



Proefstation voor Bloemisterij en Glasgroente
Research Station for Floriculture and Glasshouse Vegetables

**ONTWIKKELING VAN EEN EFFECTIEVE METHODE OM
GLASTUINBOUWPRODUCTEN INSECTENVRIJ EN MET
VERBETERDE MILIEU- EN PRODUCTKWALITEIT TE
KUNNEN EXPORTEREN**

Proef 1809

Rapportage fase I

COLOFON

© 1997 Proefstation voor Bloemisterij en Glasgroente

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een automatisch gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier, zonder schriftelijke toestemming van de uitgever.

No part of this book may be reproduced and/or published in any form, photoprint, microfilm or by any other means without written permission from the publisher.

Het Proefstation voor Bloemisterij en Glasgroente stelt zich niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij het gebruik van de gegevens in deze uitgave.

Proefstation voor Bloemisterij en Glasgroente
Vestiging Aalsmeer
Linnaeuslaan 2a, 1431 JV Aalsmeer
Tel 0297-352525, fax 0297-352270

**ONTWIKKELING VAN EEN EFFECTIEVE METHODE OM
GLASTUINBOUWPRODUCTEN INSECTENVRIJ EN MET
VERBETERDE MILIEU- EN PRODUCTKWALITEIT TE
KUNNEN EXPORTEREN**

Proef 1809

Ir. A. de Gelder, PBG
Dr. M.G. Wijkamp, PBG
Dr. E.J. Smid, ATO-DLO

Aalsmeer, december 1997



2245036

INHOUD

VOORWOORD	7
SAMENVATTING	8
1. INLEIDING	9
2. INVENTARISATIE FYSISCH EN FYSISCH/CHEMISCHE METHODEN	10
2.1 Algemene introductie	10
2.2 Status van methylbromide	11
2.3 Toepassing van methylbromide bij de export van snijbloemen	12
2.4 Alternatieven voor desinfestering	14
2.4.1 Andere begassingsmiddelen	14
2.4.2 Aerosolen	23
2.4.3 Insecticide dips	24
2.4.4 Alternatieve insecticide-behandelingen	25
2.4.5 Bestraling	25
2.4.6 Temperatuurbehandelingen	26
2.4.7 "Controlled atmospheres"	27
2.4.8 Etherische oliën met insecticide-activiteit	31
2.4.9 Andere methoden	31
2.4.10 Combinaties	33
2.5 CA/MA bewaaronderzoek aan snijbloemen	40
2.5.1 Overzichtsartikelen	40
2.5.2 CA-bewaring en Botrytis	41
2.5.3 CA bewaring en ethyleen	41
2.6 Onderzoek naar desinfestering van bloemen en planten in de laatste jaren	41
2.7 Literatuur	43
3. INVENTARISATIE ETHERISCHE OLIËN	56
3.1 Primaire selectie etherische oliën met insecticide-werking	56
3.2 Selectie op wittevlug	57
3.3 Insecticide-werking etherische oliën op tripslarven en adulten	59
3.4 Insecticide-werking etherische oliën op aardappeltopluis	60
3.5 Effect van mengsels van linalool en carvon op trips	61
3.6 Fytotoxiciteit etherische oliën	63
3.6.1 Effecten van insectide-oliën op roos	65
3.6.2 Absorptie van linalool door roos, chrysant en lelie	68
3.6.3 Effecten van insectide-oliën op chrysant en lelie	68
3.7 Toxicologisch dossier linalool	69
3.8 Fytotoxiciteit bij tomaten en paprika	69
3.9 Motivering fase i selectie etherische oliën	69
3.10 Literatuur	70

4.	GECOMBINEERD EFFECT VAN ETHERISCHE OLIËN EN CA-CONDITIES	71
4.1	Inleiding	71
4.2	Materiaal en methoden	72
4.2.1	Pilot experimenten	72
4.2.2	Experimentele opstelling	73
4.3	Resultaten en discussie	74
4.3.1	Experiment A: Gecombineerd effect van linalool en CA op adulten van de Californische trips <i>F. occidentalis</i> .	74
4.3.2	Experiment B: Gecombineerd effect van linalool en CA op adulten van de Californische trips <i>F. occidentalis</i> .	75
4.3.3	Experiment C: Gecombineerd effect van cymeen en CA op adulten van de Californische trips <i>F. occidentalis</i> .	77
4.4	Conclusie	78
4.5	Literatuur	78
5.	AANBEVELING VOOR TWEEDE FASE	79
	APPENDIX A. Toxicologisch dossier <i>linalool</i>	80
	APPENDIX B. Fytotoxiciteit bij tomaten en paprika, pilot experiment	85

VOORWOORD

Het project "Ontwikkeling van een effectieve methode om glastuinbouwproducten insectenvrij en met verbeterde milieu- en productkwaliteit te kunnen exporteren" heeft een lange ontstaansgeschiedenis. Nadat in 1994 een eerste projectvoorstel was ingediend in het kader van de Bijdrageregeling "Kwaliteitsprojecten Agrarische producten en productieprocessen" kon uiteindelijk in augustus 1996 in samenwerking met ATO-DLO met de uitvoering worden gestart.

