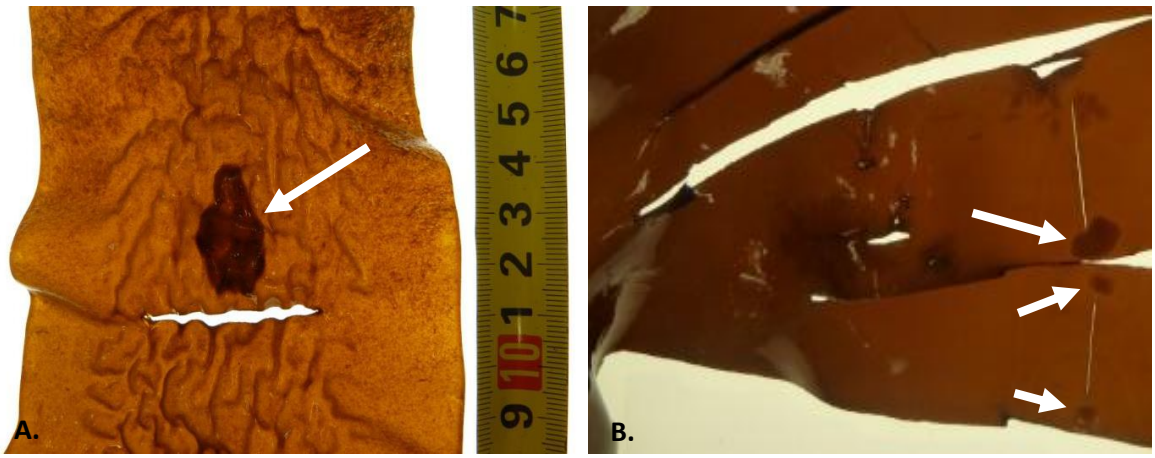
Om de selectie en veredeling van kelp soorten te versnellen moeten er bruikbare methodes ontwikkelt worden waarbij sorus formatie wordt gestimuleerd in volwassen sporofyten. Sorus is het weefsel dat zich vormt op het blaf van het kelp, waarin sporen worden aangemaakt. De huidige manier zoals beschreven in de literatuur blijken te lang te duren en zijn dus niet efficiënt genoeg. Met dit in gedachte is er onderzoek gedaan binnen het project naar de kunstmatige inductie van sorus met behulp van hormoon of inkeping behandelingen. Daarnaast werd er gezocht naar een betere identificatie methode om rijpe sorus te kunnen identificeren.

Uit dit onderzoek zijn positieve resultaten gekomen die momenteel geïmplementeerd zijn binnen de werkwijze van Hortimare. Tijdens het onderzoek kwam naar voren dat hormoon behandeling met ethyleen positieve invloed heeft op de vorming van sorus. Daarnaast is een nutriënt arm medium het beste voor de vorming van sorus (*Fig.11*). De sporen die door deze behandelingen gevormd werden zijn levensvatbaar wat laat zien dat de behandelingen veilig zijn voor gebruik in zeewier.



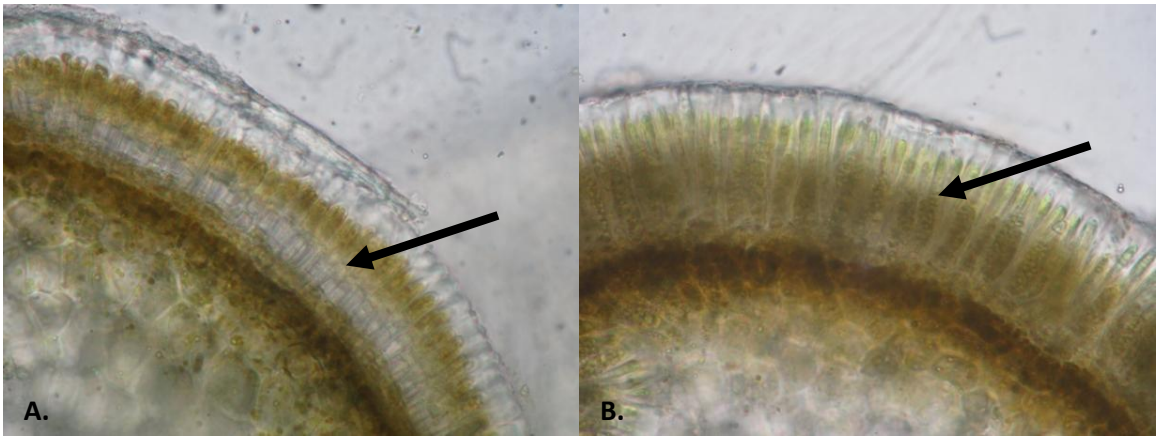
figuur 11; Sorus formatie op vingerwier (Laminaria digitata) gedurende de tijd als gevolg van verschillende behandelingen. Groen/Oranje = hoog nutriënt medium, Roze/Olijf = laag nutriënt medium, Blauw = ethyleen behandeling.

Naast een hormoon behandeling waren er ook indicaties te vinden in de literatuur waarbij het maken van inkepingen in het blad de vorming van sorus bevordert. Na het insnijden van inkepingen in het blad vormt zich inderdaad sorus in zowel suikerwier (*Saccharina latissima*) als vingerwier (*Laminaria digitata*) (*Fig.12*). Echter bleek dat de methode waarbij dit gebeurd in beide soorten zeer verschillend is. Bij suikerwier vormt de sorus zich achter de inkeping, gezien vanaf het meristeem. Dit duidt erop dat een afwezigheid van hormonen gevormd in het meristeem zorgen voor de vorming van sorus. In vingerwier lijkt dit juist andersom, want de sorus wordt gevormd aan de zijkant van de inkepingen, wat duidt op een ophoping van meristeem hormonen.



figuur 12; Vorming van sorus in suikerwier (A) en vingerwier (B). De sorus is te herkennen aan de donkere plek op het blad (zie pijlen).

De laatste resultaten die zijn behaald uit dit onderzoek laten zien dat met eenvoudige dwarsdoorsnedes maken van het blad kan worden bepaald of de sorus rijp is (*Fig.13*). Met behulp van een microscoop kan relatief eenvoudig gezien worden of en hoeveel zoösporen aanwezig zijn in het gevormde sorus. Deze methode is toepasbaar op alle kelp soorten die Hortimare momenteel in het assortiment heeft. Daarnaast blijkt ervaring van de beoordelaar en vorm/kleur van de sorus belangrijk voor de bepaling van rijpheid.



figuur 13; Dwarsdoorsnede van vingerwier sorus. In de sporangiën (onderdeel van de sorus) is duidelijk te zien wanneer er geen zoösporen (A) of wel zoösporen (B) aanwezig zijn.

2. Selectiestrategie: welke benadering in selectie en veredeling kan het beste worden gekozen voor de beoogde kenmerken. Kruisingstechnieken en methoden.

2.1. Ontwikkelen van de selectiestrategie voor groeikracht, groeisnelheid, temperatuur gevoeligheid en eiwitgehalte.

De evaluatie van verschillende selectiestrategieën heeft plaats gevonden gedurende het gehele project. Hier kwamen verschillende strategieën naar voren die zeer geschikt lijken voor zeewier veredeling, maar ook werden er beperkingen gevonden.

Zo blijkt dat massa selectie voor Hortimare een zeer effectieve manier is om snel een stap te kunnen maken richting een meer uniform ras. Als men kijkt naar de sporofyten qua morfologie en groei in het wild valt op dat er grote variatie is hierin. Dit betekent ook dat mocht deze wild type gecultiveerd gaan worden dat men te maken krijgt met grote variatie in de cultivatie velden. Dit is niet altijd wenselijk aangezien het zeewier voor verschillende doeleindes gebruikt wordt. Denk bijvoorbeeld aan de voeding industrie waarbij het wenselijk is een consistent product te kunnen leveren, niet alleen wat betreft voedselveiligheid eisen maar ook voor product uiterlijk. Door massa selectie toe te passen op deze wild type zeewieren kan er al snel vooruitgang geboekt worden als het gaat om krop uniformiteit. Bovendien is aan deze manier van veredelen geen hoge onderzoekskosten verbonden, omdat er sprake is van de klassieke manier van veredelen. DNA technieken, zoals merker ontwikkeling voor specifieke eigenschappen, komen hierbij niet direct aan bod. Deze techniek is dus ideaal voor een nieuw bedrijf als Hortimare om snel vooruit te kunnen in de veredeling van zeewier.

Willen we echter verder gaan met deze techniek dan de uniformiteit verhogen van een zeewier ras, dan is massaselectie niet de ideale manier. Dit komt omdat er meerdere generaties van zeewier nodig zijn om daadwerkelijk te kunnen screenen voor selecte eigenschappen als verhoogd proteïne gehalte. Om deze screening uit te kunnen voeren moet er gewerkt worden met volwassen sporofyten, want het heeft geen zin om dit soort eigenschappen te meten in onvolgroeide sporofyten. De samenstelling van het zeewier verandert namelijk naarmate het ouder wordt, waarbij de verhoudingen van proteïnes, suikers, pigmenten en alginaten veranderen gedurende de tijd. Dit houdt in dat elke generatie volledig uitgegroeid moet zijn, een proces van tenminste een half jaar. Daarnaast moeten deze sporofyten dan ook in stand gehouden worden totdat zij vruchtbaar worden voor het produceren van de volgende generatie sporofyten uit de ouderplanten die de juiste eigenschappen vertonen. Kortom een tijds intensief proces voor specifieke eigenschappen als proteïne gehalte verhogen.

Momenteel is er weinig wetgeving rondom het kweken van zeewier in Europa. Dit komt omdat er sprake is van een nieuwe sector waardoor dit soort problematiek die geassocieerd wordt met zeewierteelt nog niet eerder naar voren is gekomen. Hieronder valt het maken van hybriden binnen een bepaalde soort zeewier tussen verschillende geografische locaties voor cultivatie op open zee, het telen van uitheemse soorten en het maken van hybriden tussen 2 soorten zeewier voor gebruik in open zee cultivatie. Er is wetgeving aanwezig hiervoor als het gaat om bepaalde land gewassen, waarbij er een proces doorlopen moet worden als het gaat over plant reproductie materiaal binnen de EU. In het kort, hierbij moet er verantwoord worden waarom deze soort/dit type plant geteeld moet gaan worden en wat de impact ervan is op lokale ecosystemen. Verder moet er door een autonome autoriteit (bijv. Naktuinbouw) vast gesteld worden dat

er sprake is van een nieuw ras waarbij deze autoriteit het ras test op karakteristieken, uniformiteit en stabiliteit. Echter geldt deze regeling op het moment niet voor zeewier soorten. Hortimare heeft hierop als antwoord een progressieve houding genomen en besloten alleen inheemse zeewieren soorten beschikbaar te stellen als zaad voor de zeewierteelt industrie. Daarnaast wordt er alleen lokaal materiaal gebruikt van binnen straal van 100 kilometer van de teelt locatie om het benodigde zaad te produceren voor deze teelt. Dit betekent feitelijk dat voor elke locatie op het moment waaraan Hortimare levert specifieke cultures opgezet worden om deze bedrijf visie te kunnen volgen. Verspreiding van ecotypes door verlies van krop is een veel groter probleem in de zee dan op land, omdat er sprake is van een veel opener systeem door zeestromingen, golfactie, etc. Hiermee voorkomen wij als Hortimare ervoor dat de lokale zeewierpopulaties te maken krijgen met een influx van ecotypes en soorten die potentieel schadelijk kunnen zijn voor deze natuurlijke populaties. Bovendien zorgt het gebruik van lokaal materiaal er voor dat er uitsluitend lokale genen gebruikt worden in de lokale teelt.

Naast het gebruik van lokaal materiaal om zeewier rassen te creëren is gebleken dat een triploïd ras een potentieel antwoord kan zijn op het probleem van verspreiding van ongewenste genen in een natuurlijke populatie. Door triploïdie te induceren in zeewier zorgt dit ervoor dat het wier infertiel wordt, wat betekent dat er geen levensvatbare zoösporen gemaakt worden in de sorus. Dit zorgt ervoor dat er geen verspreiding van het zeewier ras kan plaats vinden via natuurlijke verspreiding door middel van voortplanting. Echter blijkt dat de plasticiteit van de ploïdie in zeewier groot is wat voor problemen zorgt. De kelp soorten die momenteel geteeld worden passen het ploïdie niveau aan naarmate zij groeien, wat betekent dat een zeewier individu zowel diploïd, tetraploïd als hexaploïd kan zijn en dat de weefsels gedurende groei van ploïdie niveau veranderen. De vraag is dus of zeewier rassen die triploïd zijn gemaakt om verspreiding tegen te gaan daadwerkelijk triploïd blijven van aard. De enige manier om dit uit te zoeken is om daadwerkelijk triploïde rassen te kweken welke getest moeten worden op fertiliteit en ploïdie niveau gedurende de gehele groei fase. Er zijn voor zover 2 methodes geïdentificeerd om deze rassen te kweken, waarbij bij de eerste methode de mannelijke of vrouwelijk gametofyt diploïd gemaakt wordt. Door deze diploïde gametofyt vervolgens te kruisen met een haploïd gametofyt ontstaat er een triploïd sporofyt. De tweede methode is om nadat er een diploïd ras is gekruist in dit ras triploïdie te induceren. De voorkeur gaat momenteel naar de eerste methode, omdat dit een simpeler proces is waarbij met gebruik van gametofyt kloonlijnen verzekerd kan worden dat er daadwerkelijk een triploïd sporofyt ontstaat. De tweede methode kan namelijk ook leiden tot tetraploïdie of hogere niveaus in de sporofyten.

Polyploïdie induceren is ook een methode om zeewier rassen significant te verbeteren op bepaalde eigenschappen. Het is bekend van landgewassen dat polyploïdie heeft geleidt tot exceptionele groeikracht en grote vruchten. Als voorbeeld, de aardbei die geteeld wordt is een octaploïd, wat betekent dat er 8 sets chromosomen aanwezig zijn. Gezien ploïdie niveau een plastisch iets is in zeewier betekent dit dat het vrij eenvoudig is om polyploïdie te induceren in sporofyten en daarmee ook om te zoeken naar verbeterde eigenschappen als hoge groeikracht als gevolg van verhoogd ploïdie niveau. Echter moeten er nog wel een hoop andere methodes ontwikkelt worden om het ploïdie niveau accuraat te kunnen meten op een eenvoudige manier. Dit kan bijvoorbeeld gedaan worden met een cel counter/flowcytometer. Verder is het momenteel als gevolg de vraag met welk ploïdie niveau er daadwerkelijk gewerkt wordt als men sporofyten uit wild populaties verzameld voor veredeling doeleinde.

In hoofdstuk 7.3 zal de uiteindelijke selectie strategie waarvoor Hortimare heeft gekozen uitgelegd worden. Deze strategie bestaat uit meerdere facetten, waaronder massa selectie, merker-geassisteerde selectie en polyploïdie inductie.

