Ontwikkeling triploïdie oester

Auteurs: Pauline Kamermans, Ainhoa Blanco & Nienke Bakker – Ten Brinke

Wageningen Marine Research
Rapport C130/16

VERTROUWELIJK

WAGENINGEN
UNIVERSITY & RESEARCH

Ontwikkeling triploïdie oester

Auteur(s): Pauline Kamermans[1], Ainhoa Blanco[1] & Nienke Bakker – Ten Brinke[2]

Publicatiedatum: 23-12-2016

[1]IMARES - Institute for Marine Resources & Ecosystem Studies
[2]Roem van Yerseke B.V.

Wageningen Marine Research Yerseke, December 2016

VERTROUWELIJK

Wageningen Marine Research rapport C130/16

Pauline Kamermans, Ainhoa Blanco & Nienke Bakker – Ten Brinke, 2016. *Ontwikkeling triploïdie oester.* Wageningen Marine Research Wageningen UR (University & Research centre), Wageningen Marine Research rapport C130/16. 26 blz.

Opdrachtgever: Roem van Yerseke B.V.
T.a.v de heer P. Geijssen
Groeninx van Zoelenstraat 35
4401 KZ Yerseke

Wageningen Marine Research Wageningen UR is ISO 9001:2008 gecertificeerd.

© 2016 Wageningen Marine Research Wageningen UR

Wageningen Marine Research, onderdeel van Stichting Wageningen Research
KvK nr. 09098104,
IMARES BTW nr. NL 8113.83.696.B16.
Code BIC/SWIFT address: RABONL2U
IBAN code: NL 73 RABO 0373599285

De Directie van Wageningen Marine Research is niet aansprakelijk voor gevolgschade, noch voor schade welke voortvloeit uit toepassingen van de resultaten van werkzaamheden of andere gegevens verkregen van Wageningen Marine Research opdrachtgever vrijwaart Wageningen Marine Research van aanspraken van derden in verband met deze toepassing.
Dit rapport is vervaardigd op verzoek van de opdrachtgever hierboven aangegeven en is zijn eigendom. Niets uit dit rapport mag weergegeven en/of gepubliceerd worden, gefotokopieerd of op enige andere manier gebruikt worden zonder schriftelijke toestemming van de opdrachtgever.

A_4_3_1 V24

Inhoud

Samenvatting **4**

1.1 Probleemstelling en achtergrond 5
1.2 Doelstelling 8

2 Methoden **9**

2.1 Techniek om triploïdie oesters te produceren 9
2.2 Ploïdy-behandelingen 9
2.3 Groei condities van diploïde en triploïdie oesters 9
3.1 Techniek om triploïde oesters te produceren 11
3.2 Ploïdy-behandelingen 14
3.3 Vleesgewicht van diploïde en triploïdie oesters 16

4 Conclusies **18**

5 Kwaliteitsborging **19**

Literatuur **20**

Verantwoording **21**

Bijlage 1 Resultaten flowcytometer **22**

Bijlage 2 Triploïdie inductie protocol **25**

Samenvatting

Roem van Yerseke wil een nieuw type Japanse oester (Crassostrea gigas) ontwikkelen met een hogere kwaliteit. Om een hoger/beter vleesgehalte te verkrijgen is een triploïde oester ontwikkeld. Door een extra paar chromosomen zijn triploïde oesters steriel. Omdat geen energie wordt gebruikt voor het ontwikkelen van geslachtsorganen en producten kunnen triploïde oesters sneller groeien en bevatten ze voldoende vlees in de periode dat andere oesters paaien en gewicht verliezen. Er zijn verschillende methoden om triploïde oesters te produceren. Als oesters triploïde zijn gemaakt door fysiologische modificatie (“chemisch geïnduceerd”) kan er sprake zijn van onvolledige triploïdie. Een beperkt gedeelte van deze oesters zijn dan terug veranderd in normale diploïde oesters. Als oesters vanuit een tetraploïde en een diploïde ouder zijn gemaakt (“natuurlijk”) kunnen ze niet terug veranderen naar diploïde oesters In dit project is een voor de Roem van Yerseke toepasbaar protocol ontwikkeld. Er hebben 5 inducties plaatsgevonden. De methode waarbij de 6-DMAP behandeling 15 minuten na bevruchting werd toegepast gaf het hoogste percentage triploïde larven (88%). Na 4 maanden was nog 60 % van de snelle groeiers triploïd en van de langzame groeiers 70% triploïd. Na een jaar was dat 86% voor de langzame groeiers. Dit geeft aan dat het 6-DMAP protocol bruikbaar is. Zowel de groei als het visgewicht was niet hoger voor triploïde oesters in vergelijking met diploïde oesters. Mogelijk was de testperiode niet lang genoeg om verschillen te kunnen detecteren.

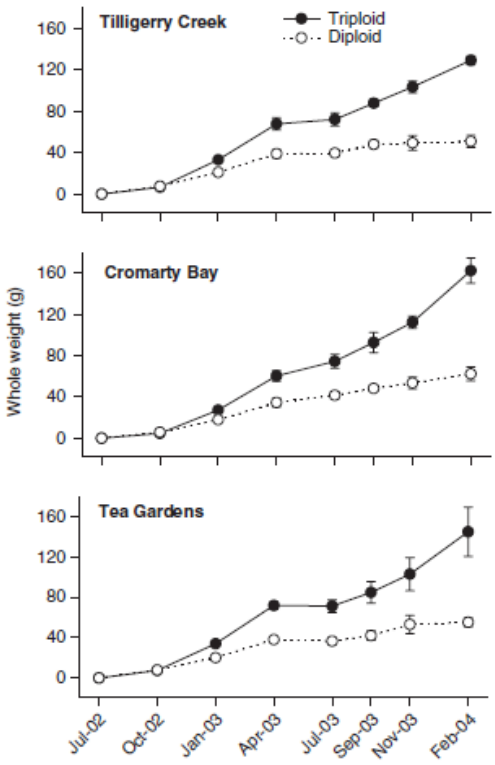
1 Inleiding

1.1 Probleemstelling en achtergrond

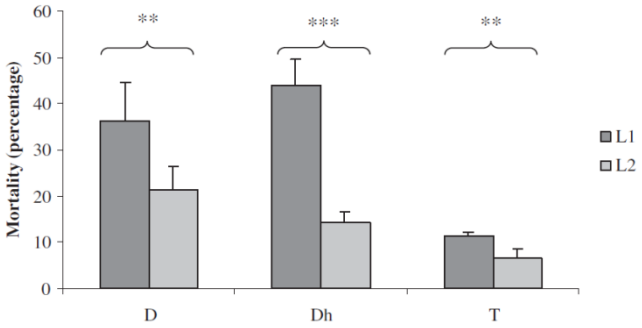
In Nederland worden twee soorten oesters gekweekt: de Japanse oester of creuse (Crassostrea gigas) en de platte oester (Ostrea edulis). De Japanse oester komt oorspronkelijk uit noordoost Azië en is via Frankrijk geïntroduceerd in Nederland voor de teelt nadat in de jaren zestig de kweek van platte oesters door een zeer strenge winter en ziektedruk instortte. Roem van Yerseke wil een nieuwe Japanse oester (Crassostrea gigas) ontwikkelen met een hogere kwaliteit. Om een hoger/beter vleesgehalte te verkrijgen, wordt een triploïde oester ontwikkeld. In Frankrijk wordt hier al vele jaren gebruik van gemaakt. Daar is 30% van de gekweekte oesters triploïd (Robert et al., 2012).