Het ATO-DLO werk richtte zich, onder leiding van E. Smid, op de mogelijkheden van de "green-chemicals".

Het PBG werkte op basis van literatuur aan de inventarisatie van alternatieven voor het gebruik van methylbromide en de achtergronden van de insecticide-werking hiervan. Op het PBG kwam de personele invulling hiervoor pas in februari 1997 op volle sterkte door de aanstelling van I. Wijkamp. De volledige bezetting duurde slechts kort, omdat de projectleider R. van Gorsel, een andere betrekking aanvaardde. Zijn taak is overgenomen door A. de Gelder.

In de eerste maanden leverde het PBG een bijdrage aan de door LEI-DLO gemaakte beschrijving van het huidige gebruik van methylbromide voor de export van sierteeltproducten.

Het PBG-deel is, door de inbreng van de begeleidingscommissie, in de laatste maanden gericht op het testen van het effect van "controlled atmosphere" (CA) condities op de gekozen plaaginsecten. Dit is gedaan in samenwerking met ATO-DLO, waarbij in de laatste experimenten de meest belovende "green chemicals" zijn gecombineerd met CA-condities. De resultaten geven perspectief op een bruikbaar alternatief.

Het werk, dat in de beginperiode, is gedaan in samenwerking met de Katholieke Universiteit Nijmegen, is in dit verslag niet verwerkt.

De goede samenwerking van alle betrokkenen in de laatste maanden van ATO-DLO en PBG heeft in een korte periode geleid tot een bevredigende afronding van de eerste fase van het project.

Dr. L.C. Davidse
PBG, programmaleider

SAMENVATTING

Voor een gegarandeerd insecten-vrije export van glastuinbouwproducten wordt in Nederland, indien noodzakelijk, gebruikt gemaakt van begassing met methylbromide. Binnen een aantal jaren mag deze stof niet meer worden toegepast (Protocol van Montreal). Dit project is gericht op het vinden van milieuvriendelijke alternatieven.

Om het belang van alternatieven voor methylbromide te kunnen beoordelen heeft het LEI-DLO een beschrijving gemaakt van de bedrijfseconomische aspecten van insecten-vrije export van snijbloemen. Hieruit blijkt dat exporteurs de grootste kosten maken voor insecten-vrije export. Insecten-vrije teelt is een concurrerend alternatief voor een naogst-behandeling.

Alternatieven voor desinfestering zijn in de literatuur vooral beschreven voor producten, die langere tijd bewaard kunnen worden. Dit rapport bevat een uitvoerige beschrijving van de literatuur over dit onderwerp (hoofdstuk 2.4). Combinatie van behandelingen blijkt weinig onderzocht te zijn, maar biedt wel de meeste perspectieven.

Het experimentele onderzoek heeft zich geconcentreerd op de mogelijkheden van "controlled atmosphere" (CA) condities in combinatie met etherische oliën. Eerst is onderzocht welke etherische oliën voor combinatie met CA-condities in aanmerking kwamen. Linalool en *p*-cymeen bleken hierbij niet of weinig fytotoxisch, terwijl ze wel toxisch zijn voor trips, *Frankliniella occidentalis*, respectievelijk aardappeltopluis, *Macrosiphum euphorbiae*. Aangepaste luchtsamenstelling - hoge CO₂-concentratie en lage O₂-concentratie - in combinatie met linalool of *p*-cymeen blijkt een verhoogde mortaliteit te geven. Voor vervolgonderzoek blijkt voldoende perspectief aanwezig.

1. INLEIDING

Voor een gegarandeerd insecten-vrije export van glastuinbouwproducten wordt in Nederland, indien noodzakelijk, gebruikt gemaakt van begassing met methylbromide. Binnen een aantal jaren mag deze stof niet meer worden toegepast (Protocol van Montreal). Dit project is gericht op het vinden van milieuvriendelijke alternatieven.

Hierbij wordt vooral gedacht aan toepassing van een gewijzigde luchtsamenstelling (CA = "controlled atmosphere") en/of etherische oliën.

In de opzet is voorzien in een rapportage na één jaar, waarin de resultaten van een inventarisatie van alternatieven wordt gegeven, uitmondend in een gemotiveerde keuze voor het werkplan voor de tweede helft van het project.