2.2. Kenmerken bepalen van zeewieren en de bijbehorende selectiemethoden ontwikkelen (morfologische, biochemische en/of moleculaire testen) voor toepassing in projectfase op zowel sporofyt als gametofyt stadium

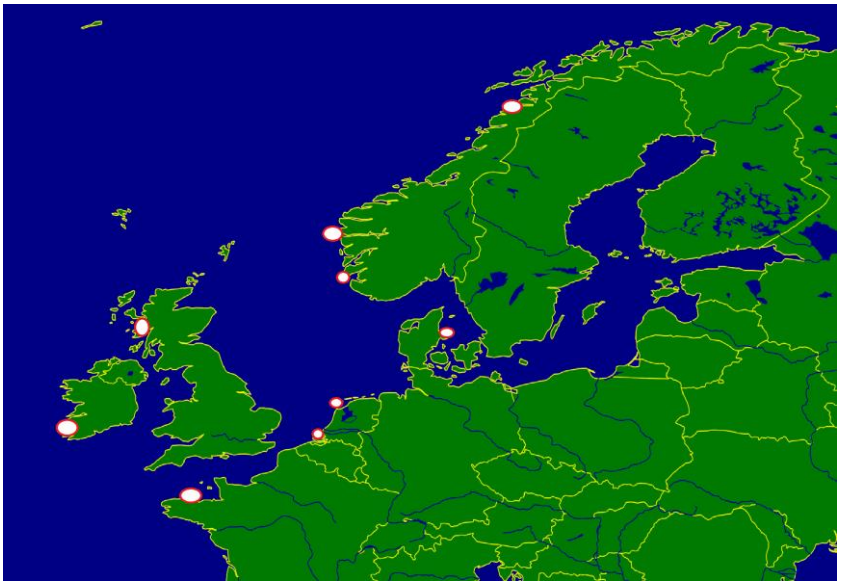
Kenmerken van gametofyten en sporofyten moeten gekarakteriseerd worden zodat reproductie van de karakterisering mogelijk wordt. Bij sommige kenmerken is een schematische tekening genoeg. Dit zijn morfologische kenmerken die goed te zien zijn bij gametofyten als ook sporofyten. Andere kenmerken zijn iets lastiger te benoemen omdat die locatie of tijds afhankelijk zijn. Groeisnelheid is een kenmerk die alleen goed beoordeeld kan worden op het moment dat twee vergelijkbare sporofyten naast elkaar groeien. Bij Hortimare is op het moment vooral veel vooruitgang geboekt bij de visuele kenmerken. Dit wordt hieronder dan ook verder uitgelicht. Wel zijn de eerste stappen gemaakt om de plaats en tijds gebonden kenmerken in kaart te brengen. Dit wordt uitgelegd bij de geproduceerde F1 hybriden die geplaatst zijn in Noorwegen in hoofdstuk 5.3.

Morfologie van de gametofyt

Er is een begin gemaakt met de karakterisering van morfologische kenmerken binnen gametofyten. Hier is vooral onderzoek gedaan naar morfologische verschillen tussen soorten (e.g. *Laminaria digitata, Alaria esculenta, en Saccharina latissima*), sekse, en regio van herkomst. Resultaten worden verder toegelicht in hoofdstuk 6.2 maar is ook te vinden in bijlage B.

Morfologie van de sporofyt

De morfologie van Saccharina latissima wordt al uitgebreid bijgehouden vanuit veel verschillende locaties. De locaties waar de sporofyten zijn verzameld zijn gehighlight in *Fig.14*

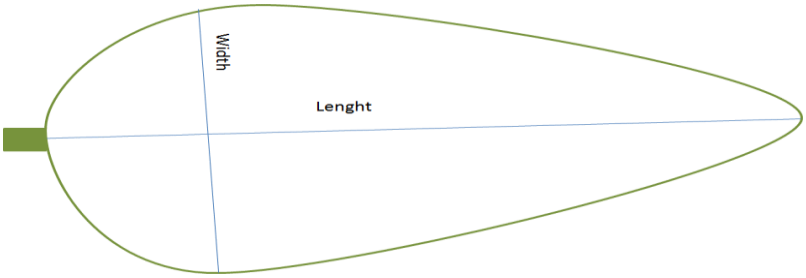


figuur 14; Kaart van Noordwest Europa met in het wit de locaties waar zeewier is verzameld gedurende het hatchery project

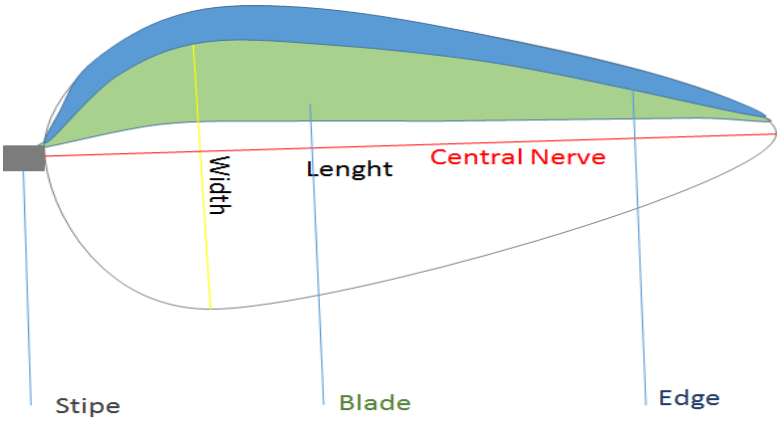
Er zijn grote verschillen gevonden in morfologie tussen planten uit de verschillende regio's. Die grootste verschillen zitten in de kleur van de frond, de breedte van de frond, en de dikte van de frond. Zo zijn de fronds over het algemeen donkerder naarmate je naar het zuiden gaat. Zijn Noorse individuen over het

algemeen een stuk breder dan soort genoten en zijn sporpophyten uit de Faeröer eilanden en Ierland een stuk dikker dan soortgenoten uit Noorwegen.

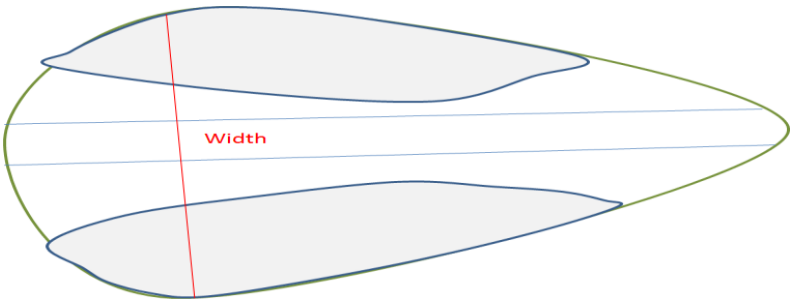
Om dit soort kenmerken reproduceerbaar te maken is een sleutel gemaakt waarmee nieuwe Saccharina's uit Noord west Europa gekenmerkt kunnen worden. Deze sleutel legt uit welke delen van de plant opgemeten dienen te worden en wat voor morfologische kenmerken tot uiting kunnen komen bij de verschillende sporofyten. Hieronder worden de verschillende te volgen kenmerken uitgelegd.



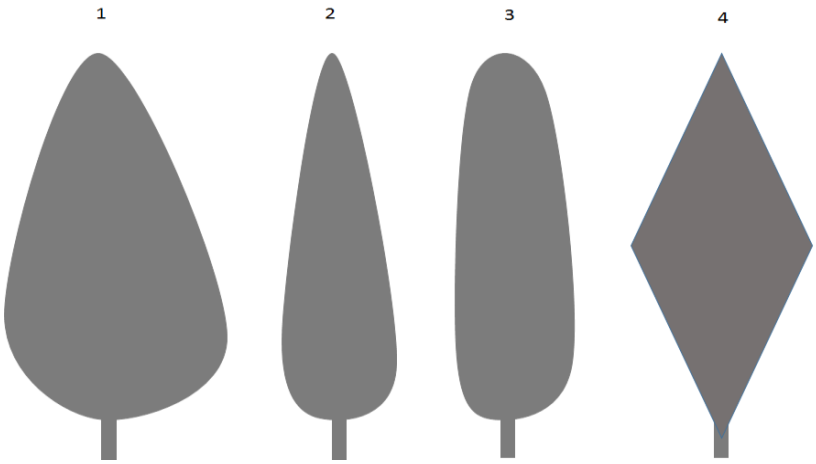
figuur 15; De lengte en breedte van de frond zijn makkelijk te bepalen. Hierbij is het belangrijk te vertellen dat de breedte heel specifiek gedaan dient te worden nabij de regio uit het plaatje. De ratio tussen de twee metingen kan een belangrijke maatstaf zijn voor morfologie.



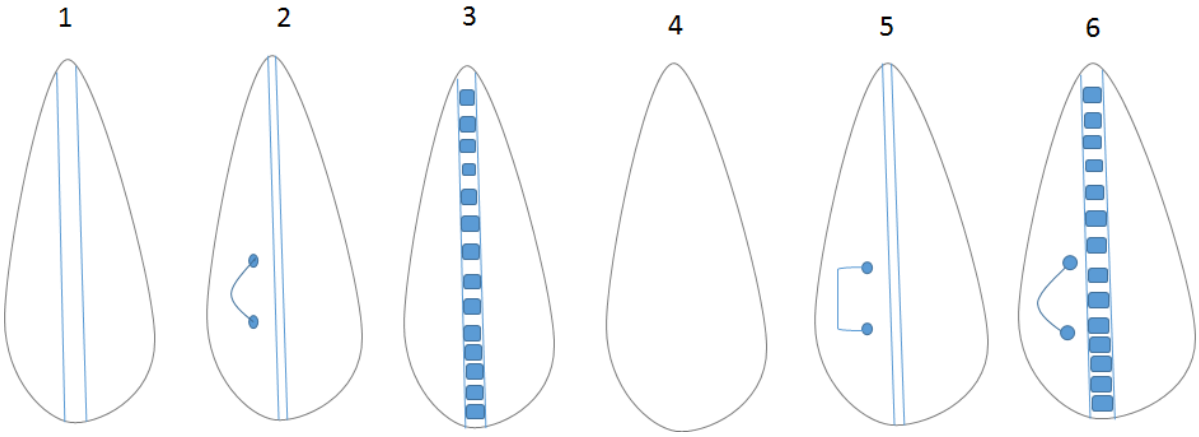
figuur 16; De frond heeft specifieke regio's die duidelijk verschillen van elkaar. Je heb de midden nerf die bij de overgrote meerderheid goed gedefinieerd is. Verder is de frond duidelijk te onderscheiden en gelokaliseerd tussen de middennerf en de rand. De rand is het dunste deel van het blad en is gegolft. Onder water staat de rand vaak omhoog.



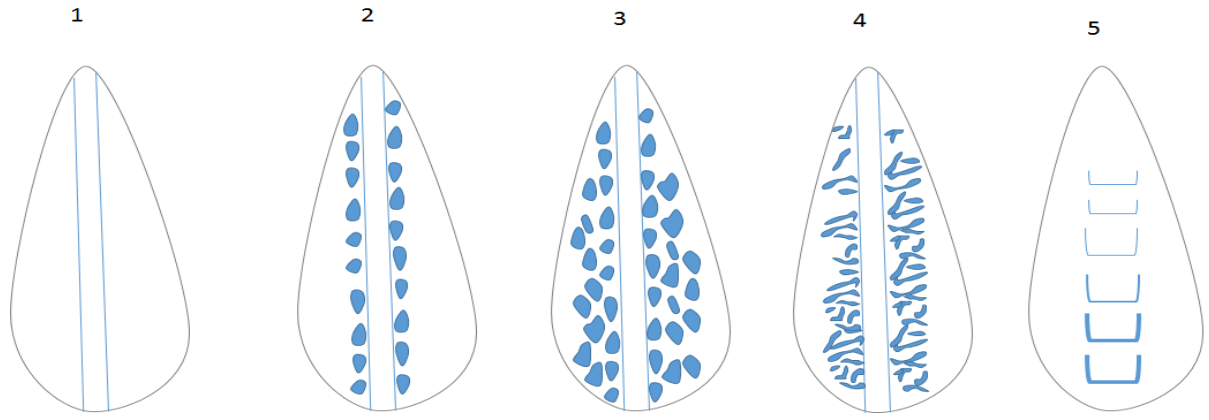
figuur 17; De middennerf, de frond, en de rand zijn allen aparte delen van de frond en goed uit elkaar te houden. Je kan de breedte van alle 3 de delen goed bepalen. In het geval van de rand is dit makkelijk door dit dubbel te vouwen over de frond. Het verschil tussen de totale blad breedte en de cumulatieve breedtes van midden nerf en frond is dan ook de breedte van de rand.



figuur 18; De algehele vorm van de frond is erg belangrijk sinds er grote verschillen te vinden zijn tussen regio's. De vorm van de silouet van de frond kan kerstboom vormig, ruitvormig, of juist komkommervormig zijn.



figuur 19; De midden nerf is een duidelijke structuur die veel verschillen toont tussen individuen. De middennerf kan nauwelijks voorkomen (4), tot erg veel reliëf laten (3 of 6). De middennerf lijkt gedeeltelijk afhankelijk van de omgevingsfactoren zoals stroom sterkte. Bij ruwere omstandigheden lijkt de middennerf wat meer reliëf te tonen.



figuur 20; De morfologie van de frond (stuk blad tussen de middennerf en de rand) verschilt erg veel tussen individuen uit verschillende regio's. Zo zijn pokken (deukjes in het blad) een erg veel voorkomend verschijnsel in de fronds. De grootte en hoeveelheid kan geschaald worden (1t/m 4) en is locatie specifiek.

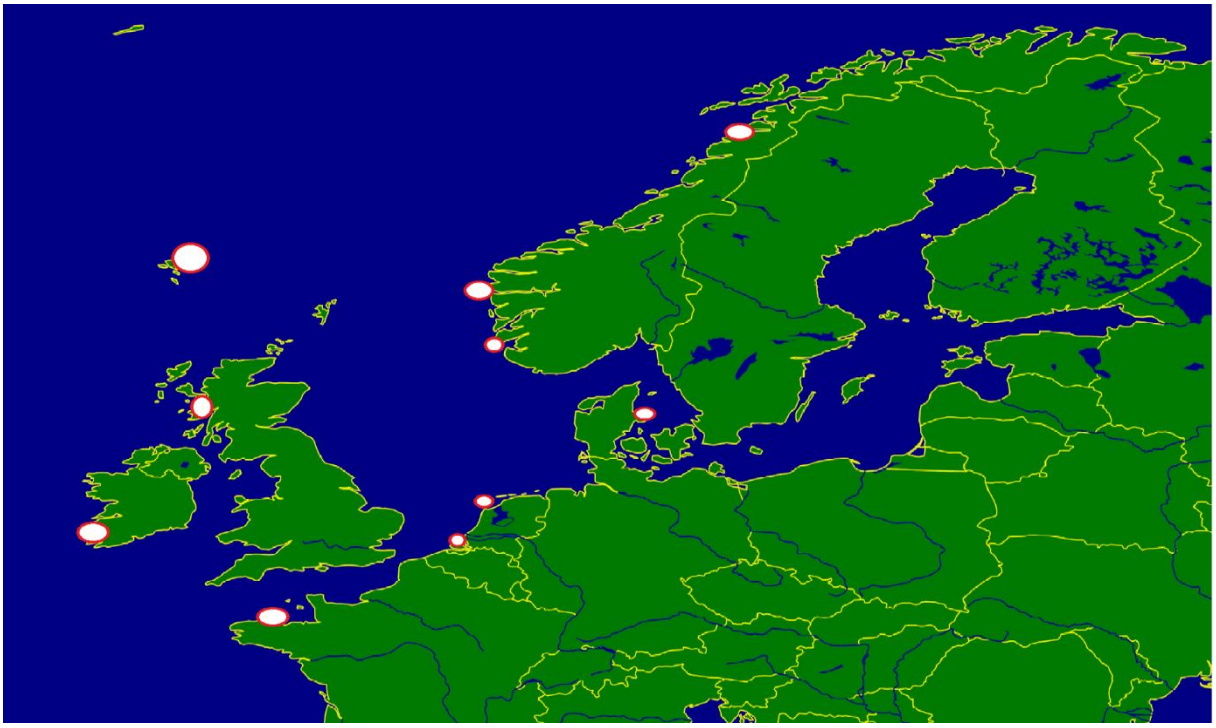
Om de verschillen tussen individuen iets beter toe te lichten zijn er wat foto's toegevoegd van individuen die opgemeten zijn in de omgeving van Bodo (noorwegen).



figuur 21; 3 individuen die voor het getrainde oog erg van elkaar verschillen. Zo heeft individu 3 een erg kerstboom achtige silhouet en zijn individuen 1 en 2 mee komkommervormig, Individu 1 en 3 hebben een erg grote "rand" terwijl individu 2 juist een minder gedefinieerde rand heeft. De middennerf van plant 1 en 2 zijn erg duidelijk zichtbaar en relatief breed ten opzichte van de middennerf van plant 3.

3. Verzamelen en identificeren van basismateriaal, opzetten van gametofytenklonen

3.1. Verzamelen van sporenmateriaal van diverse herkomsten (5) en morfotypes van *Saccharina latissima* en *Laminaria digitata*.



figuur 22; Topografische kaart van Noordwest Europa met daarin in het wit de locaties van de verzamelde zeewieren

Elke locatie die gemerkt is in bovenstaande kaart van Europa wordt gekenmerkt met specifieke omgevingsfactoren. Om de verschillen duidelijker in kaart te brengen worden alleen de buitengewone omgevingsfactoren op een rijtje gezet in *tabel 1.*

Tabel 1; Locaties waar de verzamelde zeewieren vandaan komen. In de tabel is beschreven welke soorten gevonden zijn en wat de lokale weersomstandigheden zijn. Let wel, de weersomstandigheden die vermeld zijn, zijn alleen de buitengewone verschillen tussen de locaties.