Triploïde organismen hebben drie paar chromosomen in hun cellen in plaats van de normale twee paar. Een chromosoom is een drager van een deel van het erfelijk materiaal (DNA) van een organisme. Chromosomen komen voor in paren, waarbij één exemplaar van de moeder komt en het andere van de vader. Door foutjes bij de bevruchting kunnen triploïde organismen ontstaan. Zo ontstonden ook bananen met 3 paar chromosomen (3n). Dit gebeurde doordat haploïde stuifmeelkorrels (n) diploïde (2n) vrouwelijke cellen bevruchtten. Dit zijn de bananen die wij eten. Een eigenschap van planten met triploïde cellen is, dat zij grotere bloemen en/of vruchten dragen. Dit geldt ook voor de banaanvrucht. Daarnaast zijn triploïde planten steriel, en kunnen ze zich dus alleen vegetatief voortplanten. Soortgelijke eigenschappen zijn voor de oesterkweek ook nuttig, waardoor triploïdie oesters interessant zijn.

Door het extra paar chromosomen zijn triploïde oesters steriel. Omdat geen energie wordt gebruikt voor het ontwikkelen van geslachtsorganen kunnen triploïde oesters sneller groeien (Figuur 1, Stanley, et al., 1984; Nell & Perkins, 2005). Guéguen et al (2012) hebben filtratiesnelheden van diploïde en triploïde oesters gemeten en vonden geen verschil. De effectievere groei van triploïden wordt waarschijnlijk veroorzaakt door een efficiëntere assimilatie of metabolisme. Er worden dus niet meer algen gebruikt. Door de snellere groei zal de kweekcyclus korter zijn. Daarnaast bevatten triploïde oesters voldoende vlees in de periode dat andere oesters paaien gewicht verliezen (Beaumont and Fairbrother, 1991; Nell & Perkins, 2005; Boudry, 2008; Normand et al., 2008, 2009). Dit zorgt ervoor dat triploïde oesters ook in de zomer interessante markteigenschappen hebben. Ook zijn triploïde oesters beter resistent tegen stressvolle condities (Garnier-Gere et al., 2002) en vertonen ze een lagere sterfte (Figuur 2, Gagnaire et al., 2006).

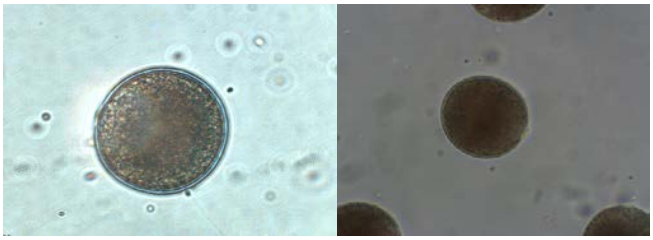


Figuur. 1. *Groei van Japanse triploïde en diploïde oesters in Port Stevens, Australië. Uit Nell & Perkins, 2005.*



Figuur. 2. *Sterfte percentage van in het wild opgevangen oesters (D), hatchery geproduceerde oesters (Dh) en triploïde oesters (T) gekweekt van maart tot september 2002 in zakken op tafels 15 cm boven de bodem (L1) en 70 cm boven de bodem (L2) in Marennes-Oleron, Frankrijk. Uit Gagnaire et al., 2006.*

Triploïde oesters zijn oesters van dezelfde soort als die nu gekweekt wordt (de Japanse oester *Crassostrea gigas*). De productie van triploïde oesters vindt plaats door een behandeling van diploïde oesters tijdens de bevruchting in de hatchery.

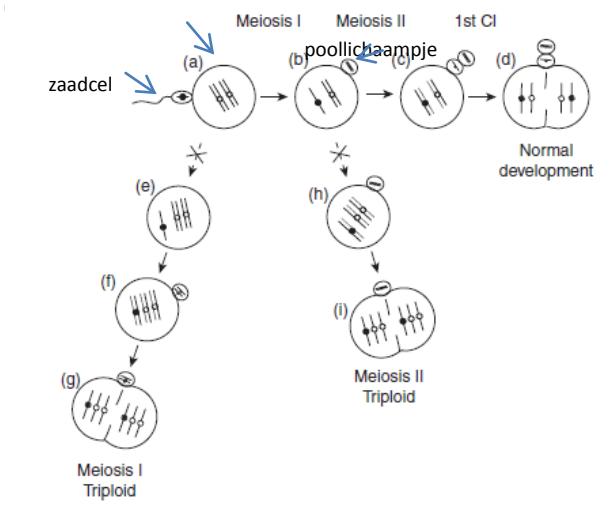


Figuur. 3. *Links: bevruchte eicel met zwarte zaadcel zichtbaar aan rand rechtsonder. Rechts: bevruchte eicel met geel poollichaampje zichtbaar aan rand rechts net onder midden. Uit Kamermans et al., 2012.*

Bij een normale bevruchting van schelpdieren wordt een diploïde eicel bevrucht door een diploïde zaadcel (Figuur 3). De twee extra paar chromosomen die hierna aanwezig zijn in de eicel worden kort na de bevruchting naar buiten gebracht als twee poollichaampjes (a-d in Figuur 4). Door dit proces te stoppen kan een extra paar in de eicel worden behouden (e-g of h-i in Figuur 4) en ontstaat een organisme met drie paar chromosomen. Door de net bevruchte eicellen kort bloot te stellen aan een hogere temperatuur of een chemische oplossing kan het proces wordt gestopt.

Er zijn verschillende methoden om triploïde oesters te produceren. Als oesters triploïde zijn gemaakt door fysiologische modificatie (“chemisch geïnduceerd”) kan er sprake zijn van onvolledige triploïdie (Lapègue et al, 2008). Een beperkt gedeelte van deze oesters zijn dan terug veranderd in normale diploïde oesters. Als oesters vanuit een tetraploïde en een diploïde ouder zijn gemaakt (“natuurlijk”) kunnen ze niet terug veranderen naar diploïde oesters (Guo et al., 1996). Tetraploïde oesters worden in een hatchery gemaakt, gechecked met behulp van ploïdy-bepalingen met een flow cytometer om te zien of de behandeling succesvol was.

Het toepassen van het protocol is afhankelijk van de lokale omstandigheden in de hatchery. Daarom is optimalisatie noodzakelijk.