De doelstellingen voor de eerste fase kunnen als volgt worden samengevat:

- a) Inventarisatie van nieuwe methoden om glastuinbouwproducten insectenvrij te kunnen exporteren, waaronder de mogelijkheid van toepassing van fysische en fysisch-chemische methoden en van etherische oliën
- b) Het screenen van de effecten van etherische oliën op insecten en een aantal glastuinbouwproducten.
- c) Een beschrijving van vervolgonderzoek voor de meest perspectief biedende methoden.

Het onderzoek concentreert zich op siergewassen. Voor deze producten is de duur van de afzetketen, waarbinnen een behandeling moet worden uitgevoerd, kort. Een alternatief zal in een korte behandelingsduur effectief moeten zijn. Voor voedselgewassen is de duur van de behandeling minder kritisch. Een alternatieve behandeling kan, vanuit dit aspect gezien, toepassing vinden bij voedselgewassen.

2. INVENTARISATIE FYSISCHE EN FYSISCH/CHEMISCHE METHODEN

2.1 ALGEMENE INTRODUCTIE

Behandelingen na de oogst worden toegepast om een breed scala van producten te ontdoen van insecten. Bij deze desinfestering kan men denken aan de bestrijding van quarantaine insecten, die niet in het land van export voorkomen, maar ook kan het importerende land een nultolerantie ingesteld hebben voor alle levende insecten. Een aantal landen zoals Japan en de Verenigde Staten hebben strenge regels ingesteld om de verspreiding van insectenplagen bij im- en export tegen te gaan.

Bij de desinfestering van bloemen en planten voor export, zijn veel verschillende benaderingen toegepast om een effectieve insectenbestrijding te ontwikkelen (Seaton en Joyce, 1988; Seaton *et al.*, 1989; Hansen en Hara, 1994; Hara, 1994). Begassing met methylbromide is tot heden de meest toegepaste ontsmettingsmethode en wordt in veel landen algemeen gebruikt als een standaard quarantainebehandeling. Bij de export van snijbloemen in ondermeer de Verenigde Staten worden naast begassing met methylbromide ook chemische dips en verwijdering van insecten met de hand toegepast als quarantainebehandeling (Hara, 1994). In Nederland vindt begassing van bloemen en planten plaats in een permanente faciliteit die gestationeerd is bij de bloemenveiling Aalsmeer. Hier worden producten voor export, voornamelijk snijbloemen naar Japan, gedurende twee uur begast met een combinatie van methylbromide en dichloorvos, met als gevolg dat alle insecten die op deze gewassen voorkomen snel en effectief bestreden worden. De emissie van methylbromide naar de atmosfeer wordt voor bijna 100% beperkt doordat methylbromide wordt teruggevangen met behulp van koolstoffilters (Klijnstra, 1996).

In het Montreal Protocol is methylbromide op de lijst van middelen geplaatst die de ozonlaag aantasten, en om deze reden zal het gebruik geleidelijk verboden worden. Een wereldwijd totaalverbod op gebruik en productie van methylbromide zal ingaan in het jaar 2010 (UNEP., 1995), maar in Nederland zal reeds in 2002 een verbod gelden. Door het komende verbod op het gebruik van methylbromide wordt er de laatste jaren veel nadruk gelegd op het vinden van alternatieve bestrijdingsmethoden, bij voorkeur middelen die veiliger zijn voor het milieu. De huidige status van methylbromide-gebruik met de voor- en nadelen en alternatieve behandelingsmethoden, waaronder de desinfestering van bloemen en planten, worden besproken in een aantal recent uitgekomen reviewartikelen (Hansen en Hara, 1994; Hara, 1994; Paull en Armstrong, 1994; Taylor 1994). Een conclusie die uit deze literatuur naar voren komt is dat er momenteel geen middel beschikbaar is dat de vele toepassingen van methylbromide kan vervangen en dat daarom gekeken moet worden naar afzonderlijke gevallen zoals bijvoorbeeld de desinfestering van bloemen en planten. Alternatieve behandelingsmethoden die in specifieke gevallen reeds worden toegepast of zich in een experimentele fase bevinden kunnen worden samengevat in een aantal categorieën die zijn weergegeven in Tabel 2.1. De mogelijkheden van het toepassen van deze behandelingen voor desinfestering van bloemen en planten zal per categorie uitgebreider besproken worden.

Dit hoofdstuk beschrijft achtereenvolgens de status van het gebruik van methylbromide, de omvang van de huidige toepassing bij de export van sierteeltproducten en onderzoek naar alternatieven bij uiteenlopende producten. Het sluit af met een overzicht van onderzoek naar CA-bewaring van snijbloemen en de mogelijk toepassing hiervan bij een desinfecteringsbehandeling.