Locatie	**Soorten**	**Buitengewone omgevingsfactoren**
Nederland Texel	Saccharina, Laminaria	Sterke stroming, troebel water, open zee
Nederland Oosterschelde	Saccharina	Kalm water, troebel water
Noorwegen Solund	Saccharina, Alaria, Laminaria	Kalm water, helder water, koud water,
Noorwegen zuiden		
Noorwegen, Bodø	Saccharina, Alaria	Weinig licht in winter, koud, rustig water, helder water
Schotland, sound of kerrera	Saccharina	Ruig weer, open oceaan
Ierland, Cleggan bay	Saccharina, Laminaria	Ruig weer, open oceaan
Faeröer eilanden, Funningsfjørdur	Saccharina, Alaria	Ruig weer, helder water, open oceaan, donkere winters
Frankrijk, Bretagne	Saccharina, Laminaria	Relatief warm water, troebel water
Denemarken, Aarhus	Saccharina, Laminaria	Troebel water, relatief lage saliniteit

De individuen uit bovengenoemde locaties verschillen logischerwijs van elkaar. Er moet echter wel onderscheid worden gemaakt tussen verschillen op intraregionaal niveau en verschillen op interregionaal niveau. Interregionale verschillen worden namelijk bepaald uit gemiddelde morfotypes Saccharina per locatie. Onderstaand tabel *(tabel 2)* laten de voorlopige conclusies zien van ons vergelijkend onderzoek op interregionaal niveau. Beschreven zijn ook de wat gedetailleerdere verschillen die op intraregionaal niveau verschillen, maar die kunnen wij op het moment nog niet met zekerheid bevestigen. Voor verdere uitleg van onderstaand beschreven kenmerken kan gerefereerd worden naar hoofdstuk 2.2

Tabel 2; Kenmerken van de Saccharina latissima uit de verschillende locaties die hierboven aangeduid zijn.

Locatie	**Relatieve grootte**	**Duidelijke interregionale kenmerken**	**Gedetailleerde intraregionale kenmerken**
Nederland, Texel	Klein	smal, donkere kleur	Frond morfologie 2
Nederland, Zeeland	Gemiddeld	smal, donkere kleur	Frond morfologie 2
Noorwegen, Solund	Groot	Breed, lichte kleur, kerstvorm silhouet	Middennerf morfologie 1 of 5
Noorwegen, zuiden	Gemiddeld	Breed, lichte kleur, komkommer silhouet	(geen data)
Noorwegen, Bodø	Gemiddeld	Breed, dun blad, lichte kleur	Middennerf morfologie 1 of 4
Schotland, sound of kerrera	(geen data)	(geen data)	(geen data)
Ierland, Cleggan bay	Groot	Donkerder, komkommer silhouet,	Frond morfologie 3 of 4
Faeröer eilanden, Funningsfjørdur	Groot	Donkerder, komkommer silhouet	Frond morfologie 4 en middennerf morfologie 4
Frankrijk, Bretagne	Gemiddeld	Donker, gerafelde rand,	Frond morfologie 3

Denemarken, Aarhus	Klein	Donkerder, smal blad, wokkel silhouet	Frond morfologie 2 of 3

De individuen uit *Fig.23* zijn allen afkomstig uit verschillende locaties maar opgegroeid onder gecontroleerde omstandigheden. De verschillen in morfologie zijn dan logischerwijs genetisch te noemen.



figuur 23; In situ opgegroeide individuen uit Noorwegen (links), Faeröer eilanden (midden), en Nederland (rechts) zijn opgemeten en met elkaar vergeleken. De verschillen in morfologie zijn voornamelijk genetisch omdat de groeiomstandigheden vergelijkbaar waren. Hierin is duidelijk de lichte kleuring van de Noorse individu te zien. Faeröer en Nederlandse individuen zijn aanzienlijk donkerder. De Nederlandse morfotypes hebben over het algemeen de dunste frond van alle 3 bovengenoemde individuen zoals is te zien.

3.2. Opzetten en instandhouding van gametofytencultures die de gehele genenpool bevatten van de diverse herkomsten

Genetisch materiaal wordt opgeslagen door extracties van zoösporen uit de sporofyten uit alle locaties die boven beschreven zijn. Vanuit deze gameten bank worden dan kloonlijnen gemaakt die na enkele maanden van opschaling worden gekruist met de andere sekse. De daar uitvloeiende F1 hybride is dan het resultaat waar fenotypische karakterisering op mogelijk is.

Langdurige opslag is cruciaal voor het succes van ons veredelingsprogramma. Naast het schoonhouden van de cultures zoals beschreven in hoofdstuk 1.1 zijn er meer ontwikkelingen gaande die deze immer groeiende opslag in goede banen gidst. Hier wordt uitgelegd hoe de kloonlijn opslag eruit ziet en waar wij bij Hortimare op latten.

Kloonlijn opslag

Kloonlijnen worden gemaakt uit gametofyt individuen die geselecteerd zijn uit de gametenbank. In dit proces zijn 4 stappen cruciaal voor het succesvol kloneren en onderhouden van de kloonlijn opslag. Ten eerste moet er een correcte primaire analyse van de te kloneren gametofyt komen. Ten tweede is het belangrijk dat de gametofyt op de juiste manier gekloneerd wordt. Ten derde moet de kloonlijn gearchiveerd worden voor later gebruik. En als laatste is het belangrijk dat de kloonlijnen op de juiste manier worden beoordeeld.

De primaire analyse van het start materiaal.

De primaire analyse van de geïsoleerde gametofyt is uiterst belangrijk. Het voorkomt veel toekomstige problemen als je een gezonde/schone gametofyt gaat kloneren. De analyse wordt visueel gedaan onder

een microscoop. De kwaliteit van de analyse is dan ook vooral afhankelijk van de ervaring van de onderzoeker. Bepaalde aspecten zijn essentieel voor succesvolle opslag van de gametofyt cultures.

Ten eerste moet goed gekeken worden naar de reinheid van de nieuwe kloonlijn. De gametofyt bank is hiervoor de belangrijkste stap te controleren omdat de extractie de fase is waarin de grootste kans van infectie zit. Is de culture schoon in de gametofyt bank fase dan is de kans heel groot dat de culture schoon gehouden kan worden in daaropvolgende fases. In de gametofyt bank fase wordt door middel van een verdunning reeks de kans op enige infectie geminimaliseerd. Enkele maanden na de initiële extractie zal de te klonen gametofyt uitgegroeid zijn. Deze lange uitgroei periode is echter ook belangrijk om zeker te zijn dat in de culture met de gametofyt geen infectie bron zit. Schone cultures zijn helder zonder zichtbare infecties als fungus, excavata, uniconta als ook microalgen. Cultures die grote hoeveelheden bacteriën laten zien worden echter nu nog als gezond bestempeld. Dit komt omdat ze tot nog toe niet als schadelijk worden gezien voor de gametofyt culture. Tevens is het uiterst lastig een bacterie vrije culture te genereren.

Ten tweede wordt er een gezondheid analyse gedaan. Na extractie zijn er regelmatig gametofyten die desondanks een infectie loze culture toch erg ongezond zijn. Een belangrijke maatstaaf voor gezondheid is de kleur. Gezonde Gametofyt cultures zien er helder bruin uit. Als ze ongezond worden dan neigen ze naar een gelige of zelfs grijzige kleur. Er moet wel opgelet worden dat kleur sekse specifiek en soort specifiek is. Zo zijn mannelijke gametofyt over het algemeen donkerder van kleur dan de vrouwelijke gametofyt. Ook zijn de gametofyten van *Laminaria digitata* over het algemeen donkerder dan de gametofyten van *Saccharina latissima* of *Alaria esculenta*.

Ten derde is het essentieel om een correcte sekse bepaling te doen van de gametofyt. Het is essentieel om dit zorgvuldig te doen omdat een juiste sekse bepaling in latere fases van de opschaling steeds lastiger wordt. Definitieve sekse bepaling kan pas met zekerheid vastgesteld worden wanneer er succesvolle kruisingen worden gedaan in latere fases van de veredeling.

Het produceren van een kloonlijn

De geïsoleerde gametofyt uit de gametofyt bank die geschikt wordt bevonden, zal worden gegrind en overgeplaatst naar een eigen nieuwe titerplaat. De titerplaat zal een eigen codering krijgen en verplaatst worden naar de kloonlijn afdeling.

Het grinden van een kloonlijn is relatief simpel te doen. Hiervoor gebruik je zogenaamde homogenisatoren die een gametofyt zal grinden tot vele gametofyt stukjes. Deze stukjes zullen te zijner tijd weer uitgroeien tot grotere gametofyten en klaar zijn voor verdere opschaling.

Zo steriel mogelijk werken is een must en wordt bereikt door gebruik van handschoenen en labjas. Verder is het schoonmaken van disposables (*e.g.* lepeltjes) met ethanol of chloor essentieel. Dit is niet alleen belangrijk voor de steriliteit, maar ook ter voorkoming van enige kruisbesmetting van kloonlijnen.

Na enige tijd zal de kloonlijn ver genoeg gegroeid zijn dat verdere opschaling mogelijk is. De stap van micro-titerplaat naar macro-titerplaat is dan mogelijk. Bovengenoemd proces wordt dan herhaald en wederom uitgegroeid totdat opschaling naar erlenmeyer mogelijk is. In de erlenmeyer fase wordt de kloonlijn officieel overgedragen aan de productie afdeling.

Archivering van de kloonlijnen

Het archiveren van de kloonlijn gebeurt door een code op de titerplaat die specifiek beschrijft wat de inhoud is. Deze beschrijving bevat het soort, de extractie datum, de locatie van ouderplanten en een nummering. De algemene codering bestaat uit twee segmenten (EQ 1) en lijkt op de code in *Fig.24*

EQ1: SA140404NO-1 SANO-001



figuur 24; Kloonlijn codering op een large well titerplaat.

De eerste 2 letters van het eerste segment beschrijven de soort. Soorten die worden gebruikt zijn; SA (*Sacharina latissima*), LD (*Laminaria digitata*), AL (*Alaria esculenta*), LH (*Laminaria hyperborean*).

*EQ2: **SA**140404NO-1 SANO-001*

de 6 opeenvolgende nummers is de extractie datum, beginnend met het jaartal.

EQ3: SA140404NO-1 SANO-001

De letters die komen na de datum behoren tot de locatie. Hierbij is recentelijk een verandering gaande van de wat algemenere locaties zoals NO (Noorwegen), NL (Nederland), IR (Ierland), SC (Schotland), FR (Frankrijk), FI (Faröer eilanden), en DK (Denemarken), naar de wat specifiekere locaties zoals SOL (Solneset), LEK (Leknesund), of TEX (Texel).

EQ4: SA140404NO-1 SANO-001

De nummer die als laatste wordt beschreven is het individu nummer. Dit nummer komt overeen met het nummer van de moederplant waaruit de gametofyten afkomstig zijn.

EQ5: SA140404NO-1 SANO-001

Het tweede segment van de code is de specifieke kloonlijn code. Hierin staat de aanwezige soort, de locatie, en het individu nummer die chronologisch verkregen wordt.

EQ6: SA140404NO-1 SANO-001

Aan de achterkant van de titerplaat wordt de klooncode herhaald. Het dubbel opschrijven van de klooncode faciliteert het zoek gemak in opslag (*Fig.25*)



figuur 25; Kloonlijn codering aan de achterkant van de titerplaat.

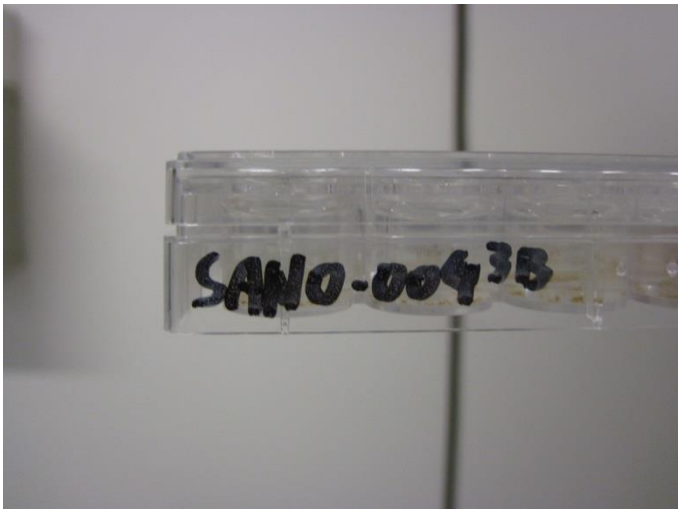
Onderling verschillen de groeisnelheden aanzienlijk tussen kloonlijnen. Deze verschil in groeisnelheid resulteert in verschillende hoeveelheden biomassa per kloonlijn per maand. Extra titerplaten kunnen worden gebruikt om groeisnelheid te optimaliseren zonder de cultuur op te schalen naar een volgend niveau (*e.g.* naar erlenmeyer niveau). Om deze interne opschaling te kunnen blijven volgen wordt de volgende additie in codering gebruikt. Deze codering geldt alleen wanneer een titerplaat wordt gemaakt van een al bestaande titerplaat uit het zelfde opschaling-niveau.

EQ7: SA140404NO-1 *SANO-(001)*[2]

In het geval dat er een nieuwe titerplaat wordt gemaakt vanuit een ander opschalingsniveau wordt een andere additie gebruikt.

EQ8: SA140404NO-1 *SANO-(001)B*

Dit kan uiteindelijk resulteren in onderstaande codering. (*Fig.26*)



figuur 26; Voorbeeld van kloonlijn die meerdere malen is opgeschaald vanuit een andere grootte schaal en inter in dezelfde grootte schaal.

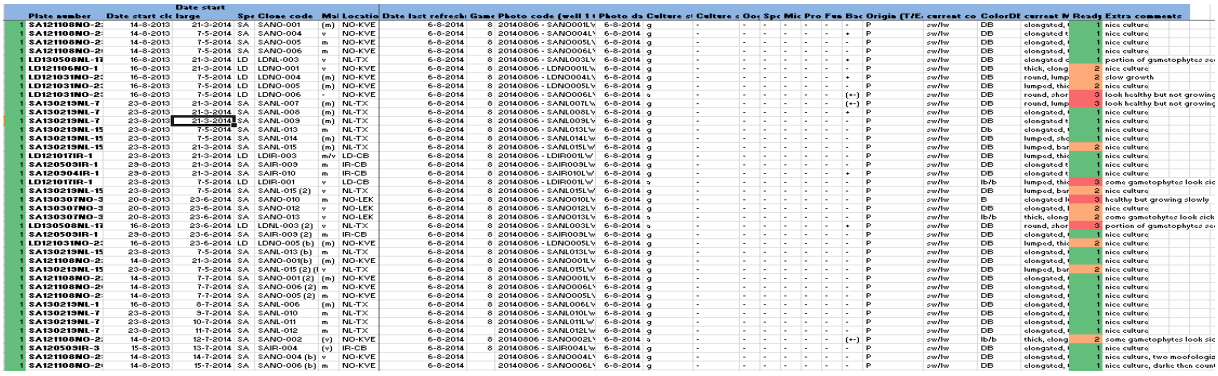
Evaluatie van de kloonlijnen

De evaluatie is een belangrijk onderdeel van het klonerings proces. Het zorgt ervoor dat naar oorzaken gezocht kan worden in geval van calamiteiten. Hierdoor kan goed gekeken worden wat de oorzaak van bijvoorbeeld de infectie is geweest en wanneer het precies gebeurt zou kunnen zijn. Met dit soort systematiek kunnen problemen in werkmethoden vroegtijdig opgespoord worden.

De verkregen data helpt ook in het begrijpen van groei, gezondheid, morfologie, en de reproductieve eigenschappen van de kloonlijn. Analyse hiervan zorgt verder voor een inkijk in genetische en overdraagbare eigenschappen van de gametofyten.