Figuur. 4. *Productie cycles triploide oesters, met momenten waarop behandeling plaatsvindt (aangegeven met pijltje). Uit Kamermans et al., 2012.*

1.2 Doelstelling

Het doel van Roem van Yerseke is een methode te onderzoeken en ontwikkelen voor het produceren van triploïde oesters. Wageningen Marine Research heeft zorggedragen voor het ontwikkelen van een protocol (inclusief praktische begeleiding bij de inducties), het uitvoeren van ploïdy- en vleesgewicht-bepalingen en het begeleiden van het vergunningentraject.

2 Methoden

2.1 Techniek om triploïdie oesters te produceren

Industriële en wetenschappelijke informatie over bestaande technieken is verzameld en vertaald naar een voor de Roem van Yerseke toepasbaar protocol.
Het toegepaste protocol staat beschreven in bijlage B. Het protocol is in verschillende stappen (verschillende inducties) geoptimaliseerd.

2.2 Ploïdy-behandelingen

Het succes van de verschillende inducties is bepaald door middel van ploïdy-bepalingen.
Flow cytometry protocol voor de bepaling van ploidy van oesterlarven:
Het protocol voor ploidy-bepaling van de oester larven was geadapteerd uit het protocol ontwikkeld door Abdellah Benabdelmouna en Florence Cornette (Ifremer, La Tremblade).
- een monster met minimaal 50 larven werd gepipetteerd in een Eppendorf tube van 1.5 ml.
- de monsters werden gecentrifugeerd (5 min, 1000rpm) en afgeheveld met een pipet om zo veel mogelijk water te verwijderen.
- 1 ml “Cyto buffer” werd toegevoegd aan de larven monsters. De larven werden kapot gemaakt met behulp van een “Dounce tissue grinder”.
- Deze oplossing werd met een xml spuit, gefiltreerd door een 30 µl “cell-trick”filter in een nieuwe 1.5 ml Eppendorf tube.
- 1 ml “Cyto-buffer+Propidium iodide” werd toegevoegd.
- Na een incubatie tijd van minimaal 30minuten (en maximaal 18 uur) in ijs waren de monsters klaar voor de ploidy analyses met behulp van de flow cytometer (BD Accuri C6).
- Eerst werd een standard TRBC (trout red blood cells) als referentie monster gemeten die een bekende piek geeft.
- Daarna werden de verschillende monsters gemeten om de ploidy van de oesters te bepalen.

Flow cytometry protocol voor de bepaling van ploidy in broed:
- Een stuk uit de kieuwen van ongeveer 1 mm wordt toegevoegd aan 1.5 ml Eppendorf tube met 1 ml “Cyto buffer”
- met behulp van een 1000 µl pipet (herhaaldelijk opzuigen) wordt het stukje kieuw kapot gemaakt tot een “nuclei”oplossing
- Deze oplossing werd gefiltreerd door een 30 µl “cell-trick”filter in een nieuwe 1.5 ml Eppendorf tube.
- 1 ml “Cyto-buffer+Propidium iodide” werd toegevoegd.
- Naar een incubatie tijd van minimaal 30 minuten (en maximaal 18 uur) in ijs waren de monsters klaar voor de ploidy analyses met behulp van de flow cytometer (BD Accuri C6).
- Eerst werd een standard TRBC (trout red blood cells) als referentie monster gemeten die een bekende peak geeft.
- Daarna werden de verschillende monsters gemeten om de ploidy van de oesters te bepalen.

2.3 Groei condities van diploïde en triploïdie oesters

Binnen de projectperiode is het niet gelukt om de vergunning te verkrijgen voor het uitzetten van triploiden in open water. Hierdoor is het niet mogelijk geweest om de triploïde oesters op de verschillende percelen op te kunnen kweken. Om de verschillen tussen triploïde en diploïde broed toch in de grow-out fase te kunnen vergelijken is er voor een andere aanpak gekozen. Eigen diploïde broed en aangekochte diploïde broed is uitgezet op twee locaties in het buitenwater; Kattendijke (Roem) en Kats / Zandkreek (Bonton). Bij de hatchery van Roem is een ruimte ontwikkeld om zowel eigen diploïde broed als aangekocht diploïde broed en aangekocht triploïde broed te kweken. Door de

verschillen tussen eigen en aangekocht diploïde broed te vergelijken op de drie locaties kan een schatting worden gemaakt van de groei van de het triploïde broed.
Wanneer de oesters in mei zijn uitgezet is het natgewicht bepaald van 20 oesters per groep; 1 diploïde Roem; 2 diploïde novo (aangekocht); 3 triploïde novo (aangekocht). In juli zijn 3 mandjes per groep, per locatie bemonsterd (20 oesters per mandje). Aan het eind van het kweekseizoen is van 10 oesters per groep, per locatie het vleesgewicht bepaald door middel van natgewicht en drooggewicht.

- 10 oesters per locatie werden open gemaakt en het vlees uit de schelp gehaald.
- Schelp en vlees werden in individueel voor gewogen kroesjes overgebracht
- Voor de droging van de schelp en vlees, werden de kroesjes in een droogstoof geplaatst gedurende 48 uur bij een temperatuur van 70°C.
- Na de droging werden de kroesjes overgebracht naar de exsiccator tot dat ze op kamer temperatuur stonden.
- Ten laatste werden de kroesjes individueel terug gewogen om het drooggewicht te bepalen.
Vleesgewicht werd berekend door met het gewicht van de kroesjes te corrigeren. Versgewicht is vleesgewicht + schelpgewicht en het percentage vleesgewicht is het percentage van het totaal (vlees + schelp).
- Een statistische analyse van verschillen in vleesgewicht werd uitgevoerd met SPSS IBM 19.
Significantie van de verschillen tussen behandelingen werd bepaald met behulp van een-weg variantieanalyse (ANOVA). De homogeniteit van de varianties werd getest met Levene's test. Aangezien de varianties niet homogeen waren, werden de gegevens getransformeerd (logaritmisch van 1/x). Significante verschillen werden aanvaard wanneer $P \leq 0.01$. Significantie van verschillen tussen groepen werden onderzocht met behulp van post-hoc Bonferroni test.

3 Resultaten

3.1 Techniek om triploïde oesters te produceren

Inducties

Vijf verschillende inducties vonden plaats tijdens het project met behulp van de chemische methode. Bij elke inductie werden verschillende behandelingen getest: (1) methode; (2) aanwezigheid poollichaampjes; (3) tijd na bevruchting en (4) hergebruik chemicaliën.

Per inductie werden een aantal oesters uit de broodstock open gemaakt en geselecteerd. Paai rijpe vrouwtjes werden gestript en de eicellen van individuele vrouwtjes werden voor ongeveer 1 uur geïncubeerd in zeewater tot dat ze een mooie ronde vorm kregen.