Tabel 2.1 Alternatieve behandelingen ter vervanging van methylbromide bij de desinfectering van bloemen en planten

1	andere begassingsmiddelen dan methylbromide
2	aerosolen
3	insecticide dips, met of zonder toevoeging van zepen
4	alternatieve insecticide-behandelingen (bijv. geïmpregneerd verpakkingsmateriaal)
5	bestraling (gammastraling of bètastraling)
6	temperatuurbehandelingen (koude- en warmtebehandelingen, stoom ("vapor heat") of onderdompeling van het product in warm water)
7	"controlled atmospheres" (CA: hoge CO ₂ - of lage O ₂ -concentraties of combinaties van deze twee)
8	etherische oliën die insecticide-activiteit bezitten
9	andere methoden (waaronder het verwijderen van insecten met de hand of door middel van uitschudden, het wassen van planten en het gebruik van "microwave")
10	combinaties van methoden (bijv. CA in combinatie met verhoogde temperatuur of een begassingsmiddel)

2.2 STATUS VAN METHYLBROMIDE

Methylbromide is momenteel het meest toegepaste begassingsmiddel bij de desinfectering van een breed scala aan producten, waaronder hout, zaden, fruit (Harvey *et al.*, 1989), groenten, bloemen en plantmateriaal (MacDonald en Chakrabarti, 1993). Het grootste gebruik van methylbromide in volume vindt plaats als grondontsmettingsmiddel bij de bestrijding van insecten, nematoden, onkruiden en bodempathogenen zoals schimmels, virussen en bacteriën. In Nederland is het gebruik van methylbromide beperkt tot quarantainebehandelingen en begassing van duurzame goederen en opslagruimtes. Sinds 1992 is het gebruik van methylbromide als grondontsmettingsmiddel in Nederland verboden (Klijnstra, 1996).

Bij de bestrijding van insecten in bloemen en planten geniet methylbromide de voorkeur door de brede werking op een groot scala aan insecten. Bovendien is als gevolg van de relatief snelle werking van methylbromide desinfectering mogelijk binnen enkele uren, wat noodzakelijk is bij de behandeling van bloemen en planten (Wit en Van de Vrie, 1985b). In Engeland wordt begassing met methylbromide toegepast als een standaard bestrijdingsmethode van een aantal quarantaine-insecten. Deze methode bestaat uit een begassing gedurende vier uur met 13,5 mg/l methylbromide en geeft een goede bestrijding van veel voorkomende insecten in bloemen zoals trips (Macdonald, 1993), mineerders (Mortimer en Powell, 1988;

Macdonald en Mitchell, 1996) en tabakswittevlieg (Macdonald en Cheek, 1994). In Nederland heeft onderzoek uitgewezen dat een behandeling van snijbloemen met 30 g/m³ methylbromide gedurende 1,5 uur bij een temperatuur van 17-19 °C een goede bestrijding geeft van trips, kaswittevlieg, eieren van spintmijt, en eieren en larven van lepidopteren, alhoewel er soms mindere goede bestrijding optreedt van bladluizen en adulte mijten (Wit en Van de Vrie, 1985b).

Naast de reeds genoemde voordelen heeft methylbromide ook als eigenschap dat de penetratie van het middel erg goed is en dat het om deze reden ook gebruikt kan worden voor de behandeling van verpakte producten. De fytotoxiciteit is in de meeste bloemen en planten laag, alhoewel in enkele gevallen bekend is dat het gebruik van methylbromide schade kan veroorzaken die zich uit in gereduceerd vaasleven, schade aan bladeren en bloemen, het niet of gedeeltelijk opengaan van bloemen, en verwelking van de stengel (Wit en Van de Vrie, 1985b). Als voorbeeld kan genoemd worden de fytotoxiciteit bij poinsettia (Macdonald en Cheek, 1994) en bij snijbloemen zoals Alstroemeria, chrysantheem, en anjers die afhankelijk is van de getoetste cultivar (Wit en Van de Vrie, 1985b). Bovendien neemt de schade in het algemeen toe wanneer de temperatuur tijdens behandeling verhoogd wordt van 17 naar 23 °C (Wit en Van de Vrie, 1985b). De enige residuen die achterblijven na een behandeling met methylbromide zijn onschadelijke anorganische bromide-zouten (Harvey *et al.*, 1989).

Het werkingsmechanisme van methylbromide op het insect is breed, het grijpt waarschijnlijk aan op verschillende metabolische processen (Alexeef en Kilgore, 1983). In insecten veroorzaakt methylbromide een geleidelijk toenemende remming van de ademhaling wanneer een lethale dosis geabsorbeerd wordt (Bond, 1956). Hierdoor onderscheidt methylbromide zich van de meeste andere insecticiden die vaak op een specifieke targetsite aangrijpen, waardoor een insect resistentie kan opbouwen tegen deze middelen. Waarschijnlijk mede door het brede werkingsmechanisme is significante resistentie tegen methylbromide nog niet gevonden (Macdonald en Chakrabarti, 1993).