Sinds er weinig tot niets bekend is over gametofyten en het kloon proces evolueert het evaluatieproces constant,. Dit betekend dat de Excel file continu veranderd door de tijd heen. Zo zijn er gedurende de laatste paar jaar veel eigenschappen bijgekomen. Ook zijn er eigenschappen geschrapt die gaandeweg irrelevant bleken te zijn.

Op het moment ziet de digitale evaluatie en digitale opslag er zo uit (16-11-2015)



figuur 27; Lay-out van een Kloonlijn Excel file

De file bestaat in essentie uit 2 delen, de kloonlijn achtergrond informatie en de kloonlijn evaluatie *(Fig.27)*. De achtergrond informatie is de identiteit van de kloonlijn, de evaluatie is meer de geschiedenis sinds de gametofyt een kloonlijn is geworden. Naast de Excel file wordt er ook een foto bestand bijgehouden waarbij de gametofyt in een later stadium, met toekomstige kennis, alsnog beschreven kan worden.

3.3. Per herkomst en morfotype/eiwittype wordt uit het verzamelde materiaal als basismateriaal voor de kruisingen 5 mannelijke en 5 vrouwelijke gametofytenklonen gemaakt t.b.v. de volgende fase

Met het sporenmateriaal dat is verzameld van diverse herkomst zijn er gametofyt kloonlijnen gemaakt, in totaal meer dan 200 mannelijke/vrouwelijke kloonlijnen. Deze kloonlijnen zijn van meerdere soorten beschikbaar, namelijk suikerwier (*Saccharina latissima*), vingerwier (*Laminaria digitata*) en *Alaria esculenta*. De meeste kloonlijnen bevinden zich nog in de experimentele fase (titratie platen) van de vermeerdering van kloon gametofyten, echter zijn er een aantal die de juiste groei eigenschappen blijken te bezitten voor versnelde groei in de gametofyt fase (*Tabel 3*). Deze zijn dan ook opgeschaald naar groter volume voor productie (400 ml erlenmeyers en 8 l bioreactoren). Op het moment van schrijven is er genoeg gametofyt kloonlijn materiaal aanwezig om ongeveer 6 kilometer zeewier cultivatie lijn mee te bezaaien. Een aantal van deze combinaties worden op het moment getest in open zee in Noorwegen (zie hoofdstuk 2.3). Let op dat hierbij alleen de kloonlijnen worden getest die daar oorspronkelijk als ouderplant ook vandaag kwamen.

Tabel 3; Overzicht van de gametofyte kloonlijnen die momenteel in grootschalige productie zijn.

Kloonlijn code	Oorsprong	Soort	Sekse	Hoeveelheid biomassa (ml)
SAFI-013	Faroe Eilanden	Saccharina latissima	M	1
SAFI-016	Faroe Eilanden	Saccharina latissima	V	1
SAFI-018	Faroe Eilanden	Saccharina latissima	M	1
SAFI-019	Faroe Eilanden	Saccharina latissima	M	2
SANL-010	Nederland	Saccharina latissima	M	2
SANL-011	Nederland	Saccharina latissima	V	3
SANL-015	Nederland	Saccharina latissima	M	2
SANL-022	Nederland	Saccharina latissima	V	5
SANL-025	Nederland	Saccharina latissima	V	4
SANL-027	Nederland	Saccharina latissima	V	4
SANL-037	Nederland	Saccharina latissima	V	2
SANL-039	Nederland	Saccharina latissima	M	2,5
ALNO-001	Noorwegen	Alaria esculenta	V	20
ALNO-004	Noorwegen	Alaria esculenta	M	5
ALNO-005	Noorwegen	Alaria esculenta	V	1
ALNO-006	Noorwegen	Alaria esculenta	M	3
SANO-001	Noorwegen	Saccharina latissima	M	27
SANO-002	Noorwegen	Saccharina latissima	V	2
SANO-004	Noorwegen	Saccharina latissima	M+V	4
SANO-006	Noorwegen	Saccharina latissima	M	7
SANO-010	Noorwegen	Saccharina latissima	M	5,5
SANO-012	Noorwegen	Saccharina latissima	V	220
SANO-013	Noorwegen	Saccharina latissima	V	5
SANO-022	Noorwegen	Saccharina latissima	M	3
SANO-024	Noorwegen	Saccharina latissima	V	18
SANO-040	Noorwegen	Saccharina latissima	V	8

4. Moleculaire karakterisering van het materiaal (soort en populatiestructuur)

In het kader van het project is in nauwe samenwerking tussen Hortimare en het NIOZ een populatie genetica studie gedaan naar suikerwier (*Saccharina latissima*). Hier was eerst voorzien dat een tweede soort (vingerwier, *Laminaria digitata*) ook werd meegenomen in deze studie. Hiervoor zijn ook monsters genomen, maar het bleek lastig om voor sommige locaties het juiste aantal monsters te ontvangen. Om hiervoor te compenseren zijn er niet 5 maar 7 populaties van *Saccharina latissima* onderzocht, en bestaan uit populaties uit:

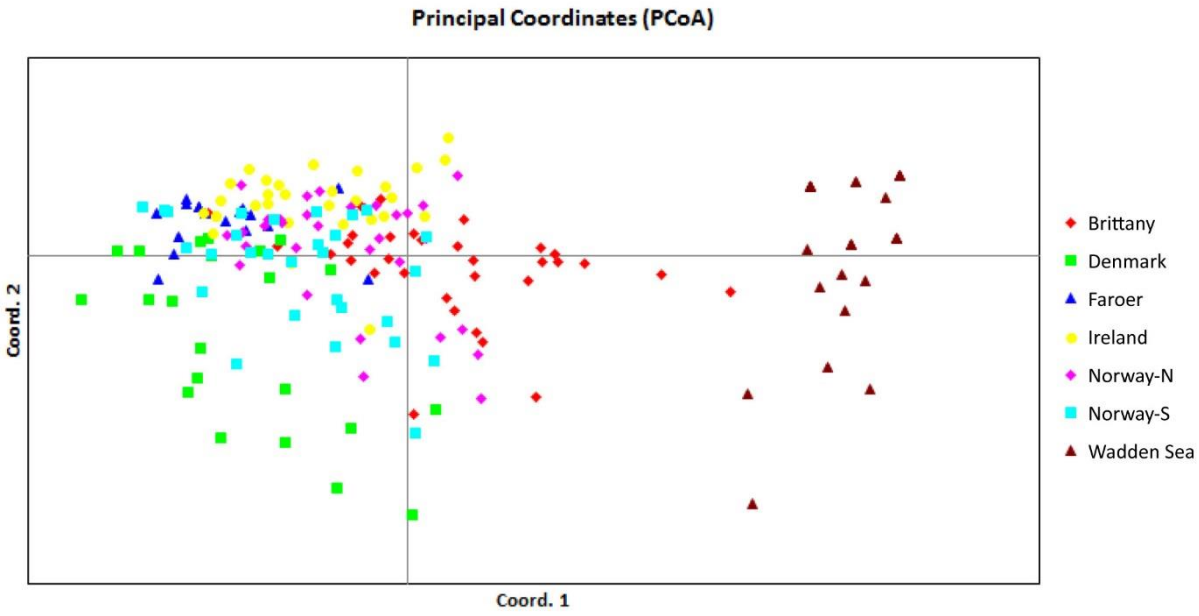
1. Bretagne, Frankrijk
2. Aarhus, Denemarken
3. Funningsfjørdur, Faroe Eilanden
4. Cleggan Bay, Ierland
5. Bodø, Noord Noorwegen
6. Solund, Zuid Noorwegen
7. Texel, Nederland

Deze monsters komen overeen met de locaties te zien in *Fig.28*. De extra populaties (Noord Noorwegen en Faeröer Eilanden die gekozen zijn voor genetische populatie analyse zijn van commercieel belang, aangezien Hortimare in deze plekken verschillende klanten heeft gekregen gedurende de duur van het project Zeewier Hatchery.

De genetische diversiteit is bepaald aan de hand van microsatellieten. De SSR merkers voor de analyse zijn ontworpen vanuit een vorig gepubliceerd EST bibliotheek (Heinrich et al., 2012, Plos One, Vol. 7: e44342). In totaal zijn er 42 merkers ontwikkelt, maar daarvan zijn er 10 gebruikt die consistent goed signaal gaven tijdens analyse om de in totaal 192 individuele sporofyten van *Saccharina latissima* te analyseren. De statistische analyse laat zien dat er een significant en hoog level van populatie subdivisie is tussen de zeven geteste locaties (Fst = 0.268, P<0.001). Met behulp van een Principal Coordinates Analysis (PCoA) is de populatie structuur van de locaties in kaart gebracht (*Fig.28*). Er is duidelijk uit op te maken dat de populatie in de Waddenzee het meest verschilt van de andere locaties.

Daarnaast is er een poging gedaan om het volledige genoom te sequencen van *Saccharina latissima*, met *Saccharina japonica* als referentie genoom. *S. japonica* is nauw verwant aan *S. latissima*. Echter blijkt uit analyse dat door gebruik van kloon gametofyt cultures voor dit onderzoek, dat er te weinig *Saccharina* DNA aanwezig was om het genoom compleet te maken. Maar 1.23 tot 10,92% van het DNA kon geïdentificeerd worden als *Saccharina*, de rest was bacterieel DNA. In totaal werd er minder dan 1% van het *S. japonica* genoom gevonden in de verzamelde data afkomstig van *S. latissima* gametofyt kloon cultures. Dit betekent dat er een te hoge bacteriële infectie aanwezig was om effectief het genoom te sequencen.

De conclusies die uit deze populatie studie genomen kunnen worden zijn dat er op het moment geen genen uitwisseling plaats vind tussen elke van de bemonsterde locaties voor *S. latissima*, te zien aan de sterke populatie differentiatie. Met andere woorden, van populatie connectiviteit is op het moment geen sprake. Dit betekent dat er grote implicaties zijn voor het gebruik van deze kelp soort als natuurlijke grondstof en als aquaculture organisme, om uitwisseling van genen tussen populaties door antropogene invloeden tegen te geen. Voor een uitgebreide uitleg van gevonden resultaten zie bijlage K.



figuur 28; Principal Coordinates Analysis van de 7 populaties Saccharina latissima.

Dit betekent dat de huidige werkmethode van Hortimare de juiste aanpak is om te voorkomen dat er ongewenste genen uitwisseling plaats gaat vinden. Deze werkmethode staat omschreven in hoofdstuk 3.1., in het kort houdt deze in dat er alleen lokaal materiaal gebruikt wordt voor het produceren van zeewier rassen. Bovendien duiden de resultaten erop dat er een grote diversiteit aan genetisch materiaal aanwezig is binnen Europa voor suikerwier. Voor veredeling doeleinden is dit goed nieuws, aangezien dit betekent dat er veel gen combinaties te maken zijn die potentieel zeer goede zeewier rassen voorbrengen.

Naast de DNA monsters die genomen zijn voor de populatie studie zijn er de afgelopen 3 jaar ook monsters genomen van wild type zeewier cultivatie lijnen, F1 hybride lijnen, en overige interessant uitziende sporofyten van verschillende locaties. Van zowel de monsters uit de populatie studie als van de andere onderzoeken is de morfologie van het zeewier deels bepaald. Deze morfologie determinatie wordt verder uitgelegd in hoofdstuk 2.2, met daarin ook een aantal concrete voorbeelden hiervan. Helaas bleek deze morfologie informatie in combinatie met de genetica studie niet genoeg om daadwerkelijk merker-fenotype associaties te vinden voor merker-geassisteerd veredelen. Echter is er wel door desondanks cruciale werk een beter inzicht verkregen in welke veredelingsstrategie daadwerkelijk zal gaan werken en welke strategie Hortimare zal gaan volgen in de toekomst. De ontwikkeling, toetsing en toekomstig gebruik van de veredelingsstrategie wordt verder uitgelegd in hoofdstuk 7.

5. Start van selectie, kruisingswerk en analyse van hybrids teneinde de methode en effectiviteit te beoordelen.

5.1. Toepassen van massaselectie op de 5 wildpopulaties op de gedefinieerde kenmerken in een open zee teelt

Voor het produceren van zeewier cultivatie lijnen wordt op het moment vooral massaselectie gebruikt. Hierbij worden consequent de sporofyten geselecteerd die de juiste eigenschappen bezitten zoals verhoogde groeikracht, juiste grootte en verhoogde fertiliteit. Voor een complete lijst met eigenschappen waarnaar gekeken wordt bij het selecteren van deze sporofyten zie hoofdstuk 2.2. Deze selectie voor de soort *Saccharina latissima* vindt op het moment plaats in Zuid Noorwegen, Faeröer Eilanden, Denemarken en Nederland. Voor *Alaria esculenta* gebeurt dit alleen Noorwegen en de Faeröer Eilanden, omdat deze soort niet van nature voorkomt in Nederland en Denemarken. Zowel vanuit het wild als op cultivatie lijnen van voorgaande groei seizoenen worden de sporofyten geselecteerd met de juiste eigenschappen waarna deze getransporteerd worden naar Nederland (*Fig.29*).



figuur 29; Massa selectie van sporofyten verzameld uit het wild. Op de foto's zijn Saccharina latissima (suikerwier) te zien uit Solund, Noorwegen. Deze sporofyten laten reuze groei zien, waarbij lengtes van tot wel 4 meter behaald wordt.

Deze massaselectie methode heeft ertoe geleid dat er momenteel een groot aantal sporofyten beschikbaar is in het zeewiercentrum op Texel, voor veredeling van verschillende soorten zeewier voor verschillende locaties. Deze locaties komen overeen met de Europese kaart die te zien is in hoofdstuk 3.1. De eigenschappen van de zeewieren waarop wordt geselecteerd tijdens de massaselectie zijn over het algemeen visueel van aard. Deze eigenschappen zijn als volgt:

- Frond lengte en breedte
- Stengel lengte
- Dikte van het frond
- Aanwezigheid van verschillende morfologische kenmerken en verhouding hiervan.
- Fertiliteit

Voor een uitgebreide lijst zie hoofdstuk 2.2. Naast deze kenmerken worden er DNA monsters genomen van alle planten, welke gebruikt kunnen worden voor toekomstig populatie genetica studies of merker-geassisteerd selecteren.

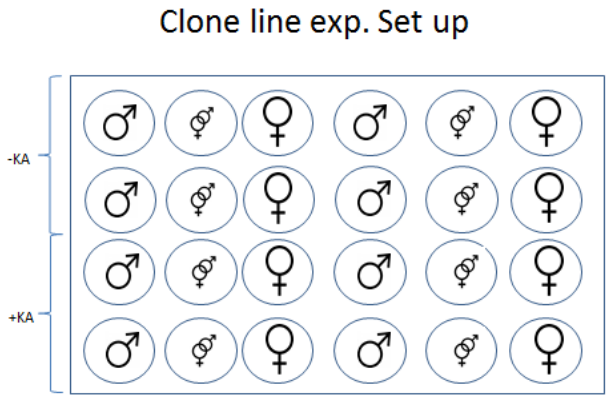
5.2. Maken van kruisingen tussen en binnen genenpools gebruikmakend van basis gametofytenklonen uit 3.2 en 3.3

Na het succesvol laten uitgroeien en opslaan van de verschillende Kloonlijnen *Saccharina latissima, Laminaria digitata, en Alaria esculenta,* zijn ook F1- hybride sporofyten gecreëerd. Het maken van deze kruisingen is in 3 fases gebeurt waarbij ervaring is opgedaan in het succesvol induceren en het laten uitgroeien van deze F1 hybrides. De 3 fases bestaan uit een verkennende fase waarin de aller eerste kruisingen zijn gemaakt. De daaropvolgende fase was de experimentele fase waarin de eerste aanpassingen zijn toegepast voor het succesvol uitlaten groeien van F1 hybrides. De laatste fase was de productie fase waarin zowel in Nederland als in Noorwegen op grote schaal succesvol kruisingen zijn uitgehangen.

Belangrijke leerpunten binnen deze 3 fases waren de gebruikte substraten, bioreactor, en in-situ groei tijd van de F1 hybrides. Bovengenoemde punten zijn essentieel wanneer het gaat over het zo gezond mogelijk uit laten groeien van genetische identieke F1-hybrides. Doordat ze genetisch identiek zijn gedragen ze zich namelijk hetzelfde en zijn daardoor ook extra vatbaar voor potentiele infecties. Verder was het belangrijk om een ideale bioreactor te ontwerpen die op grotere schaal kruisbesmetting en infectie wist te voorkomen.