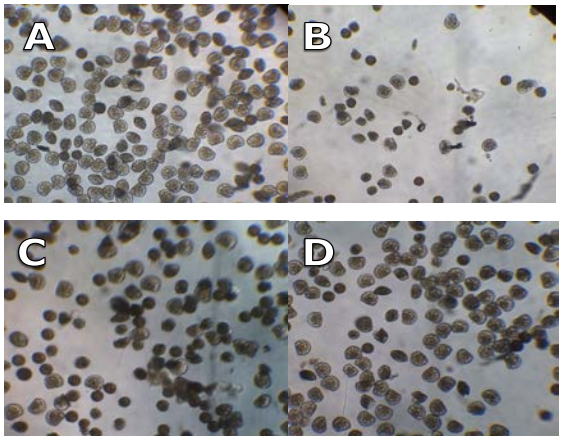
De bevruchtingen voor al de vijf inducties werden uitgevoerd volgens het standaard protocol van de hatchery van Roem van Yerseke. De temperatuur van het gefiltreerd zeewater tijdens de bevruchting was 25 oC. De eicellen werden in een 20 µm zeef geplaatst (deze zeef bleef altijd onder water), de zaadjes werden toegevoegd om de eicellen gedurende 20 seconden te bevruchten. Daarna werd de zeef goed schoongemaakt en de eicellen verdeeld over 5 L maatbekers voor verdere behandeling. Na een specifieke periode, afhankelijk van de test, werd deze oplossing door een 20 µm zeef gefiltreerd. Inductie naar triploidy gebeurt door het contact van bevruchte eicellen met een oplossing van 450 µM 6-DMAP (6-Dimethylaminopurine) voor een periode van een bepaald aantal minuten. De zeef werd ondergedompeld in een bak met 4 L 6-DMAP. Na deze periode werden de eicellen goed gespoeld met gefiltreerd zeewater en geplaatst in 500 L tanks voor verdere ontwikkeling tot D-larven. Bij de eerste inductie werden de eicellen van de controle groep ook in een zeef geplaats en ondergedompeld in een bak met zeewater om hetzelfde behandeling te volgen als de test groepen.

Tabel 1 geef een overzicht van de geteste parameters bij elke inductie. Figuur 5, 6 en 7 geven een indruk van de larven na inductie.

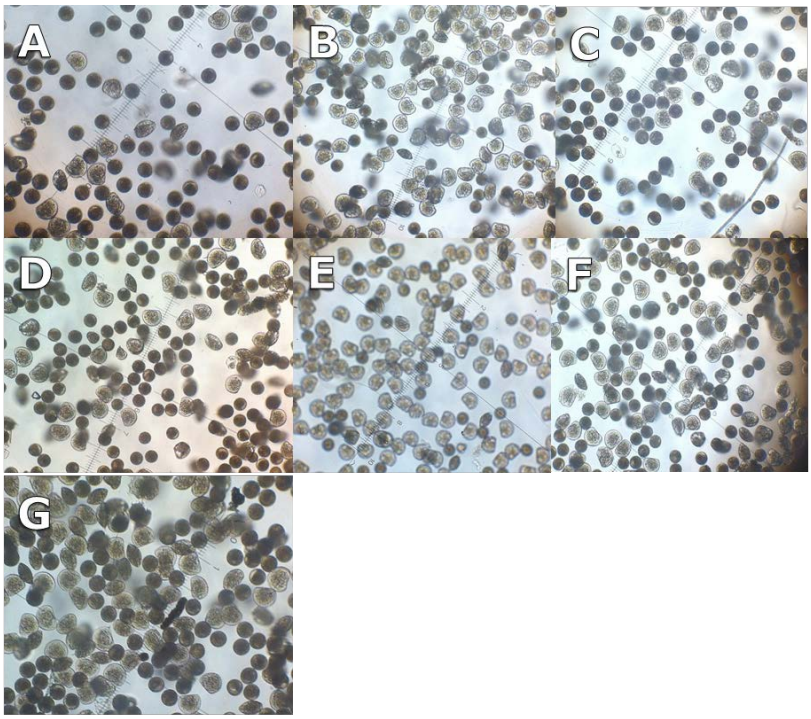
Tabel 1. *Overzicht van de inducties.*

Inductie	Datum	Materiaal	Test
1	2 februari 2015	1♀ _15*10^6 eicellen 2 ♂	**Methode vergelijking** 1. Rutgers methode van Guo et al (1996) (10 minuten na de bevruchting werden de bevruchte eicellen in een zeef geplaatst in een bak met de 450 µM 6-DMAP oplossing) 2. BLUESEED methode van Galley et al (2007) (Na de bevruchting werden de eicellen in 5 L maatbekers gedaan tot bij 50% van de eicellen het eerste poollichaampje werd aangetoond. Daarna zijn ze in een zeef in de bak geplaatst met de 450 µM 6-DMAP oplossing) 3. Controle behandeling zonder triploïdie inductie
2	14 april 2015	2♀ _160*10^6 eicellen 2 ♂	**Polar body aanwezigheid** 1.6-DMAP behandeling wanneer bij 40 % van de eicellen de eerste poollichaampje werd aangetoond 2. 6-DMAP behandeling wanneer bij 50 % van de eicellen de eerste poollichaampje werd aangetoond 3. 6-DMAP behandeling wanneer bij 90-100 % van de eicellen de eerste

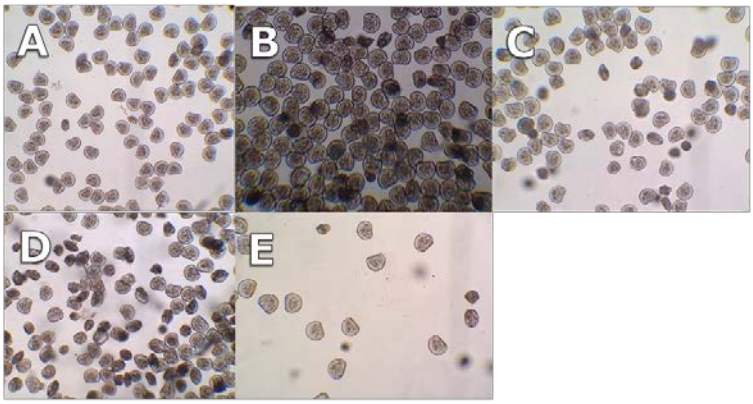
			poollichaampje werd aangetoond 4. Controle behandeling zonder triploïdie inductie
3	28 April 2015	2♀ _62.5*10^6 eicellen 2 ♂	**Tijd na bevruchting inductie** 1. 6-DMAP behandeling 10 minuten na bevruchting 2. 6-DMAP behandeling 15 minuten na bevruchting 3. 6-DMAP behandeling 20 minuten na bevruchting 4. 6-DMAP behandeling 25 minuten na bevruchting 5. 6-DMAP behandeling 30 minuten na bevruchting 6. 6-DMAP behandeling 35 minuten na bevruchting 7. Control behandeling zonder triploïdie inductie
4	6 mei 2015	2♀ _120.8*10^6 eicellen 1 ♂	**Tijd na bevruchting inductie** 1. 6-DMAP behandeling 15 minuten (I) na bevruchting 2. 6-DMAP behandeling 20 minuten na bevruchting 3. 6-DMAP behandeling 10 minuten na bevruchting 4. 6-DMAP behandeling 15 (II) minuten na bevruchting 5. Controle behandeling zonder triploïdie inductie
5	4 juni 2015	2♀ _67*10^6 eicellen 2 ♂	**Hergebruik 6-DMAP** 1. Nieuwe 6-DMAP 2. Een maand oude 6-DMAP 3. Controle behandeling zonder triploïdie inductie