2.3 TOEPASSING VAN METHYLBROMIDE BIJ DE EXPORT VAN SNIJBLOEMEN

Van 1983 tot 1985 is op het Proefstation voor de Bloemisterij onderzoek gedaan naar de begassing van snijbloemen met methylbromide (Wit en Van de Vrie, 1985b). Een groot aantal gewassen is bij verschillende temperaturen getoetst op schade. Bij de voor de praktijk geadviseerde behandeling, 30 g/m³ methylbromide + 0,3 g/m³ Dedevap gedurende 1,5 uur bij 18-19 °C vertoonde 75% van de soorten geen schade (Wit en Van de Vrie, 1986). Hogere temperaturen of hogere dosis leidde tot een aanzienlijke toename van de schade.

Voor het in kaart brengen van de economische en logistieke voor- of nadelen van een alternatief voor begassing is een beschrijving gemaakt van de huidige handelwijzen (Ploeger, 1997). De wijze van begassing blijkt overeen te komen met het praktijkadvies uit 1985. Uit de economische evaluatie blijkt dat exporteurs extra kosten maken om producten, vooral rozen, insectenvrij te kunnen versturen. Begassing met methylbromide is daarbij de duurste methode met een kostprijsverhogend effect van ruim 5 cent per steel ten opzichte van producten die insectenvrij zijn ingekocht. Voor 7,5 miljoen stelen is dit een extra kosten post van

f/ 375.000,- waarvan f/ 225.000,- kosten voor de begassing. De overige kosten worden gemaakt voor extra arbeid en opslagcapaciteit.

De inkoopprijs van een insectenvrij geteeld product ligt zo'n 5 cent boven die van een niet-insectenvrij geteeld product. Hierdoor zijn de kosten per steel na begassing dan wel insectenvrij ingekocht, op gelijk niveau. De keuze van handelwijze is daardoor mede afhankelijk van beschikbaarheid van insectenvrij geteeld product en de kwaliteit.

Naast de hoofdproducten, roos en chrysant, blijken Ornithogalum en anjer een belangrijk aandeel in te begassen producten te hebben. Verder wordt een breed pakket aan producten, meer dan 80 soorten, met deze methode geschikt gemaakt voor insectenvrije export.

Tijdens de begassing wordt het product twee uur bij een temperatuur van 20°C geplaatst. Dit is een nadelige factor, omdat constant gekoeld bewaren beter is voor het product. Een verhoogde temperatuur, die ook al bij het gereed maken voor begassing en daarna opnieuw verpakken optreedt, zal leiden tot een versnelde ontwikkeling van bloemen. De extra handeling van gedeeltelijk uitpakken en opnieuw verpakken kan leiden tot mechanische beschadigingen.

Bij wisseling van temperatuur mag normaal verwacht worden dat bloemen meer door *Botrytis cinerea* kunnen worden aangetast. Dit hoeft echter niet het geval te zijn, want mogelijk is de kieming van deze schimmel door de behandeling met methylbromide geremd (§ 2.5.2).

Uit de inventarisatie van Ploeger kan afgeleid worden dat een alternatief voor begassing tenminste aan de volgende voorwaarden moet voldoen.

- * het is een toepassing voor exporteurs. Zij maken de grootste kosten, specifiek door begassing, voor insectenvrije export. Insectenvrij inkopen is bedrijfseconomisch een concurrerend alternatief.
- * het zal in de afzetfase als het product al ingekocht is door de exporteur worden uitgevoerd, een lage temperatuur is daarbij gunstig.
- * het is voor een groot aantal producten toepasbaar. De toegepaste condities zoals etherische oliën en CA/MA moeten algemeen toepasbaar zijn. Een uitzondering is mogelijk het gewas roos.
- * de opstelling moet het mogelijk maken om een goede procescontrole tegen acceptabele kosten uit te voeren. Hoge kosten voor procescontrole maken een alternatief snel onrendabel.

Verder leert dit onderzoek dat mechanische verwijdering (trillen, uitschudden) een in de praktijk toegepast milieuvriendelijk alternatief is dat echter niet te allen tijde en voor alle product/insect-combinaties afdoende is, maar bij de mogelijke alternatieven wel een rol kan spelen. Deze methode is geen garantie voor een insectenvrij product, maar voldoet aan de inspectie-eisen.