Inductie van de kloonlijnen

Inductie van de kloonlijnen is steeds in een vergelijkbare manier gebeurt. De cultures zijn primair geplaatst in tube reactoren bij blauw licht. Tevens zijn er extra titerplaten gemaakt dat onder vergelijkbare omstandigheden is geplaatst *(Fig.30).* De titerplaat is gemaakt zodat makkelijk gekeken kon worden of inductie mogelijk was en dat initiële sekse bepaling correct is geweest.



figuur 30; ;Schematische representatie van een gebruikte titerplaat. Hierbij zijn mannelijke en vrouwelijke gametofyten zowel bij elkaar als gescheiden geïnduceerd. Hierbij wordt extra duidelijk in hoeverre de gametofyt geïnduceerd kan worden en hoe die reageert op de aanwezigheid van de andere sekse.

Verkennende fase kloonlijn kruisingen

Onderstaand tabel laten de kloonlijnen zien die gebruikt zijn voor de eerste kruisingen binnen het Hatchery project. Hierbij is duidelijk gekenmerkt welke kloonlijnen man of vrouw zijn (bijlage F). Verder is het heel belangrijk dat de locatie van kloonlijnen bekend is. Alle kruisingen waren in situ uitgevoerd waardoor interregionale kruisingen mogelijk waren.

Tabel 4; Overzicht van kloonlijn kruisingen die geïnduceerd zijn (05-08-2014)

		Well column 1	**Well column 2**	**Well column 3**	**Well column 4**	**Well column 5**	
Wellplate arrangement	**Well number**	**Male**		**Female**		**male**	
Sacharina * Sacharina	1	IR – 010 (m)	⚥	SANO-013 (V) (sw) – 1*	⚥	IR – 009(m)	
	2	IR – 010 (m)	⚥	NL – 015 (v)	⚥	IR – 009 (m)	
	3	NO - 005 (m)	⚥	NL – 015 (v)	⚥	SANO -006 (m)	
	4	NL – 013 (m)	⚥	SANO-012 (v) (sw)	⚥	SANL -014 (m)	
	5	NO- 005 (m) (Rood)	⚥	NO -002 (v) (Rood)	⚥	NO- 005 (2)(m) (Rood)	
	6	NO- 005(m)	⚥	NO -002 (v)	⚥	NO- 005 (2) (m)	
	7	SANL -014 (m) – (Rood)	⚥	NL – 015 (v) (Rood)	⚥	SANL -014 (b) (m) (rood)	
	8	SANL -014 (m)	⚥	NL – 015 (v)	⚥	SANL -014 (b)	
Laminaria * Laminaria / Sacharina * Laminaria	9	NO LDNO – 005 (m)	⚥	NO LDNO – 001 (v)	⚥	SANO - 005 (m)	
Sacharina	10	SANO-004	⚥	SANO-004			
Sacharina	11	SANO-005		SANO-002		SANO-006	

De kruisingen zijn na inductie geplaatst op linten en in open bakjes geplaatst om uit te groeien.



figuur 31; De F1-hybrides die geplaatst zijn op linten (links, midden) en de open bakjes waarin de linten geplaatst zijn (rechts).

De verkennende fase was een succes met wat kanttekeningen. Het succes is gebaseerd op de aantallen kruisingen die gemaakt zijn binnen zowel *Saccharina latissima en Laminaria digitata*. Tevens is het gelukt deze geïnduceerde cultures te laten hechten op linten waaruit ze verder ontwikkelde.

De leermomenten waren de vele bakjes waarin de kruisingen lagen. Dit was niet handzaam en de kleine hoeveelheid water was gevoelig voor verdamping waardoor erg hoge saliniteiten zijn waargenomen. Uiteindelijk moesten we de kruisingen weggooien door de vele infecties die heersten op de cultures. Verder onderzoek is dan ook niet gedaan op deze sporofyten.

De experimentele fase van de kloonlijn kruisingen

Sinds het duidelijk was geworden dat kruisingen maken tussen kloonlijnen over het algemeen probleemloos verliep, is er meer aandacht gekomen op het goed laten uitgroeien van de F1 hybrides. Dit betekende dat in deze fase er meer nadruk kwam op het verloop van inductie en uitgroei en minder nadruk op de hoeveelheid kruisingen (bijlage G). Als resultaat zijn er in deze fase minder kruisingen gemaakt, maar de hoeveelheid biomassa waarmee gekruist is, is juist aanzienlijk toegenomen.

Om het hele proces handzamer te maken is gekozen voor één grote bak waarin de kloonlijn kruisingen konden gaan uitgroeien (*Fig.32).* Dit had meerdere voordelen sinds hierdoor minder snel problemen kwamen door verdamping en ook dat bij infectie de bak relatief snel schoon kon worden gemaakt. Verder is gekozen om erfelijkheid beter te onderzoeken. Daardoor is steeds gekozen voor hetzelfde vrouwtje (apart van de inteeltlijn SANO-004). In totaal zijn maar 6 kruisingen gemaakt *(Tabel 5)* waarbij de gebruikte biomassa per kruising echter soms wel 100 keer meer was dan in de verkennende fase.

Tabel 5; Overzicht van kloonlijn kruisingen (15-01-2015)

Mannelijke kloonlijn	Vrouwelijke kloonlijn
SAIR-009	SANO-012
SAIR-010	SANO-012
SANO-001	SANO-012
SANL-014	SANO-012
SANO-004	SANO-004
SANL-013	SANO-012



figuur 32; De 6 kruisingen die geplaatst zijn in een grote bak onder de verlichting van TL-lichten. In 3 maanden is dit uitgegroeid van kleine sporofyten (links) tot aanzienlijke grotere sporofyten (midden, rechts).

De resultaten waren bemoedigend sinds de sporofyten aanzienlijk groter waren gegroeid dan de kruisingen. Er was gaandeweg wel een micro alg infectie in de bak die zoals verwacht gemakkelijk in toom gehouden kon worden door de bak regelmatig schoon te maken. Na 3 maanden zijn de sporofyten morfologisch geanalyseerd waarbij de resultaten te zien zijn in bijlage C.

Wel waren er tevens in de experimentele fase wat kanttekeningen. Ten eerste was er een grote kans op kruisbesmetting doordat de kruisingen in dezelfde compartiment geplaatst waren. Ook was de groen alg verre van ideaal om te hebben en moet er uiteindelijk een manier worden gevonden waarbij de kans op infecties geminimaliseerd wordt.

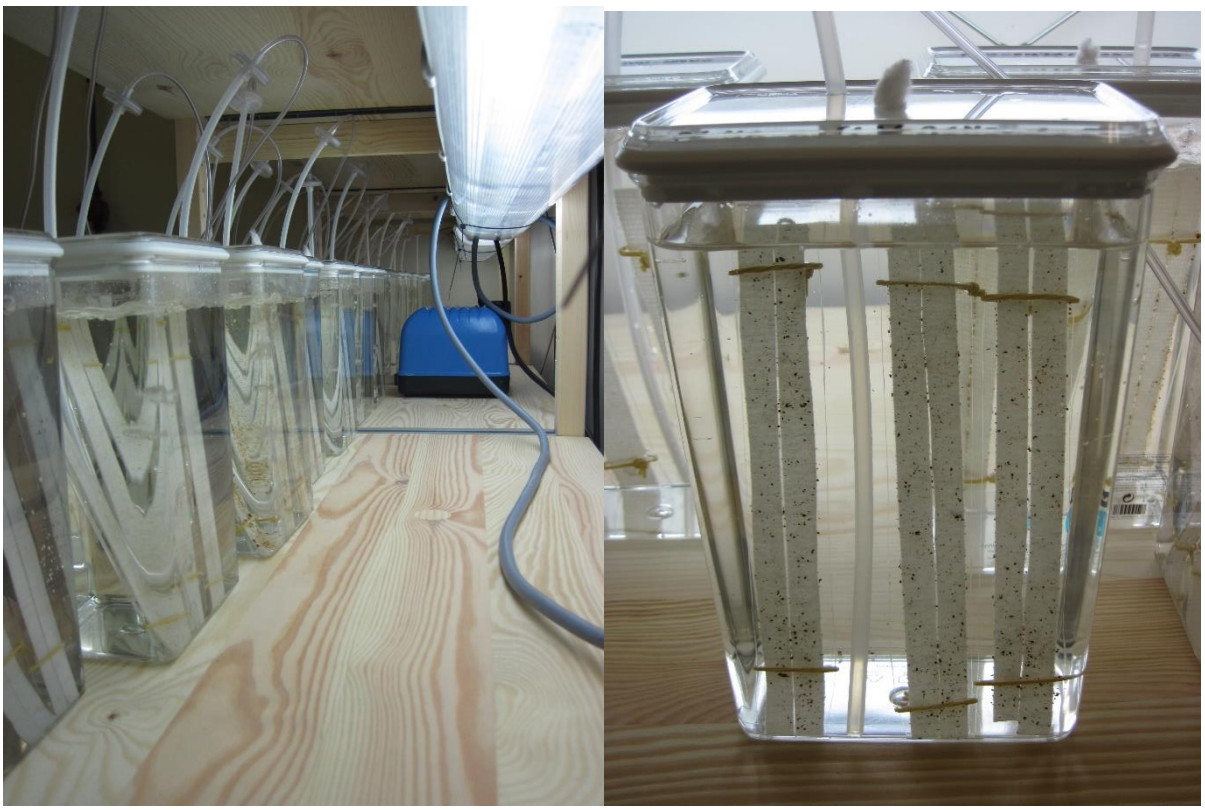
De productie fase van de kloonlijn kruisingen (Bijlage D, E, H, I)

Dit is de laatste fase binnen het Hatchery project waarbij 22 Noorse kloonlijn kruisingen (*Saccharina latissima en Alaria esculenta*) zowel in situ op Texel als ook in vivo in Noorwegen uit worden gegroeid. De leermomenten van bovenstaande 2 fases zijn geïncorporeerd in de methode die gebruikt is in deze eind fase.

De inductie van de kloonlijnen is gebeurt zoals in voorgaande fases in tube reactoren (bijlage I) en in titerplaten. Hierbij zijn de titerplaten zoals in voorgaande fases vooral gebruikt voor sekse bepaling en inductie succes. Na inductie is een deel van de culture naar Noorwegen getransporteerd en een deel is in situ uit gegroeid op linten.

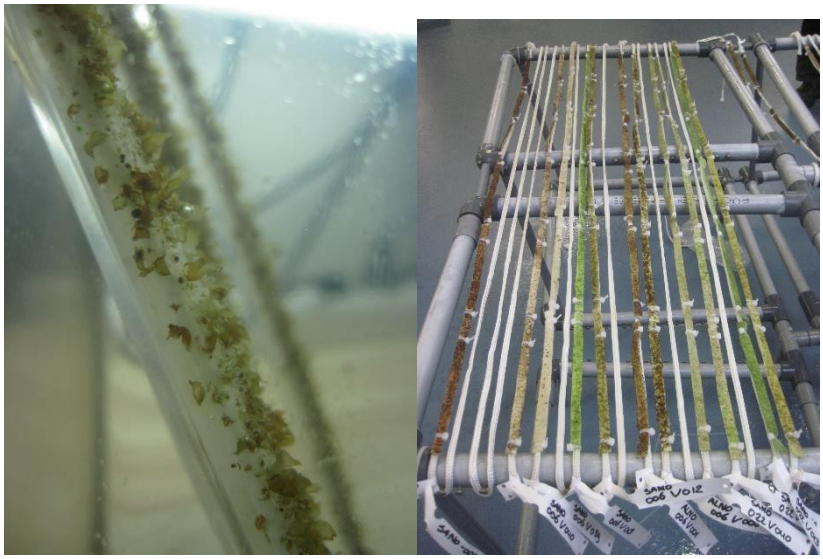
De geïnduceerde biomassa (bijlage H) uit de tubes op Texel is gesmeerd op linten (bijlage D) en in bioreactoren geplaatst zoals te zien in *Fig.33.* De nieuwe reactor zorgt voor een goede aanhechting van de F1 hybride op het substraat, voorkomt kruisbesmetting, en zorgt voor een schone omgeving waar infecties moeilijk in terecht komen.

Europees visserijfonds: Perspectief voor een duurzame visserij
Dit project is geselecteerd in het kader van het Nederlands Operationeel Programma 'Perspectief voor een duurzame visserij' dat wordt medegefinancierd uit het EVF.



figuur 33; De speciaal aangepast bioreactoren voor een optimale uitgroei van kloonlijn kruisingen.

Na een maand waren de sporofyten aanzienlijk gegroeid *(Fig.34)* en klaar om naar de buitenbakken te worden verplaatst (zie hoofdstuk 1.3). De linten ware vast gezet aan touwtjes en horizontaal opgehangen (*Fig.34*) aan een rek voor een optimale licht vangst. In sommige bioreactoren was een groen alg infectie aanwezig die niet schadelijk was voor de groei van de sporofyten. Dit is te zien aan de groene linten in *Fig.34.*

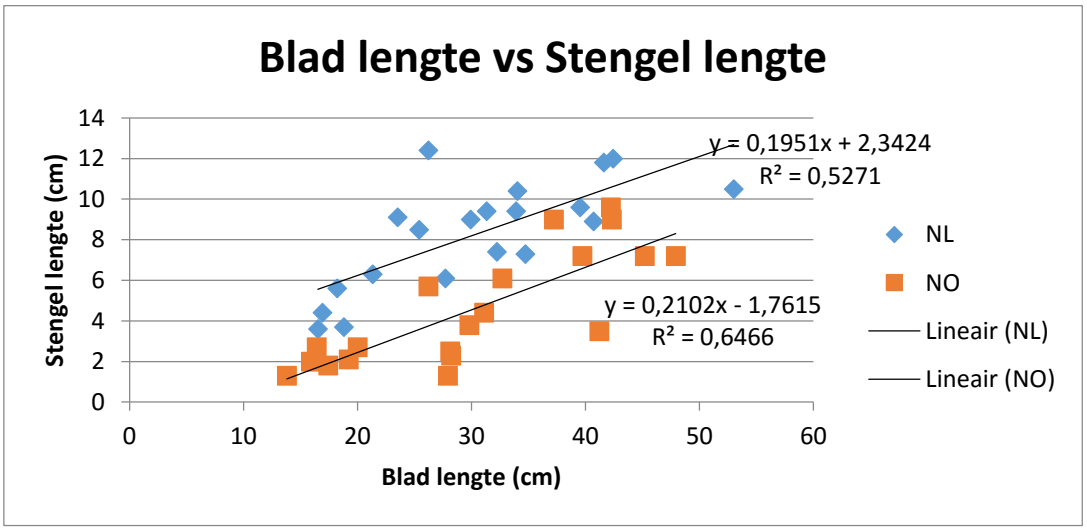


figuur 34; De kloonlijn kruisingen zijn na 1 maand groei in de special bioreactoren (links) horizontaal geplaatst op een PP frame (rechts). Dit frame is dan weer geplaatst in een van de buitenbakken van het zeewier centrum.

De rest van de geïnduceerde culture is zoals eerder vermeld naar Noorwegen getransporteerd. Dit transport en de in vivo plaatsing van de kloonlijnen is met succes verlopen. Verdere uitleg over de plaatsing van kloonlijnen in ons zeewierveld wordt in hoofdstuk 5.3 uitgelegd.