Figuur. 5. *D-larven uit de tweede inductie: A_controle groep; B_40 % van de eicellen vertoonde het eerste poollichaampje voor inductie; C_50 % van de eicellen vertoonde het eerste poollichaampje voor inductie; D_90-100 % van de eicellen vertoonde het eerste poollichaampje voor inductie.*



Figuur. 6. *D-larven uit de derde inductie: A_Control behandeling zonder triploïdie inductie; B_ 6-DMAP behandeling 10 minuten na bevruchting; C_ 6-DMAP behandeling 15 minuten na bevruchting; D_ 6-DMAP behandeling 20 minuten na bevruchting; E_ 6-DMAP behandeling 25 minuten na bevruchting; F_ 6-DMAP behandeling 30 minuten na bevruchting; G_ 6-DMAP behandeling 35 minuten na bevruchting.*



Figuur. 7. *D-larven uit de vierde inductie: A_ Control behandeling zonder triploïdie inductie; B_ 6-DMAP behandeling 15 minuten (I) na bevruchting; C_ 6-DMAP behandeling 20 minuten na bevruchting; D_ 6-DMAP behandeling 10 minuten na bevruchting; E_ 6-DMAP behandeling 15 (II) minuten na bevruchting.*

3.2 Ploïdy-behandelingen

Tabel 2 laat hete percentage triploïde larven gemeten na elke inductie zien. Over het algemeen was het bevruchtingssucces bij de triploïde behandelingen lager dan bij de diploïde behandeling, maar dit is volgens verwachting, omdat blootstelling aan 6-DMAP de periode dat de eicellen bevrucht kunnen worden verkort. In bijlage A wordt een voorbeeld van de uitkomsten van de flow cytometry gepresenteerd.

Tabel 2. *Percentage triploïde larven na elke inductie.*

Inductie	Test	% Triploide larven	Bevruchtingssucces
1	**Methode vergelijking** 1. Rutgers methode (10 minuten naar de bevruchting werden de bevruchte eicellen in een zeef geplaats in een bak met de 450 µM 6-DMAP oplossing) 2. BLUESEED methode (Na de bevruchting werden de eicellen in 5 L maatbekers gedaan tot dat bij 50% van de eicellen het eerste “polar bodie” werden aangetoond. Dan zijn ze in een zeef in de bak geplaats met de 450 µM 6-DMAP oplossing) 3. Controle behandeling zonder triploïdie inductie	0% 55% 0%	27% 23,6% 35 %
2	**Polar body aanwezigheid** 1.6-DMAP behandeling wanneer bij 40 % van de eicellen het eerste poollichaampje werd aangetoond 2. 6-DMAP behandeling wanneer bij 50 % van de eicellen het eerste poollichaampje werd aangetoond 3. 6-DMAP behandeling wanneer bij 90-100 % van de eicellen het eerste poollichaampje werd aangetoond	40 % 30% 10%	1,25% 2% 3,9%

	4. Controle behandeling zonder triploïdie inductie	0%	39%
3	**Tijd na bevruchting inductie**		
	1. 6-DMAP behandeling 10 minuten na bevruchting	81.6%	5.3%
	2. 6-DMAP behandeling 15 minuten na bevruchting	86.6%	6.0%
	3. 6-DMAP behandeling 20 minuten na bevruchting	83.4%	4.3%
	4. 6-DMAP behandeling 25 minuten na bevruchting	56.3%	6.5%
	5. 6-DMAP behandeling 30 minuten na bevruchting	39.3%	5.0%
	6. 6-DMAP behandeling 35 minuten na bevruchting	47.0%	1.8%
	7. Control behandeling zonder triploïdie inductie	0%	11.7%
4	**Tijd na bevruchting inductie**		
	1. 6-DMAP behandeling 15 minuten (I) na bevruchting	88.6%	7.0%
	2. 6-DMAP behandeling 20 minuten na bevruchting	87.0%	21.2%
	3. 6-DMAP behandeling 10 minuten na bevruchting	83.6%	10.7%
	4. 6-DMAP behandeling 15 minuten (II) na bevruchting	88.5%	12.9%
	5. Control behandeling zonder triploïdie inductie	0%	35.0%
5	**Hergebruikt 6-DMAP**		
	1. nieuwe 6-DMAP	29%	4.6%
	2. oude 6-DMAP	22%	3.1%
	3. Control behandeling zonder triploïdie inductie	0%	43.0%

De larven uit de verschillende inducties werden verder opgekweekt tot broed. Al het triploide broed werd bij elkaar gedaan, dus onderscheid tussen de verschillende batches is niet meer mogelijk. Wel zijn snelle en langzame groeiers apart opgekweekt. Vier maanden en een jaar na de laatste inductie werden nieuwe monsters genomen om ploidy te bepalen. Tabel 3 laat de resultaten zien:

Tabel 3. *Percentage triploïde oesters 4 maanden en een jaar na de inductie.*

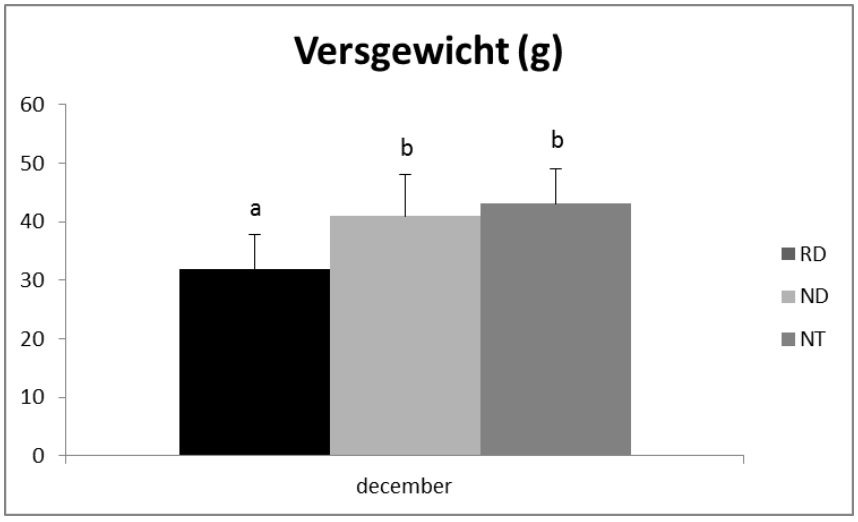
Maanden na inductie	Groep	Diploïde	Triploïde
4	Controle groep	100%	-
	Snelle groeiers	40%	60%
	Langzame groeiers	30%	70%
12	Controle groep	100%	-
	Langzame groeiers	14%	86%

Samengevat gaf de 6-DMAP behandeling 15 min na bevruchting de meeste triploïde larven, gemiddeld 88%. Hierbij was het bevruchtingssucces gemiddeld 8 %. Dit is 19% lager dan de onbehandelde groep. Het percentage triploïden nam in de loop van een jaar af van 88% in het larvale stadium naar 86-70% voor broed.