2.4 ALTERNATIEVEN VOOR DESINFESTERING

2.4.1 Andere begassingsmiddelen

Algemeen

Momenteel worden wereldwijd slechts twee middelen, te weten methylbromide en fosforwaterstof, regelmatig gebruikt bij de desinfestering van producten (Taylor, 1994). De fysische en chemische eigenschappen en de toepassing van een aantal begassingsmiddelen die in het verleden gebruikt zijn of nog steeds toegepast worden zijn samengevat in een publicatie van Monro (1969). Daarnaast worden er in recentere literatuur verscheidene begassingsmiddelen genoemd als vervanger voor methylbromide. Deze middelen worden meestal op experimentele schaal bij specifieke combinaties van plaaginsect en product getoetst, zoals bijvoorbeeld aceetaldehyde, aceton, arsine, stibine, blauwzuurgas, carbonylsulfide, dichloorvos, ethylformaat, methylisothiocyanaat, methylfosforwaterstof, silane, methylsilane, sulfuryl fluoride, zwaveldioxide en combinaties van begassingsmiddelen.

Begassingsmiddelen zijn gassen of zeer vluchtige vloeistoffen die bij een normale omgevingstemperatuur in gasvorm bestaan. Door deze eigenschap wordt algemeen aangenomen dat ze de insecten binnendringen via het ademhalingsapparaat (Bond, 1961). De opname van een gas is daarom in het algemeen evenredig aan de ademhaling van een insect. Factoren die de ademhalingsactiviteit of metabolisme van het insect doen toenemen, zoals bijvoorbeeld een verhoogde temperatuur, zullen ook een toename veroorzaken in de opname en toxiciteit van een begassingsmiddel (Hole *et al.*, 1976; Chaudhry, 1997). In het algemeen verschilt de gevoeligheid van verschillende levensstadia van insecten voor een begassingsmiddel, waarbij eieren en poppen meestal de minst gevoelige stadia zijn (Hole *et al.*, 1976; Bell, 1976a en b; McDonald, 1993; Pike, 1994).

Bij het vaststellen van de dosis van het gas waarbij een bepaalde mortaliteit optreedt, bijvoorbeeld de LD_{50} of LD_{99} , is de hoeveelheid gas die beschikbaar is voor de insecticide-werking van belang en de tijdsduur van de begassing. De dosis wordt vaak uitgedrukt als het product van de concentratie (C) en de tijdsduur (t) van blootstelling aan het gas, het Ct -product. De Ct wordt vaak uitgedrukt in mg hr/l en moet worden uitgewerkt voor elke specifieke set van condities. Een benodigde dosering kan bereikt worden door of C of t te variëren. Binnen bepaalde grenzen is Ct in bijna alle gevallen een constante.

Inzicht in het werkingsmechanisme van een begassingsmiddel zoals bijvoorbeeld fosforwaterstof, kan waardevolle informatie leveren wat betreft de werking van andere begassingsmiddelen waarover minder informatie beschikbaar is, zoals bijvoorbeeld etherische oliën. Daarom is bij de behandeling van begassingsmiddelen, in het bijzonder van fosforwaterstof, aandacht geschonken aan het werkingsmechanisme. Andere factoren die een rol spelen bij de effectiviteit van een begassingsmiddel zijn de belading ("load size") van het te begassen compartiment en absorptie van het middel door het product. Het belang van belading werd aangetoond in experimenten met de Californische trips, *Frankliniella occidentalis*. Een behandeling met aceetaldehyde onder vacuüm bij een belading van 22% veroorzaakte 100% mortaliteit, terwijl bij een belading van 35% geen volledige sterfte werd bereikt (Aharoni *et al.*, 1979b; 1980). Waarschijnlijk zorgt een vollere belading voor meer absorptie van het middel aan het gewas, waardoor er minder middel beschikbaar is om insecten te doden. Deze aanname werd

ondersteund door experimenten waarbij bladluizen begast werden met aceetaldehyde in aan- of afwezigheid van sla. Wanneer sla aanwezig was in de begassingsruimte, daalde de concentratie van het aceetaldehyde sterk en was een langere behandelingstijd met een hogere concentratie noodzakelijk om hetzelfde resultaat te verkrijgen dan wanneer geen sla aanwezig was (Aharoni *et al.*, 1979a).

Fosforwaterstof

Fosforwaterstof wordt wereldwijd reeds meer dan 40 jaar gebruikt bij de desinfectering van granen, dierlijke voedergewassen en andere producten en wordt daarnaast ook ingezet als ontsmettingsmiddel voor structuren zoals graansilo's en opslagruimten (Hara, 1994; Chaudhry, 1997). Bij de desinfectering van fruit met fosforwaterstof is bekend dat de kwaliteit van vruchten negatief beïnvloed kan worden (Seo *et al.*, 1979; Soderstrom *et al.*, 1991). Naast de hoge toxiciteit voor insecten is fosforwaterstof ook toxisch voor non-target soorten maar een voordeel is dat na begassing weinig residuen achterblijven (Bond, 1969; Bond, 1990). Een eigenschap van fosforwaterstof is dat het relatief effectiever werkt bij lagere concentraties gedurende een langere behandelingstijd dan bij hogere concentraties gedurende een korte behandelingstijd. Dit komt tot uitdrukking in het *Ct*-product; de relatie tussen dosering en resulterende toxiciteit voor insecten is niet lineair, in tegenstelling tot andere begassingsmiddelen (Hole *et al.*, 1976; Rajendran en Muthu, 1989; Karunaratne *et al.*, 1997), wat een nadeel kan zijn in gevallen wanneer een snelle werking vereist is.