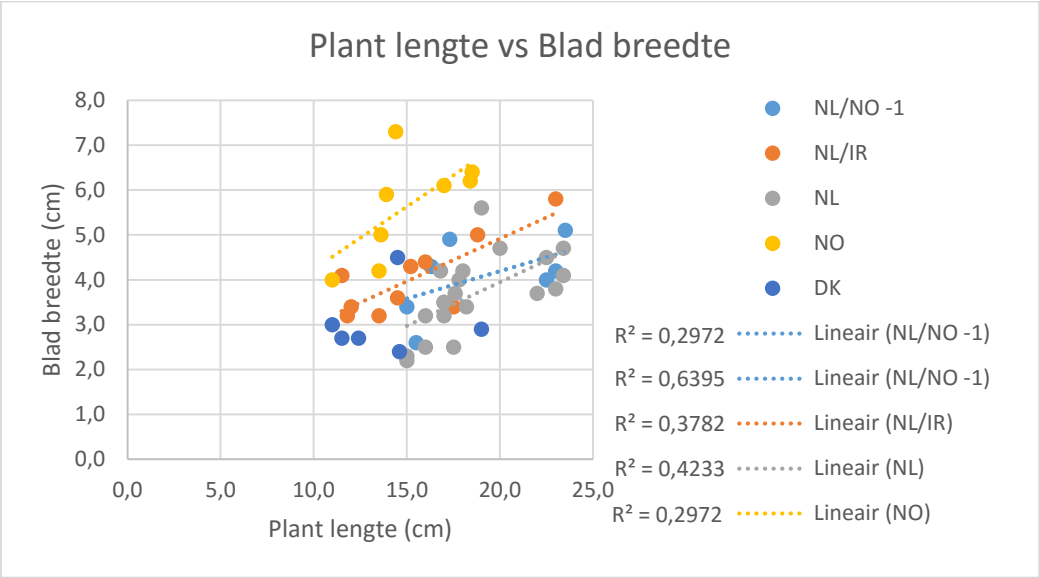
5.3. Testen van de kruisingsproducten in tanks en op open zee.

Elke kruising die succesvol induceert wordt getest in zowel tanks als open zee. De tank tests gebeuren in de faciliteiten op Texel, waarbij deze kruisingen gezaaid worden op een drager welke vervolgens opgehangen wordt in de tanks. Een duidelijk voorbeeld hiervan is te zien in hoofdstuk 2.3. Elk van deze kruisingen wordt vervolgens volledig doorgemeten aan het einde van het groei seizoen. Zo is er in het eerste jaar al duidelijk geworden via experimenten in de tank dat wanneer een Noorse kruising en Nederlandse kruising in exact dezelfde omstandigheden opgegroeid worden er significante verschillen zijn in morfologie van de sporofyten tussen deze 2 locaties. Zo zijn Noorse sporofyten over het algemeen breder naar verhouding van de lengte dan Nederlandse sporofyten. Daarnaast laten Noorse sporofyten ook een kortere stengel zien dan Nederlandse sporofyten (*Fig.35*).



figuur 35; Blad lengte vs stengel lengte in Nederlandse en Noorse kruising. Er is duidelijk een verhouding aanwezig tussen blad lengte en stengel lengte (gezien hoge R2), waarbij Noorse sporofyten over het algemeen een kortere stengel hebben naar verhouding tot d

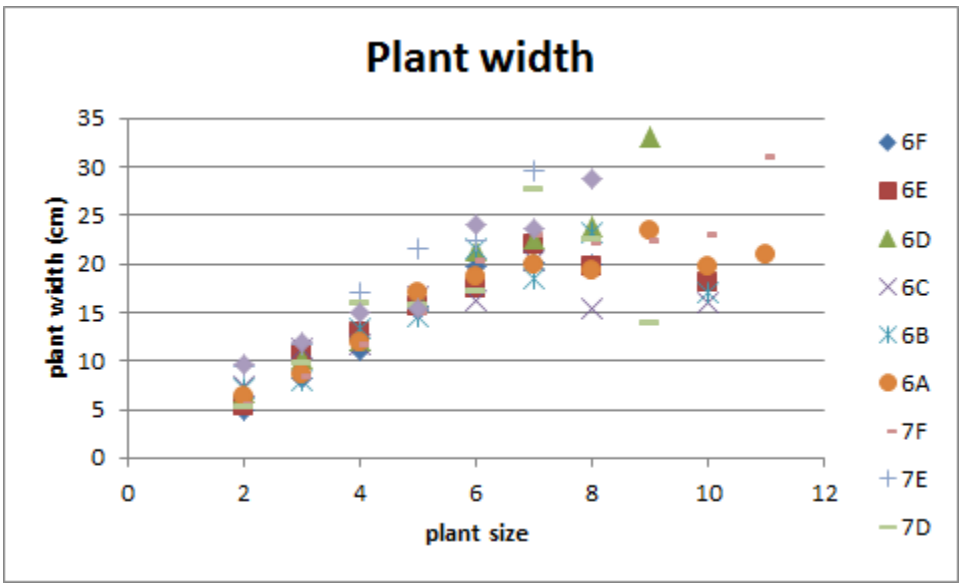
Dit was een sterke eerste aanwijzing voor ons om te zeggen dat veredeling van zeewieren wel degelijk een mogelijkheid is, aangezien niet alleen abiotische factoren van invloed zijn op de uitgroei, maar ook de genetica. Sindsdien zijn vele kruisingen getest in de tanks, onder andere in samenwerking met Naktuinbouw. Zij hebben in het groeiseizoen van 2013-2014 samen met Hortimare een test gedaan om de eerste stappen te zetten richting ervaring opdoen met het kweken met zeewier, zodat zij in de toekomst onafhankelijk onderzoek kunnen doen naar het valideren van rassen die Hortimare uiteindelijk op de markt wil brengen. In dit onderzoek werden in totaal 7 kruisingen met elkaar vergeleken, waaronder ook kruisingen tussen 2 verschillende locaties. Een van de interessantste resultaten die gevonden werd was dat een kruisingen van 2 locaties niet in het midden kwam te liggen qua morfologie, maar juist op 1 van de 2 gebruikte locaties bleef lijken (*Fig.36*). Dit duidt erop dat er sprake is van dominante genen wanneer kruisingen gemaakt worden, iets wat voorheen nog niet eerder duidelijk aangetoond was maar zeker relevant is voor de veredeling van zeewier.



figuur 36; Plant lengte vs blad breedte in 5 verschillende kruisingen. Opvallend is dat de NL/NO kruising qua morfologie sterk lijkt op de puur NL kruising (te zien aan de nabijheid van de 2 trendlijnen voor deze kruisingen). De verwachting was dat deze NL/NO kr

Naast de vele kruisingen die getest zijn in tanks worden er ook kruisingen getest in zee. Dit gebeurt alleen met kruisingen van de specifieke test locatie om verspreiding van genotypes tegen te gaan die niet van nature op die locatie voorkomen. Zo zijn er afgelopen jaar verscheidene Nederlandse kruisingen getest in de Oosterschelde te Zeeland en liggen er momenteel 22 aantal kruisingen, gemaakt vanuit gametofyt kloonlijnen, te water in Solund, Noorwegen (zie hoofdstuk 2.3). Ondanks dat het project Zeewier Hatchery ten einde is gekomen, gaat Hortimare door met dit veelbelovende werk. De resultaten van de testen in zee laten ten eerste zien dat de groei vele malen beter is in zee dan in de cultivatie tanks. Daarnaast wordt er veel ervaring op gedaan met het daadwerkelijk telen van zeewier op open zee. Zo is er onder andere vast gesteld dat er een concurrentie effect optreedt naarmate de planten groter worden (*Fig.37*). Doorgaans neemt de sporofyt blad breedte gelijk toe met de lengte van het blad, tot op een bepaald punt. De gedachte is dat vanaf dit punt de concurrentie druk toe neemt aangezien de planten dicht op elkaar staan, en zij daardoor geen energie meer zullen steken in breedte groei. Dit soort bevindingen is van grote invloed op de veredeling strategie die Hortimare zal gaan volgen in de toekomst. Aangezien sommige kenmerken dus gerelateerd zijn aan concurrentie druk en abiotische omstandigheden betekent dit dat hiermee goed rekening gehouden moet worden tijdens het testen van de verschillende kruisingen, waarbij rekening gehouden moet worden met de omgeving maar ook met de zaaidichtheid. In de eerder genoemde Noorse kruisingen die momenteel opgroeien in Noorwegen is dit seizoen alles in 2 zaaidichtheden gezaaid om precies te kunnen vaststellen hoe groot deze concurrentie druk nou is.

Verder geeft het ons belangrijke informatie over op welke manier zeewier in de toekomst geteeld moet gaan worden, en hoe wij onze rassen daarop moeten aanpassen. Denk hierbij aan of er als een korenveld gezaaid wordt (continu en overal zeewier), of dat er juist voor de maisveld indeling gekozen wordt (vast rijen met elke paar centimeter een sporofyt).



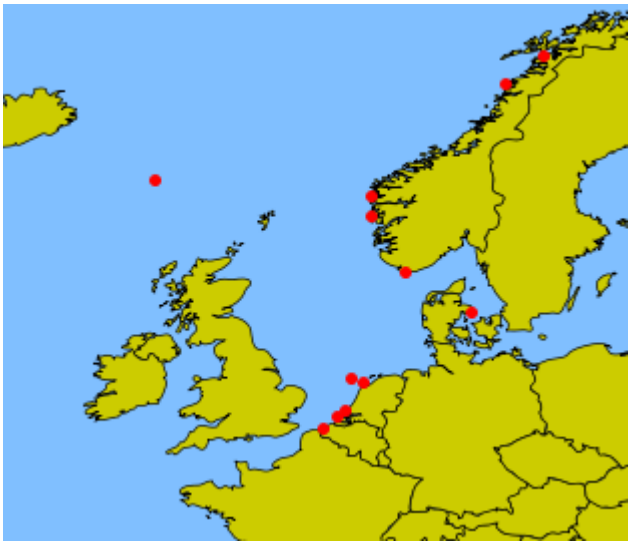
figuur 37; Sporofyt breedte ten opzichte van sporofyt lengte. Er is een plateau effect aanwezig, waarbij sporofyten niet meer breder worden nadat deze een bepaalde lengte hebben bereikt. Dit duidt op een concurrentie effect waarbij zeewier niet breder meer wordt

De resulterende sporofyten van de kruisingen die de afgelopen jaren uitgegroeid zijn in zowel tanks als in open zee zijn verzameld om vervolgens in stand gehouden te worden totdat deze de leeftijd en lengte bereiken waarop zij sorus gaan vormen. Echter wil dit een succes zijn dan moeten er goede installaties zijn voor het over zomeren van deze sporofyten. Gedurende de eerste 2 zomers van het project Zeewier Hatchery bleken de faciliteiten die aanwezig waren niet goed genoeg hiervoor. Gedurende de zomer verliezen de soorten zeewier die onderzocht worden binnen dit project namelijk sneller hun blad dan dat dit bij kan groeien. Dit heeft te maken met temperatuur, licht inval en aanwezigheid van nutriënten, welke gedurende de zomer niet optimaal zijn voor sporofyten. Daarnaast vindt er een wildgroei van herbivoren plaats in de zomer, die het behouden van sporofyten nog meer bemoeilijken. Deze herbivoren kunnen binnen een tijdsbestek van een halve week een complete tank leegvreten, waarbij alle aanwezige sporofyten verloren gaan. Met de bouw van het zeewiercentrum kregen we eindelijk meer controle over deze factoren. Daardoor zijn we pas in staat geweest dit jaar (2014-2015) de sporofyten te behouden voor verdere veredeling. Als voorbeeld, er zijn momenteel sporofyten vanuit Frankrijk, Faeröer eilanden en Nederland aanwezig in onze tanks die waren geselecteerd uit de groeilijnen die in situ gegroeid waren over het seizoen 2014-2015. Deze sporofyten hebben in de maand juni/juli sorus gevormd, en daaruit zijn nu cultures opgezet. Deze cultures zullen komend voorjaar uitgezaaid worden in de desbetreffende locatie van origine. Dit betekent dat er een tweede generatie opgezet is van materiaal wat via massaselectie is geselecteerd uit een wilde populatie. Hiermee hopen wij nu aan te kunnen tonen dat massaselectie een snelle, eenvoudige methode is voor de veredeling van zeewier, waarbij krop uniformiteit en groei verhoogd worden.

Naast het project Zeewier Hatchery worden de kruisingen die geproduceerd worden gebruikt voor een zeer groot scala andere projecten en klanten. Deze projecten vinden plaats op nationaal en internationaal niveau en onze klanten bevinden zich ondertussen in geheel Noordelijk Europa. Zie tabel 6 voor een selectie van projecten. Zie *Fig. 38* voor een klanten overzicht in Europa.

Tabel 6; Project overzicht waarbij kruisingen geproduceerd in kader van Zeewier hatchery zijn gebruikt.

Project	**Locatie**	**Doeleinde**
AT~SEA (FP7)	Noorwegen, Ierland en Schotland	Ontwerp en testen van zeewier cultivatie systemen
Stichting Noordzeeboerderij	Nederland	Ontwikkeling van off-shore zeewier cultivatie systemen
Macrovalue	Faroe eilanden, Noorwegen en Ijsland	Veredeling van Faroe zeewier
Integrert Akvakultur	Noorwegen	Ontwikkeling van IMTA
MEZ2 (SBIR)	Noorwegen en Nederland	Raffinage van zeewier
Searefinery (ERA-MBT)	Denemarken, Nederland en Noorwegen	Raffinage van zeewier
Zeevivo	Nederland	Zeewier als visvoer
ECsafeSEAFOOD (FP7)	Portugal, Spanje, Italië, Nederland, België, Ierland, Tsjechië, Noorwegen, Denemarken	Voedselveiligheid van o.a. zeewier



Figuur 38; Overzicht van klanten locaties van Hortimare, aangegeven via rode stip.

6. Analyse van het kruisingswerk en toetsing daarvan aan de oorspronkelijke doelen en veredelingsstrategie.

6.1. Bepaling van het effect van selectie en milieu tussen kruisingen en de populatie waaruit deze sporofyten zijn geselecteerd.

De morfologie van Sporofyten is voor een deel genetisch bepaald, maar de individuen kunnen zich ook aanpassen aan veranderende omgevingsfactoren. Er zijn enkele verkennende resultaten verzameld die als doel hebben meer inzicht te geven in de invloed van genetische dan wel omgevingsfactoren op de fenotypische uiting van de sporofyt.

Invloed van de omgeving op de morfologie

Veel zeewier individuen zijn verzameld in Noordwest Europa en getransporteerd naar het zeewier centrum op Texel. Heir groeien de individuen verder onder gecontroleerde omstandigheden die aanzienlijk anders zijn dan de omgevingsfactoren in het wild. Veelal is de omgeving op Texel een stuk rustiger, zweven de sporofyten vrij in het zeewater, en is er aanzienlijk meer zonlicht.

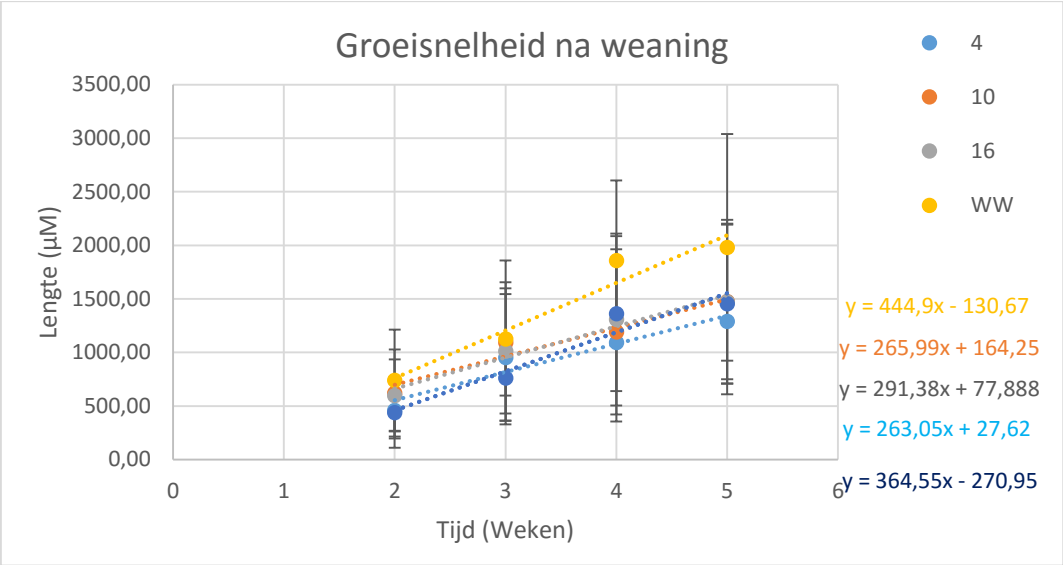
Grote morfologische veranderingen zijn dan ook te zien in de aangroei van nieuw bladtissue. Een duidelijke aanpassing die zeewier bij rustigere omstandigheden doet is de frond platter te maken maken. Dit is goed te zien in *Fig.39* waarbij goed te zien is wanneer de individuen geplaatst zijn in het zeewiercentrum.



figuur 39; Nederlandse individuen nadat ze een tijd hebben kunnen groeien in het zeewier centrum. Duidelijk is te zien wanneer ze uit het wild zijn gehaald aan de hand van de morfologie. Het gladde gedeelte is de gegroeide biomassa uit het zeewiercentrum.