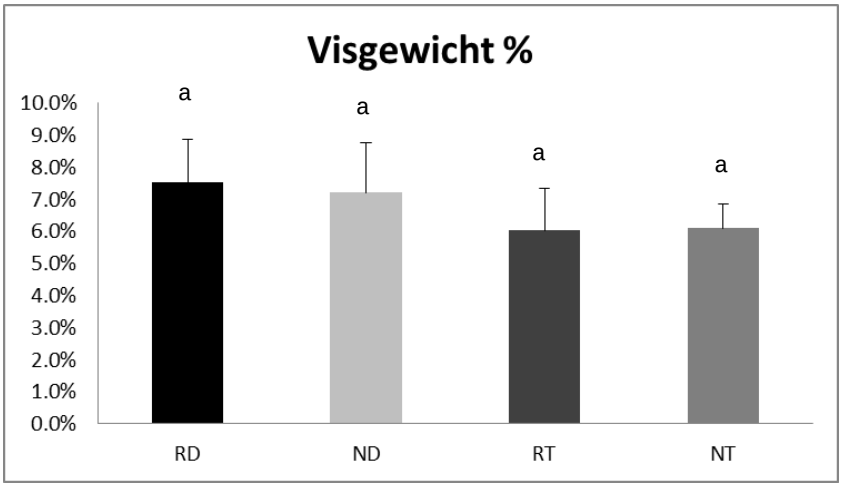
3.3 Vleesgewicht van diploïde en triploïdie oesters

In mei 2015 zijn de oesters uitgezet op de nursery van Roem van Yerseke. Eind juli heeft een tussen monitoring plaatsgevonden van nat gewicht (die niet hier word gerapporteerd) en in december 2015 de laatste monitoring waar zowel nat gewicht (fig. 8) als drooggewicht (fig. 9) van het vlees is bepaald.
De Roem van Yerseke diploïde oesters vertoonde een significante lager vers gewicht dan de Novo oesters (zowel diploïde als triploïde). De Novo triploïde oesters geven hier de beste groei aan (43,1 g over de totale periode van mei tot december) gevolgd door aangekocht diploïde broed (40,9 g) en de laagste groei door eigen diploïde broed (31,9 g).
Er werden geen significante verschillen aangetroffen voor het visgewicht percentage (fig.9) van de vier verschillende groepen. Visgewicht was het hoogst voor de diploïde oesters (oesters opgekweekt bij de Roem 7.5%, gevolgd door de diploïde Novo oesters 7.2%) in vergelijk met triploïde oesters (de diploïde Novo oesters 6.1%, gevolgd door oesters opgekweekt bij de Roem 6%).

De triploïdes geven in deze resultaten geen betere groei aan zoals dit was verwacht binnen de literatuurstudie. Wellicht dat de verschillen nogmaals gemeten moeten worden wanneer de oesters consumptie grootte hebben bereikt.



Figuur. 8. *Versgewicht per groep (n=10)(±SD) aan het eind van de kweek periode. N: novo (aangekocht broed) of R: Roem, D: Diploide of T: Triploide. Behandelingen die dezelfde letter delen zijn niet significant verschillend, maar behandelingen met verschillende letters wel (P< 0.01).*



Figuur. 9. *Visgewicht in percentage drooggewicht per groep (n=10)(±SD) aan het eind van de kweek periode. R: Roem of N: novo (aangekocht broed), D: Diploide of T: Triploide. Behandelingen die dezelfde letter delen zijn niet significant verschillend (P> 0.01).*

4 Conclusies

Een voor de Roem van Yerseke toepasbaar inductie protocol is ontwikkeld (bijlage B). De methode met de 6-DMAP behandeling van 15 minuten na bevruchting werd toegepast gaf het hoogste percentage triploïde larven (88%). 6-DMAP moet daarbij niet ouder zijn dan 1 maand. Na 4 maanden was nog 60% van de snelle groeiers triploïde. Van de langzame groeiers was 70% triploïde. Na een jaar was dat 86% voor de langzame groeiers.
Zowel de groei als het visgewicht was niet hoger voor de triploïde oesters in vergelijking met diploïde oesters. Mogelijk was de testperiode niet lang genoeg om verschillen te kunnen detecteren.

5 Kwaliteitsborging

Wageningen Marine Research beschikt over een ISO 9001:2008 gecertificeerd kwaliteitsmanagementsysteem (certificaatnummer: 187378-2015-AQ-NLD-RvA). Dit certificaat is geldig tot 15 september 2018. De organisatie is gecertificeerd sinds 27 februari 2001. De certificering is uitgevoerd door DNV Certification B.V.

Het chemisch laboratorium te IJmuiden beschikt over een NEN-EN-ISO/IEC 17025:2005 accreditatie voor testlaboratoria met nummer L097. Deze accreditatie is geldig tot 1 april 2017 en is voor het eerst verleend op 27 maart 1997; deze accreditatie is verleend door de Raad voor Accreditatie. Het chemisch laboratorium heeft hierdoor aangetoond in staat te zijn op technisch bekwame wijze valide resultaten te leveren en te werken volgens de ISO17025 norm. De scope (L097) met de geaccrediteerde analysemethoden is te vinden op de website van de Raad voor Accreditatie (www.rva.nl).

Op grond van deze accreditatie is het kwaliteitskenmerk Q toegekend aan de resultaten van die componenten die op de scope staan vermeld, mits aan alle kwaliteitseisen is voldaan.. Het kwaliteitskenmerk Q staat vermeld in de tabellen met de onderzoeksresultaten. Indien het kwaliteitskenmerk Q niet staat vermeld is de reden hiervan vermeld.

De kwaliteit van de analysemethoden wordt op verschillende manieren gewaarborgd. De juistheid van de analysemethoden wordt regelmatig getoetst door deelname aan ringonderzoeken waaronder die georganiseerd door QUASIMEME. Indien geen ringonderzoek voorhanden is, wordt een tweede lijnscontrole uitgevoerd. Tevens wordt bij iedere meetserie een eerstelijnscontrole uitgevoerd.
Naast de lijnscontroles wordende volgende algemene kwaliteitscontroles uitgevoerd:

- Blanco onderzoek.
- Terugvinding (recovery).
- Interne standaard voor borging opwerkmethode.
- Injectie standard.
- Gevoeligheid.

Bovenstaande controles staan beschreven in Wageningen Marine Research werkvoorschrift *ISW 2.10.2.105*.
Indien gewenst kunnen gegevens met betrekking tot de prestatiekenmerken van de analysemethoden bij het chemisch laboratorium worden opgevraagd.