De mogelijkheid om fosforwaterstof te gebruiken als alternatief voor methylbromide bij de desinfectering van bloemen en planten is in een aantal publicaties onderzocht (Wang en Lin, 1984a; Karunaratne *et al.*, 1997). De effectiviteit van verschillende behandelingen werd getoetst op insecten die algemeen voorkomen in snijbloemen. De kastrips *Heliothrips haemorrhoidalis*, de groene perzikluis *Myzus persicae* en de appelmot *Epiphyas postvittana*, werden effectief bestreden in een twee tot zes uur durende behandeling met fosforwaterstof (20-2500 $\mu\text{l/l}$) in combinatie met een "controlled atmosphere" (CA) van stikstof met of zonder 33% CO_2 bij 24 °C (Karunaratne *et al.*, 1997). Een Taiwanese studie vergeleek ondermeer de effectiviteit van begassing met fosforwaterstof al dan niet in combinatie met andere begassingsmiddelen (Wang en Lin, 1984a). Een combinatie van deltamethrin gedurende één uur gevolgd door begassing met fosforwaterstof gedurende vijf uur gaf een volledige bestrijding van alle toetsinsecten. Deze behandeling veroorzaakte geen fytotoxiciteit bij chrysant. Deze voorbeelden tonen aan dat een behandeling met fosforwaterstof in combinatie met bijvoorbeeld CA, is te optimaliseren voor de desinfectatie van snijbloemen en planten.

- Werkingsmechanisme van fosforwaterstof -

Er is veel onderzoek gedaan naar het werkingsmechanisme van fosforwaterstof op insecten en een samenvatting van de literatuur over dit onderwerp wordt gegeven door Chaudhry (1997). Fosforwaterstof wordt voornamelijk opgenomen door de stigmata, en factoren die de ademhalingsactiviteit van een insect stimuleren zorgen mede voor een verhoogde opname en toxiciteit van fosforwaterstof. Hoge CO_2 -concentraties zouden de opname van fosforwaterstof stimuleren, doordat stigmata onder invloed van een hoog CO_2 -gehalte vaker of langer geopend worden (Bond en Monro, 1967; Kashi en Bond, 1975). Bij hogere temperaturen neemt de toxiciteit

van fosforwaterstof voor insecten ook toe (Bond en Buckland, 1978). Het verhogen van de temperatuur heeft tot gevolg dat de metabole activiteit en daarmee de opname van zuurstof verhoogd wordt, waardoor de opname van fosforwaterstof gestimuleerd wordt.

De adsorptie van fosforwaterstof per insectensoort kan verschillen (Bond *et al.*, 1969), wat van invloed is op de toxiciteit van fosforwaterstof voor verschillende soorten insecten (Karunaratne *et al.*, 1997). Bovendien verschilt de tolerantie van de verschillende ontwikkelingsstadia van insecten voor fosforwaterstof; vooral eieren en poppen van veel soorten zijn in het algemeen de meest tolerante stadia (Hole *et al.*, 1976; Pike 1994). Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de lagere respiratie van deze stadia vergeleken met volwassen insecten, die een hogere respiratie vertonen (Chaudhry, 1997). Naast opname via de stigmata, moet ook rekening gehouden worden met het feit dat veel stoffen via het integument kunnen worden opgenomen. De rol van de stigmata of het integument bij de opname van fosforwaterstof blijft vooralsnog onbekend. De opname van fosforwaterstof door insecten hangt bovendien niet alleen af van de ademhaling, maar ook van andere factoren zoals diffusie en binding aan componenten van insectenweefsels.

Uit verscheidene publicaties blijkt dat voor de opname en werking van fosforwaterstof zuurstof nodig is. Bij 100% N₂ of 100% CO₂ is fosforwaterstof relatief ineffectief en kunnen insecten hoge doses verdragen (Bond, 1963; Bond en Monro, 1967; Bond *et al.*, 1969; Sato en Suwanai, 1973; Kashi, 1981 a en b). Experimenteel is aangetoond dat fosforwaterstof niet geabsorbeerd wordt door insecten in afwezigheid van zuurstof (Bond *et al.*, 1969) en dat voor de toxische werking van fosforwaterstof minimaal 2% O₂ aanwezig moet zijn, de ondergrens waarbij het insect nog een actief metabolisme vertoont (Kashi, 1981a).