Daarnaast is er ook onderzoek gedaan op lab schaal naar de invloeden van temperatuur op de uitgroei van sporofyten, waartoe ook behoord het "weaning" van sporofyten om deze voor te bereiden op ruige zee condities wanneer deze zijn opgegroeid in kalme lab condities (bijlage J). Alhoewel hier geen significante resultaten zijn behaald met dit onderzoek zijn er wel duidelijke trends zichtbaar die suggereren dat een lage temperatuur de groei van sporofyten negatief beïnvloed. Een hoge temperatuur lijkt juist voor een toenemende groei te zorgen, zie *fig. 40*. Wanneer de sporofyten voorbereid worden op deze hogere of lagere temperatuur door middel van "weaning" is er de trend aanwezig dat deze sporofyten nog beter groeien.

Hoewel de schokmethodes dus een potentieel positief effect hebben op totale groei, lijkt het niet bevorderlijk voor wat doorgaans als een gezond morfologisch profiel wordt beschouwd. Dit uit zich in rafelige randen en onregelmatige groeispurten. De 16^0C en 10^0C behandelingen daarentegen lijken zich normaal te ontwikkelen. De 4^0C behandeling toont vaker een dun en lang profiel. In alle gevallen trad er soms verbleking op, mogelijk door nutrient-tekort en/of lichtschade.



figuur 40; Effect van temperatuur op sporofyt lengte na het weaning proces. 4 = 4°C, 10 = 10°C, 16 = 16°C, WW= gradueel van 10°C naar 16°C. Het gradueel laten wennen aan een hogere temperatuur lijkt sporofyt groei positief te beïnvloeden, vergeleken met een schok van direct bij 16°C zetten. Een lagere temperatuur leidt niet direct tot verminderde groei.

Invloed van de genetica op de morfologie

Ook zijn er eerste verkennende studies gedaan op de invloed van genetica op de morfologie. Dat er grote morfologische verschillen zijn tussen regio's is duidelijk. Dat dit hoogstwaarschijnlijk voor een groot gedeelte genetisch bepaald wordt is te voorspellen. Om dit echter objectief te vergelijken moeten de sporofyten uit de verschillende regio's onder vergelijkbare omstandigheden opgroeien. Eerste visuele verschillen betreffende deze morfologische eigenschappen is besproken in hoofdstuk 3.1. Er zijn echter voorzichtig ook statistische analyses gedaan op de bulk van deze Nederlandse, Faeröer, en Noorse individuen. De metingen zijn gedaan op juveniele planten en daardoor erg moeilijk op te meten en te vergelijken. Als juveniel lijken de individuen uit de verschillende regio's nog erg op elkaar.

Als voorbeeld is hier het verschil in ratio tussen stipe lengte en frond lengte tussen twee Nederlandse kloonlijn individuen. De verschillen zijn significant en sinds de groei omstandigheden identiek waren

(*Fig.32*) kan worden gezegd dat de verschillen dus genetisch bepaald zijn. Meer van dit soort correlaties zijn gevonden, maar er moet meer studie worden gedaan om echt iets te zeggen over de resultaten.

Unifactoriële variantie-analyse van de ratio tussen stipe lengte en blade lengte van twee nederlands individuen.

SAMENVATTING

Groepen	*Aantal*	*Som*	*Gemiddelde*	*Variantie*
SANL-013	26	14,26589846	0,548688	0,020547
SANL-014	30	13,12778974	0,437593	0,011692

Variantie-analyse

Bron van variatie	*Kwadratensom*	*Vrijheidsgraden*	*Gemiddelde kwadraten*	*F*	*P-waarde*
Tussen groepen	0,171909	1	0,171909	10,88632	0,001719
Binnen groepen	0,85273	54	0,015791		
Totaal	1,024639	55			

Sinds dit op zeer kleine schaal is gedaan en alleen mogelijk was op juveniele individuen is deze studie op zijn best een verkennende studie. De kloonlijnkruisingen die in mei 2016 geoogst worden zullen echter veel meer duidelijkheid geven op de vraag hoeveel van de morfologie genetisch is bepaald.

Eiwit bepaling van Saccharina latissima *en* Laminaria digitata

Naast morfologie is er ook het eiwit gehalte en samenstelling bepaald van enkele kruisingen. Dit is gedaan voor twee aparte soorten *Saccharina latissima* en *Laminaria digitata*. Zie tabel 7 voor een overzicht van deze analyse. Daarnaast zijn ook andere cel componenten bepaald. Deze kruisingen bestaan uit wild type cultures, niet kloonlijnen. Wat opvalt is dat *Saccharina* over het algemeen meer eiwit (17-26%) en mannitol (6-13%) bevat dan *Laminaria* (respectievelijk 11-17% en 5%), terwijl *Laminaria* meer alginaten bevat (22% tegen 9-18%). Verder verschillen beide soorten van aminozuur samenstelling. Dit betekent dat elk van deze soorten in de toekomst zijn eigen toepassing zal gaan krijgen en dat er dus aan de aan hand van deze toepassingen geselecteerd en veredelt moet gaan worden. De gemeten waarden zullen als maatstaf gaan dienen voor de kruisingen die in de toekomst op eiwit gehalte en samenstelling en andere cel componenten getoetst zullen gaan worden.

Tabel 7; Organische component analyse van *Saccharina latissima* en *Laminaria digitata*.

Organic Component *Saccharina latissima*	**Result (% dw)** Saccharina latissima	Laminaria digitata
Proteins	17-26	11-17
Lipids	1-8	1-5
Carbohydrates	44	42
Alginates	9-18	22
Mannitol	6-13	5
Fucoxanthin	0.01-0.06	0.04-0.07
Amino Acid (%wt total AA)		
Alanine	8.3	11.5
Arginine	4.8	12.8
Asparagine acid + Asparagine	11.9	3.8
Cystine	1.2	2.6
Glutamine acid + Glutamine	15.5	12.8
Glycine	7.1	6.4
Histidine	4.8	3.8
Isoleucine	4.8	3.8
Leucine	7.1	6.4
Lysine	5.9	5.1
Methionine	2.4	2.6
Phenylalanine	4.8	5.1
Proline	4.8	5.1
Serine	4.8	3.8
Threonine	4.8	5.1
Tryptophan	1.2	1.3
Tyrosine	0.1	1.3
Valine	5.9	6.4

6.2. Verkenning of bepaalde eigenschappen kunnen worden geselecteerd op het niveau van gametofyten, in relatie tot sporofyt nakomelingen.

Bij veredeling is het van cruciaal belang dat bepaalde kenmerken in een zo vroeg mogelijk stadium te achterhalen is. Heirdoor kan er snel een eerste scheiding plaats vinden tussen veel belovende nakomelingen en de minder veelbelovende nakomelingen. Gametofyten hebben 50% van de genen van de ouders en dit kan duiden op correlaties tussen de haploïde en dipodie fase. Correlaties vinden op groeisnelheid, eiwit content, of koud resistentie kunnen aanzienlijke versnelling teweeg brengen in het veredelingswerk.

De eerste taak was om te kijken of er überhaupt fenotypische verschillen te vinden zijn tussen gametofyten. Hierbij is gekozen voor de makkelijkst te beoordelen fenotypische eigenschap in gametofyten, de branch breedte. Indien dit inderdaad verschilt van elkaar betekend dit dat er op gametofyt niveau analyses kunnen worden gedaan op fenotypische eigenschappen.

Branch breedte gametofyt

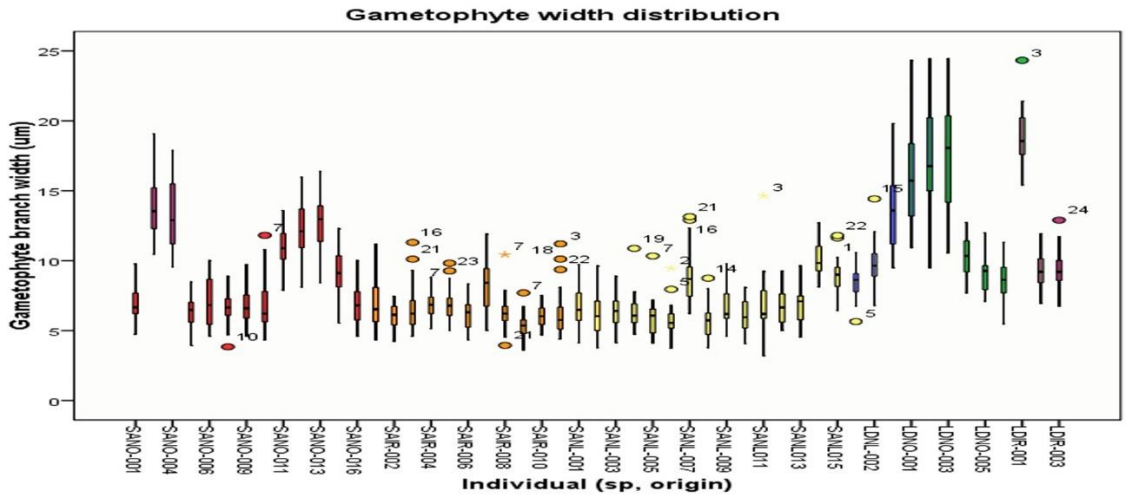
Kloonlijnen zijn gebruikt om uit te zoeken of de breedte van gametofyt branches (takken) verschillen op regionaal niveau dan wel individueel niveau. Deze vergelijkende studie is gedaan op individuen van *Saccharina latissima* en *Laminaria digitata* voor de regio's Nederland, Noorwegen, en Ierland.

De branch breedte is systematisch gedaan op specifieke plekken van de gametofyt. Hierbij is steeds gekozen voor een distaal gebied vlakbij het topje van een branch *(Fig.41).*



figuur 41; Microscoop foto's (vergroting 400) van gametofyt branches. Hierbij zijn de breedtes opgemeten (gele nummers) en vergeleken. De schaal is in rood beschreven rechts onder in de hoe.*

Van elke kloonlijn zijn 10 foto's gemaakt en in totaal zijn hiervan 26 metingen verricht. Dit resulteerde in de volgende resultaten *(Fig.42)* . Hierin is onderscheid gemaakt tussen soort (Saccharina latissima of Laminaria digitata), sekse (man of vrouw), en regio (Nederland, Noorwegen, of Ierland).



figuur 42; Branch breedtes zijn gemeten van Saccharina latissima (rood, oranje, geel) en Laminaria digitata (blauw, paars, en groen). Gametofyten komen uit drie gebieden; Noorwegen (Rood en groen), Nederland (Geel en blauw), en Ierland (oranje en paars). Verder zijn zowel vrouwelijke als mannelijke gametofyten bekeken *(Bijlage B).* De x-as laat de verschillende kloonlijnen zien onder de specifieke kloonlijn codering. De y-as is de breedte van de branch in µm op plakken zoals is laten zien in *Fig.40.*

In het kort zijn de resultaten bemoedigend te noemen. Significante verschillen zijn gevonden tussen soorten en sekse. Tevens zijn er trends gevonden tussen verschillende regio's waardoor regionale vergelijkingen gedaan kunnen worden. Gametofyten van *Laminaria digitata* zijn aanzienlijk dikker dan de gametofyten van *Saccharina latissima*.

De verschillen tussen de sekse zijn tevens goed nieuws voor controle studies. Bij het produceren van kloonlijnen moet in een vroeg stadium al kunnen worden bepaald met welke sekse gewerkt wordt. Dit wordt met de data die verkregen is bij deze studie erg vergemakkelijkt.

Ook is duidelijk dat er vooral regionale verschillen te vinden zijn tussen de vrouwelijke gametofyten. Zo is te zien dat de Noorse vrouwtjes (SANO-004 en SANO-011, en SANO-013) groter dan de Nederlandse en Ierse vrouwtjes (SANL-007 en SAIR – 008). Dit baant de weg voor interregionale vergelijkingen tussen gametofyt breedte en groei van de sporophyte.

Nu duidelijk is dat er regionale verschillen zijn tussen gametofyten is het een vanzelfsprekende stap om verschillen te zoeken op individueel niveau. Vroegtijdige beoordeling is mogelijk als bij kloonlijnen goede eiwit analyses of groei metingen gedaan kunnen worden. Als uit de data blijkt dat dit significant verschilt van individu tot individu dan kan gekeken worden of dit in een later stadium (sporophyte) ook te correleren is.

7. Evaluatie en opzetten veredelingsprogramma voor korte en lange termijn.

7.1 Evaluatie van de selectie en veredeling strategieën

Sinds 2009 is Hortimare aan het werk aan de vermeerdering en reproductie van zeewier, waarbij het project Zeewier Hatchery een belangrijke rol heeft gespeeld. Gedurende deze tijd hebben wij in samenwerking met het NIOZ een aantal selectie en veredeling strategieën ontworpen welke Hortimare in de toekomst zal uitvoeren. Bij elk van deze strategieën gaan gametofyt kloon lijnen het uitgangspunt worden, wat betekent dat Hortimare in de toekomst het gebruik van wild-type cultures wil gaan uit faseren en daarvoor in de plaats hybriden gaan leveren. Daarnaast hebben we via het Zeewier Hatchery project de benodigde kennis en ervaring op gedaan om deze strategieën uit te voeren, als ook de benodigde faciliteiten gebouwd om continuïteit hieraan te geven. Er is een uitgebreid fenotypering programma opgezet, welke continu uitgebreid wordt met nieuwe vondsten. Hiermee is ondertussen al veel data verzameld over morfologische verschillen tussen hybrides van verschillende locaties. Veel van deze hybrides laten significante verschillen zien in deze morfologie wanneer deze met elkaar vergeleken worden. De eerste stappen zijn nu gemaakt om hierbij ook proteïne gehalte en groei snelheid te betrekken, als ook gametofyt morfologie.

We maken onderscheid tussen de volgende strategieën:

1. Polyploïdie inductie
2. Conventionele hybriden
3. Merker-geassisteerd veredeling

Zie *fig. 43* voor een schematische weergave van deze strategieën. Deze 3 strategieën komen uiteindelijk samen in commerciële zeewier rassen met de juiste eigenschappen en voor afzonderlijke locaties.

Polyploïdie inductie

Door middel van ploïdie inductie in gametofyten hopen we kruisingen te kunnen maken die enorme groeikracht laten zien (door middel van bijvoorbeeld tetraploïdie) of infertiel zijn (door middel van triploïdie). Zie hoofdstuk 2.1 voor een uitgebreide uitleg hiervan. Echter, wil Hortimare deze techniek gaan uitvoeren dan moet er geïnvesteerd gaan worden in nieuwe technieken en apparatuur. Zo is de inductie van ploïdie relatief eenvoudig in zeewieren, aangezien ploïdie niveau van nature een plastisch iets is in de kelpsoorten die wij kweken. Echter brengt dit ook problemen met zich mee en zal door die plasticiteit het lastig zijn om daadwerkelijk de beoogde sporofyten te verkrijgen. Daarnaast zal er een betrouwbare snelle methode ontwikkelt moeten worden om dit ploïdie niveau te bepalen, iets wat zeker kan maar nauwe samenwerking zal gaan vereisen met het NIOZ.