Indien sprake is van onbeheerste kwaliteit worden passende maatregelen genomen.

Literatuur

Beaumont A R & Fairbrother J E (1991) Ploidy manipulation in molluscan shellfish: a review. J. Shellfish Res., 10, 1–18.

Boudry, P. (2008) Review on Breeding and Reproduction of European aquaculture species Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Aqua Breeding report.

Gagnaire B, P Soletchnik, P Madec, P Geairon, O Le Moine, T Renault (2006) Diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), reared at two heights above sediment in Marennes-Oleron Basin, France: Difference in mortality, sexual maturation and hemocyte parameters. Aquaculture 254: 606–616.

Galley T., Beaumont A., Fuentes J. (2007). Mussel Hatchery & Nursery Protocol. Culture of the European mussels Mytilus edulis and Mytilus galloprovincialis. Blue Seed rapport (European Commission funded 6th Framework co-operative research project. Contract number COOP-CT-2005-017729)

Garnier-Gere, P.H., Naciri-Graven, Y., Bougrier, S., Magoulas, A., Heral, M., Kotoulas, G., Hawkins, A., Gerard, A., 2002. Influences of triploidy, parentage and genetic diversity on growth of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* reared in contrasting natural environments. Mol. Ecol. 11, 1499–1514.

Guo, X., Debrosse, G.A. and Allen, S.K.Jr.,1996. All triploid oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids, Aquaculture, 142: 149-161.

Kamermans P, T Galley, P Boudry, J Fuentes, H McCombie, F M. Batista, A Blanco, L Dominguez, F Cornette, L Pincot, & A Beaumont (2013). Blue mussel hatchery technology in Europe. In: Advances in aquaculture hatchery technology. Woodhead Publishing Cambridge, pp 339-373

Lapègue S., P. Boudry and P. Goulletquer (2008) Pacific cupped oyster – *Crassostrea gigas*. Genimpact final scientific report.

Normand J, Le Pennec M and Boudry P (2008) Comparative histological study in diploid and triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) reared in an estuarine farming site in France during the 2003 heatwave. Aquaculture 282, 124–129.

Normand J, Ernande B, Haure J, Mc Combie H and Boudry P (2009) Reproductive effort in *Crassostrea gigas*: comparison of 5-month-old diploid and triploid oysters issued from natural crosses or chemical induction. Aqua Biol 7, 229–241.

Nell JA, Perkins B (2005) Studies on triploid oysters in Australia: farming potential of all-triploid Pacific oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg), in Port Stephens, New South Wales, Australia. Aquac Res 36:530–536

Robert, R. J.L. Sanchez, L. Perez-Paralle, E. Ponis, P. Kamermans, M. O'Mahoney (2012) A glimpse of the mollusc industry in Europe. Aquaculture Europe 38: 5-11.

Stanley, J. G., H. Hidu and S. K. Allen, Jr. 1984. Growth of American oysters increased by polyploidy induced by blocking meiosis I but not meiosis II. Aquaculture 37: 147-155.

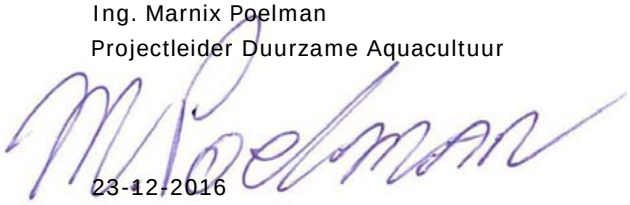
Verantwoording

Rapport C130/16
Projectnummer: 4303107601

Dit rapport is met grote zorgvuldigheid tot stand gekomen. De wetenschappelijke kwaliteit is intern getoetst door een collega-onderzoeker en het verantwoordelijk lid van het managementteam van Wageningen Marine Research

Akkoord: Ing. Marnix Poelman
Projectleider Duurzame Aquacultuur

Handtekening:



Datum: 23-12-2016

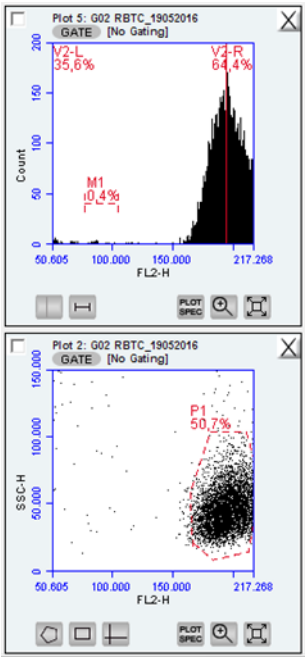
Akkoord: Drs. J. Asjes
MT lid Integratie

Handtekening:

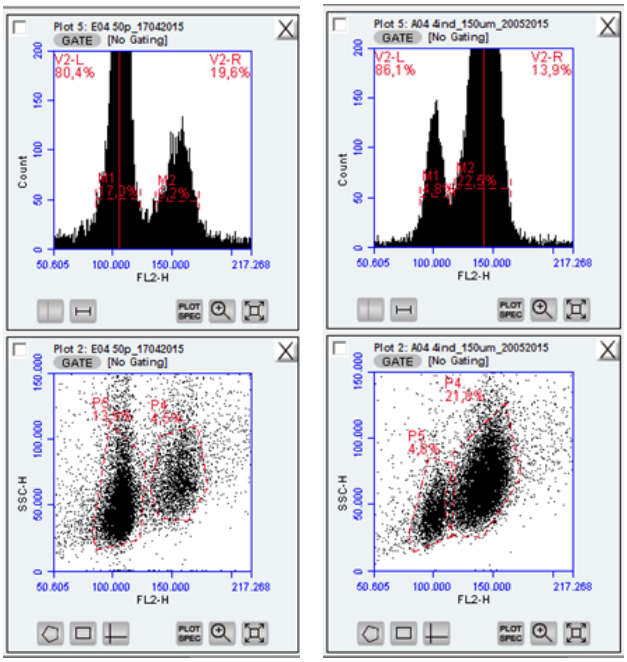
Datum: 23-12-2016

Bijlage 1 Resultaten flowcytometer

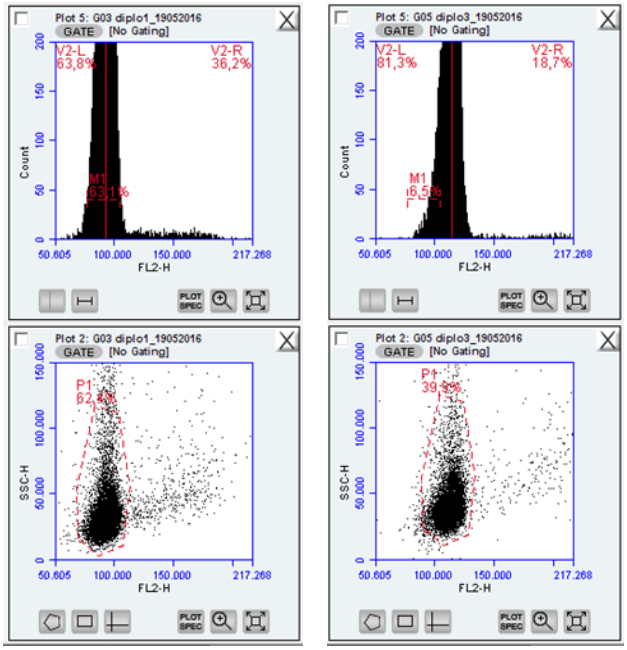
De volgende grafieken (1,2,3 en 4) laten de resultaten van de flowcytometer (BD Accuri C6) zien voor de standaard Red Trout Blood Cells (RTBC), diploïden en triploïden. De locatie van de piek in het bovenste plaatje van iedere grafiek geeft de dichtheid aan. Dit is een maat voor het gewicht, waarbij diploïden lichter zijn dan triploïden. Voor de larven monsters zijn 50000 events geanalyseerd en in het geval van de broedjes zijn 20000 events geanalyseerd. het fluorescent signaal van deze events wordt door een optische filter FL2-H (585/40 nm) gemeten. Dit filter geeft de blauwe laser geëxciteerde emissie aan.



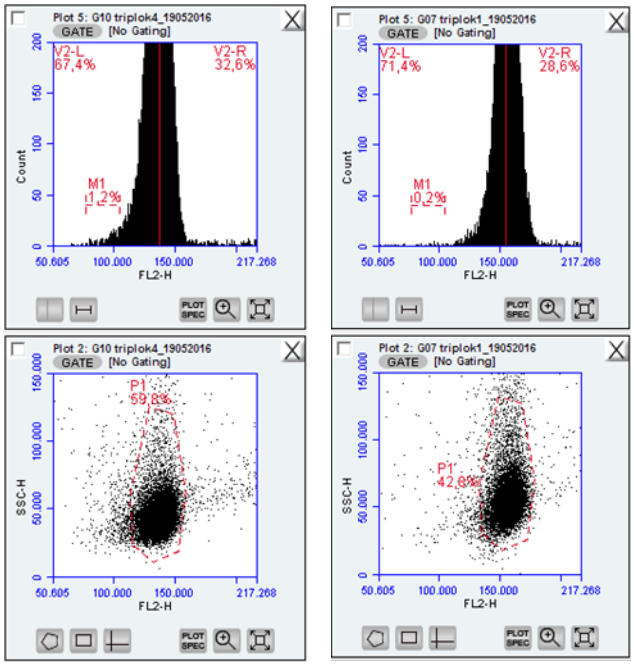
Grafiek 1: *Piek gegeven door de standaard Red Trout Blood Cells (RTBC). Het onderste deel van de grafiek laat de verdeling zien van alle events die langs de optische filter zijn gegaan.*



Grafiek 2: *Diploide en triploide pieken van twee larven monsters die behandeld zijn met 6-DMAP. Het linker plaatje, gemeten op 17 april 2015, laat een hoger percentage diploïdes zien (74%) in de larven populatie. Het aantal triploïden op het rechter plaatje, gemeten op 20 mei 2015, was 82%. Het onderste deel van de grafiek laat de verdeling zien van alle 50000 events die langs de optische filter zijn gegaan.*



Grafiek 3: *Diploide pieken van oester broedjes gemeten op 19 mei 2016. Als de cellen aan het delen zijn, kan de piek naar rechts verschuiven, wat te zien is aan de rechter kant van de grafiek. Het onderste deel van de grafiek laat de verdeling zien van alle 20000 events die langs de optische filter zijn gegaan.*



Grafiek 4: *Triploïdie pieken van oester broedjes gemeten op 19 mei 2016. Als de cellen aan het delen zijn, kan de piek naar rechts verschuiven, wat te zien is aan de rechter kant van de grafiek. Het onderste deel van de grafiek laat de distributie zien van alle 20000 events die langs de optische filter zijn gegaan.*

Bijlage 2 Triploïdie inductie protocol

i) All steps should be carried out at 25ºC.
ii) Eggs and spermatozoa are obtained by stripping. Eggs are suspended in a 5-litre jar. Eggs must be kept in suspension by the regular application of a gentle rise and fall of a plunger in the cylinder.
iii) The start time for induction of triploidy begins the moment the spermatozoa are added to the eggs.
iv) As soon as it is known that there are the desired number of eggs for a triploidy induction trial, it is necessary to prepare a suitable solution of 6-DMAP.
v) The required concentration of 6-DMAP is 450 µM (micro-molar).
The molecular wt of 6-DMAP: 163.18
163.18 g l -1 = Molar
0.16318 g l -1 = milli-Molar (mM)
0.16318 x 0.45 = 0.0734g l -1 = 4500 µM
Use: 73.4 mg 6-DMAP per litre of filtered seawater to give a 450 µM solution.

vi) Prepare a treatment vessel containing a 450 µM 6-DMAP solution and an identical vessel containing filtered seawater.
vii) Activate the suspension of eggs in a 30 µm sieve by adding spermatozoa (the sieve must remain under water). Using a sample under the microscope, ensure that there are sufficient spermatozoa per egg (> 20).
viii) Eggs and sperm are left 20 seconds for fertilization. After this period, sperm is well rinsed off the sieve.
ix) Fertilized eggs are placed in a 5 L jar.
x) 15 min after fertilization transfer sieve to 6-DMAP treatment vessel for 20 minutes (50% of eggs should have visible 1st polar bodies. Visual evidence of any 2nd polar bodies before transfer indicates that the optimum start of the treatment window may have been missed).
xi) 20 min after starting the treatment remove from the treatment, gently rinse the developing eggs and wash them into clean vessels. Add filtered seawater to give a depth of 10-15cm.
xii) Leave developing eggs / embryos at 25 oC for 48 hours before handling resultant early veliger larvae. Putative triploid larvae are reared in the same way as ordinary diploid larvae.

Wageningen Marine Research
T: +31 (0)317 48 09 00
E: marine-research@wur.nl
www.wur.nl/marine-research

Visitors address
- Ankerpark 27, 1781 AG Den Helder
- Korringaweg 5, 4401 NT Yerseke
- Haringkade 1, 1976 CP IJmuiden

Wageningen Marine Research is the Netherlands research institute established to provide the scientific support that is essential for developing policies and innovation in respect of the marine environment, fishery activities, aquaculture and the maritime sector.

Wageningen University & Research is specialised in the domain of healthy food and living environment.

The Wageningen Marine Research vision:
'To explore the potential of marine nature to improve the quality of life.'

The Wageningen Marine Research mission
- To conduct research with the aim of acquiring knowledge and offering advice on the sustainable management and use of marine and coastal areas.
- Wageningen Marine Research is an independent, leading scientific research institute.

Wageningen Marine Research is part of the international knowledge organisation Wageningen UR (University & Research centre). Within Wageningen UR, nine specialised research institutes of Stichting Wageningen Research (a Foundation) have joined forces with Wageningen University to help answer the most important questions in the domain of healthy food and living environment.