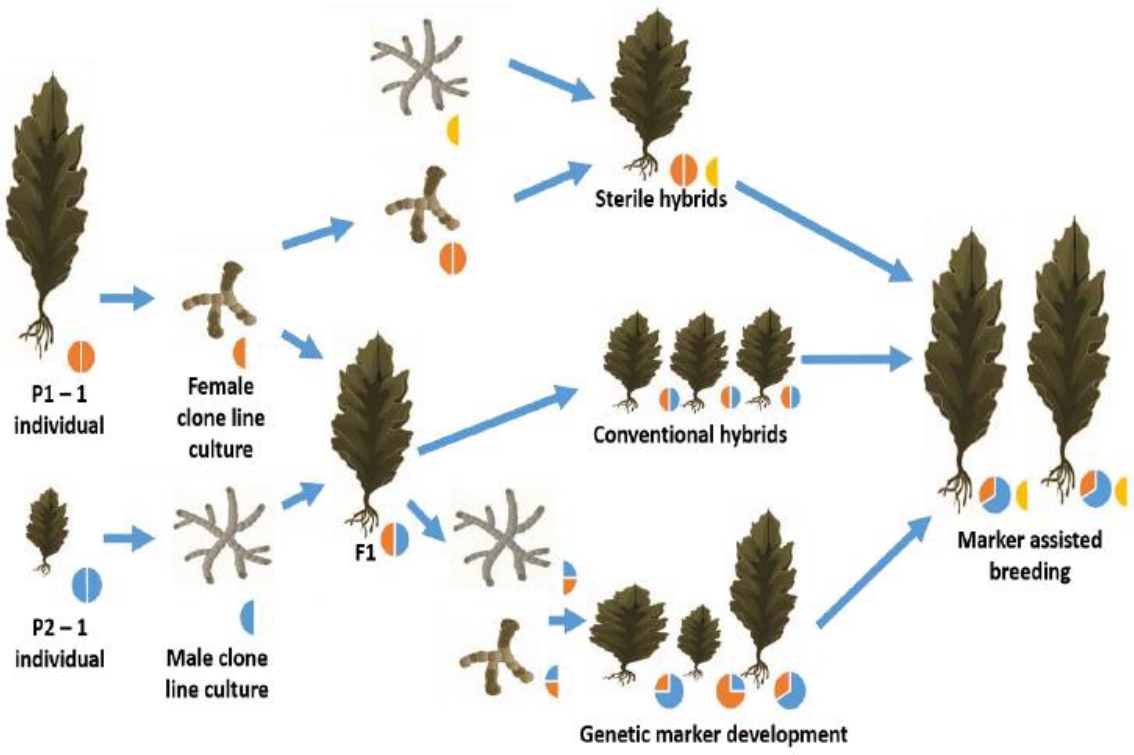
Conventionele hybriden

In deze strategie worden willekeurige kruisingen gemaakt tussen mannelijke en vrouwelijke gametofyt kloonlijnen, waarna de sporofyt generatie uitgegroeid wordt en getest/geselecteerd op bepaalde eigenschappen als verhoogd proteïne gehalte en hoge groeikracht. In het kader van deze strategie zullen alle nakomeling lijnen gescreened worden op groei, morfologie en eiwit gehalte. Echter betekent deze strategie wel het maken van honderden kruisingen met een geringe kans dat er tussen die kruisingen de juiste combinatie zit waarbij de genoemde eigenschappen goed naar voren komen. De strategie is dus een

tijd en arbeid intensieve methode, maar vergeleken met de andere strategieën een relatief eenvoudige. Bij deze strategie zijn namelijk geen geavanceerde DNA of ploïdie protocollen nodig, maar alleen fenotypering.

Merker-geassisteerd veredeling

De meest geavanceerde strategie welke Hortimare graag wil gaan toepassen, waarbij door middel van DNA merker ontwikkeling voor geassocieerde eigenschappen snelle screening van ouder sporofyten kan gaan plaats vinden. Mochten de juiste eigenschappen gevonden zijn in deze ouders, dan kan er vanuit deze ouders gametofyt kloon cultures opgezet worden, welke door middel van kruising moeten leiden tot een nakomeling lijn welke de juiste eigenschap bezit. Echter, voordat dit proces zo ver is moet er nog veel ontwikkeling plaats vinden in het identificeren van de DNA merkers en aan welke eigenschappen deze merkers gelinkt zijn. Dit betekent dat er een uitgebreide studies moeten komen naar het genotype van de kelp soorten als ook een uitgebreide studie naar het fenotype. Deze data moet dan aan elkaar gelinkt worden door ten minste 30 sporofyten compleet op deze manier door te meten. Het fenotypering protocol is al ver gevorderd, maar de genotypering zal nog opgezet moeten gaan worden. Hierbij is de hulp van gespecialiseerde bedrijven zoals Genetwister nodig. Deze bedrijven hebben een uitgebreide ervaring met merker ontwikkeling binnen landbouw gewassen. Daarnaast hebben zij ook al laten weten zeer geïnteresseerd te zijn om te helpen met DNA merker ontwikkeling voor zeewier veredeling, een compleet nieuw concept binnen Europa.



figuur 43; Schematische weergave van de 3 veredeling strategieën welke Hortimare wil gaan volgen. Hierbij leiden alle strategieën uiteindelijk tot een commercieel zeewier ras met de juiste eigenschappen.

7.2. Vermeerdering van de beste selecties t.b.v. grootschalige testen.

De resultaten die gegenereerd worden uit de kloonlijnkruisingen die dit groei seizen in zowel Noorwegen als Nederland groeien zullen gebruikt worden om de eerste veredelingsselectie uit te voeren. De kloonlijn cultures die gebruikt zijn bij de kruisingen worden allen zoveel mogelijk vermeerderd gedurende het groeiseizoen zodat bij resultaten snel door geproduceerd kan worden.

De opschaling die voorhanden ligt resulteert in nog hogere biomassa's dan in het seizoen 2015/2016. Hiervoor zijn schattingen gemaakt (*Tabel 8*) op basis van ervaring, in acht nemend dat elke kloonlijn een eigen groeisnelheid heeft en dat mannetjes anders groeien dan vrouwtjes. Ook is rekening gehouden met de maximum capaciteit van onze kwekerij. In een ideale kwekerij zou de te produceren biomassa nog hoger kunnen liggen.

Tabel 8; Overzicht van de kloonlijnen die in grote mate beschikbaar zijn (minimaal 400ml cultures). Hierbij is een schatting van actuele biomassa en een prognose van de toekomstige biomassa inbegrepen.

Kloonlijn code	**Oorsprong**	**Soort**	**Sekse**	**Hoeveelheid biomassa (ml) 10-10-15**	**Potentiele biomassa seizoen 2016/2017**
SAFI-013	Faroe Eilanden	Saccharina latissima	M	1	30/100
SAFI-016	Faroe Eilanden	Saccharina latissima	V	1	30/100
SAFI-018	Faroe Eilanden	Saccharina latissima	M	1	30/100
SAFI-019	Faroe Eilanden	Saccharina latissima	M	2	60/100
SANL-010	Nederland	Saccharina latissima	M	2	60/100
SANL-011	Nederland	Saccharina latissima	V	3	100/150
SANL-015	Nederland	Saccharina latissima	M	2	60/100
SANL-022	Nederland	Saccharina latissima	V	5	200
SANL-025	Nederland	Saccharina latissima	V	4	200
SANL-027	Nederland	Saccharina latissima	V	4	200
SANL-037	Nederland	Saccharina latissima	V	2	60/100
SANL-039	Nederland	Saccharina latissima	M	2,5	60/100
ALNO-001	Noorwegen	Alaria esculenta	V	20	500
ALNO-004	Noorwegen	Alaria esculenta	M	5	200
ALNO-005	Noorwegen	Alaria esculenta	V	1	30/100
ALNO-006	Noorwegen	Alaria esculenta	M	3	100/150
SANO-001	Noorwegen	Saccharina latissima	M	27	500
SANO-002	Noorwegen	Saccharina latissima	V	2	60/100
SANO-004	Noorwegen	Saccharina latissima	M+V	4	200
SANO-006	Noorwegen	Saccharina latissima	M	7	250
SANO-010	Noorwegen	Saccharina latissima	M	5,5	200
SANO-012	Noorwegen	Saccharina latissima	V	220	1000
SANO-013	Noorwegen	Saccharina latissima	V	5	200
SANO-022	Noorwegen	Saccharina latissima	M	3	100/150
SANO-024	Noorwegen	Saccharina latissima	V	18	500
SANO-040	Noorwegen	Saccharina latissima	V	8	300

De prognose die gemaakt kan worden kan gebruikt worden om uit te rekenen hoeveel meter zeewier er geproduceerd kan per F1hybride. Neem bijvoorbeeld de succesvolle kruising SANO-006/SANO-012. Hier is de te produceren totale biomassa 500 ml. Dit komt namelijk dat de ratio man/vrouw 1op 1 is en dat SANO-006 250ml biomassa heeft. In de wetenschap dat er strekkende meter zeewier 0,08ml biomassa wordt gebruikt resulteert dit in potentieel 6125 meter aan zeewierlijn. Dit zijn enorme aantallen die uiteindelijk ook resulteren in enorme hoeveelheden zeewier.

Gezien de hoeveelheden gametofyt biomassa die tot onze beschikking staat en de prognose van het zeewier dat nodig is voor toekomstige klanten en projecten kan gezegd worden dat levering hiervan haalbaar is. Dit betekend dat de behaalde resultaten betreffende de kloonlijn kruisingen binnen dit Hatchery project een succes is gebleken. Niet alleen is het gelukt om succesvol kruisingen te maken. Ook is het gelukt om voor het volgende seizoen grote hoeveelheden biomassa te kunnen produceren van specifieke kloonlijnen. Dit geeft ons de uitgangspositie een eigen ras op de markt te brengen als de kloonlijn kruisingen in Mei 2016 potentie laten zien.

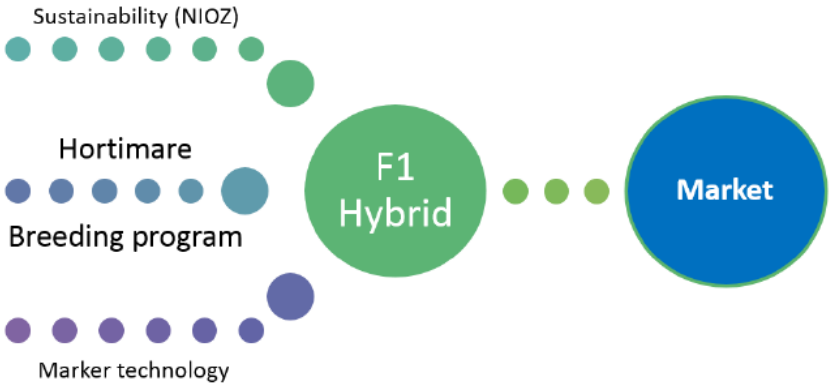
De kruisingen die in het kader van dit project zijn gemaakt zijn ingezet in veel verschillende zeewier projecten. Voor een geselecteerd overzicht hiervan zie tabel 6.

7.3. Definiëren van een veredelingsprogramma waaruit al op korte termijn rassen beschikbaar komen en een programma met lange termijn perspectief.

Alle topics genoemd in deze rapportage hebben geleidt tot een uniek veredeling programma waarbij onze aanpak en duurzame bedrijf principes centraal staan. Hortimare zal deel uitmaken van en het begin vormen van een nieuwe productie keten (zeewier cultivatie binnen Europa), en onze keuzes zullen de toekomstige ontwikkeling van deze keten sterk beïnvloeden. De grootste probleem op het moment zijn het duurzame gebruik van geselecteerde zeewier hybriden in een open zee ecosysteem. In het kader van dit probleem is er binnen het project Zeewier Hatchery al veel onderzoek gedaan, maar in de nabije toekomst wordt dit onderzoek voortgezet op de volgende punten:

1. Ontwikkeling van F1 hybriden van de soort *Saccharina latissima* met een hoge biomassa opbrengst, gebruik makende van traditionele hybridisatie.
2. Ontwikkeling van ouder lijnen welke hoge proteïne opbrengst laten zien, door middel van DNA merkers.
3. Ontwikkeling van polyploïdie technologie om een hogere opbrengst en steriliteit in de hybride te krijgen. Hiermee is duurzame teelt in open zee mogelijk.
4. Duurzaamheid controle en goedkeuring van onafhankelijke onderzoek instituten in binnen en buitenland, door middel van populatie genetica studies en bevestigen van infertiliteit in zeewier hybrides.
5. Protectie van opgedane kennis door middel van kwekers recht en/of patenten.

De sleutel tot succes is hierbij dat traditionele selectie en moleculaire selectie samen gaan. Hierbij wordt de traditionele manier van veredeling al toegepast en zal er gelijktijdig een nieuw programma gestart worden welke kijkt naar het ontwikkelen van merker-geassisteerd kweken. Hortimare is hierbij het eerste bedrijf dat investeert in moleculair kweken van deze aard in macroalgen. Daarnaast zal er nauw samengewerkt worden met onafhankelijke onderzoeksinstituten om de duurzaamheid van onze strategie te toetsen en garanderen.



figuur 44; Schematische weergave van het veredelingsprogramma met verwachte uitkomst.

Binnen het veredelingsprogramma zijn een aantal praktische activiteiten die direct zullen leiden tot de introductie van een hybride zeewier in de nabije toekomst, welke aangevuld worden door onderzoek activiteiten gericht op merker-geassisteerd veredeling voor snellere identificatie en selectie van waardevolle bestandsdelen in zeewier. Deze activiteiten zijn:

- Genereren van ouder lijnen, inteelt lijnen en F1 hybriden. Productie van gametofyt kloon lijnen staat hierbij centraal om hybriden te kunnen maken met hoge opbrengst.
- Fenotypering van ouder lijnen en hybriden voor morfologische eigenschappen, biomassa, groei en waardevolle inhoudsstoffen (bijvoorbeeld proteïne). Hierbij worden ouder sporofyten, gametofyten, F1 hybride en inteelt lijnen fenotypeerd.
- Genotypering van de wild populatie, ouder lijnen, hybriden en inteelt lijnen voor het ontwikkelen van merkers welke geassocieerd zijn aan bepaalde fenotypische eigenschappen. Hierbij worden ouder sporofyten, kloonlijn gametofyten en hybriden genotypeerd.
- Polyploïdie inductie en productie van steriele hybriden, waarbij de gametofyt kloonlijnen diploïd gemaakt worden.
- Duurzaamheid check door middel van toetsing van het genotype van hybriden tegenover lokale wild populaties en toetsing van infertiliteit in hybriden. Dit gebeurd om er zeker van te zijn dat alleen lokaal materiaal gebruikt wordt en dat verspreiding van de hybriden onmogelijk gemaakt wordt via natuurlijke voortplanting.

In onze onderzoek aanpak willen we gaan voort bouwen op de ervaring opgedaan in dit project, waarbij Hortimare boven alles een duurzame bron van zeewier rassen voor de Europese markt wil gaan vormen. Hierbij ligt de wens om de methode te valideren als de meest duurzame methode om zeewier rassen te kweken. Dit moet uiteindelijk leiden tot een EU richtlijn als zijnde de manier om zeewier te kweken voor gebruik in open zee. Op dit moment zijn er geen richtlijnen hiervoor beschikbaar.

Op het moment zijn er geen zeewier hybriden of variëteiten ingediend voor kwekers rechten en bovendien zijn er geen protocollen voor dit type product. Daarom zal Hortimare in nauwe samenwerking met Naktuinbouw gaan werken om deze nieuwe richting van kwekers recht correct invulling te geven.

8. Bijlagen

Dit eindrapport is tot stand gekomen op basis van de volgende onderzoeksverslagen:

Bijlage A: 20150720 – optimal growth conditions (concentration Vs light)

Bijlage B: 20140130 - Variety in the width of gametophyte branches as method of trait recognition

Bijlage C: 20150108 – summary clone lines crossings (experimental fase)

Bijlage D: 20150220 – smearing of the clone lines

Bijlage E: 20151127 - The production of viable F1 offspring from available clone lines

Bijlage F: 20150907 – Potential crossings & trial run for gender check

Bijlage G: 20150908 - Induction experiment

Bijlage H: 20150922 – setup of large scale induction

Bijlage I: 20151019 – controle tubes induction

Bijlage J: Temperatuur weaning en schok effecten op de ontwikkeling van een Noors ecotype Saccharina latissima.

Bijlage K: Results

Bijlage L: Physiological responses of gametophytes and juvenile sporophytes of Saccharina latissima to environmental changes

Bijlage M: Artificial induction of sori in the kelp species Laminaria digitata (Phaeophyceae) and triggers for sexual reproduction.