Bij zeer hoge concentraties fosforwaterstof kan het insect in een staat van "beschermde narcose" komen (Bond *et al.*, 1969; Nakakita *et al.*, 1974; Kashi, 1982). Het insect raakt verlamd en de ademhaling wordt gestaakt (Nakakita *et al.*, 1974; Nakakita, 1987) waardoor het insect niet gevoelig is voor de toxische werking van fosforwaterstof. Kashi (1982) geeft als hypothese dat bij hoge concentraties fosforwaterstof de moleculen snel het centraal zenuwstelsel bereiken en het insect verdoven (Nakakita *et al.*, 1974; Kashi, 1981b). Door verlamming van de spieren van de stigmata wordt actieve ademhaling gestopt, waardoor geen O₂ beschikbaar komt die essentieel is voor de toxische werking van fosforwaterstof (Kashi en Bond, 1975).

Als gevolg van een fosforwaterstof-vergiftiging van insecten wordt de ademhaling geremd, wat tot uitdrukking komt in een afname van O₂-consumptie door het insect (Nakakita *et al.*, 1974; Price, 1980a). Verschillende auteurs hebben het effect van fosforwaterstof bestudeerd op mitochondriële ademhaling *in vitro* en *in vivo* waarbij de activiteit van het cytochroom-c oxidase werd bepaald.

Cytochroom-c oxidase is het terminale enzym in de electronentransportketen in mitochondria, die de overdracht van elektronen naar O₂ katalyseert. Dit proces is gekoppeld aan de oxidatieve fosforylering, een energieleverend proces, waarbij ADP wordt omgezet in ATP. De resultaten *in vitro* en *in vivo* zijn echter tegenstrijdig. *In vitro* wordt na een behandeling met fosforwaterstof de activiteit van cytochroom-c oxidase geremd (Chefurka *et al.*, 1976; Kashi en Chefurka, 1976; Nakakita, 1976). Daarentegen werd *in vivo* geen significant effect gevonden op de activiteit van cytochroom oxidase in mitochondria (Price, 1980b; Price en Dance, 1983). *In vivo* werd echter wel een verlaging van ATP-peil gevonden na

blootstelling van insecten aan sublethale doses fosforwaterstof (Price en Walter, 1987).

Naast effecten op het cytochroom oxidase is ook het effect van een fosforwaterstofbehandeling op de activiteit van een aantal andere enzymen onderzocht, zoals bijvoorbeeld van cytochrome P450 (Rajak en Hewlett, 1971), catalase (Bond, 1963; Price *et al.*, 1982; Hobbs en Bond, 1989; Bolter en Chefurka, 1990a) en peroxidase (Bolter en Chefurka, 1990a). In de meeste publicaties kon men een remming van de activiteit van deze enzymen aantonen, maar in enkele gevallen werd geen remming aangetoond *in vitro* (Price en Dance, 1983). Daarnaast werd *in vitro* een verhoging van het peil van waterstofperoxide gevonden (Bolter en Chefurka, 1990b), terwijl *in vivo* superoxide dismutase (SOD)-activiteit (Bolter en Chefurka, 1990a) en het peil van lipid-peroxides was verhoogd na behandeling met sublethale doses fosforwaterstof (Chaudhry, 1991; Chaudhry en Price, 1992). Door een verminderde activiteit van een aantal enzymen kunnen zich waarschijnlijk meer zuurstofradicalen ophopen, wat een rol kan spelen bij de activiteit van fosforwaterstof (Bolter en Chefurka, 1990a). Dit fenomeen verklaart ook waarom O₂ essentieel is bij de werking van fosforwaterstof (Bond, 1963; Bond en Monro, 1967; Kashi, 1981a en b; Hobbs en Bond, 1989) en de waarneming dat er een hogere mortaliteit optreedt wanneer de insecten bij hoge concentratie O₂ worden gehouden aansluitend op een fosforwaterstofbehandeling (Bond, 1963; Hobbs en Bond, 1989).

- Resistentie tegen fosforwaterstof -

In verscheidene insecten die voorkomen in opgeslagen granen is reeds wijdverspreide resistentie tegen fosforwaterstof opgetreden (Champ en Dyte, 1976; Chaudhry, 1997). Vergeleken met niet-resistente stammen, absorberen deze resistente stammen minder fosforwaterstof (Price, 1981, 1984; Price *et al.*, 1982; Price en Dance, 1983; Chaudhry en Price, 1989; 1990b; Chaudhry, 1991; Reichmuth, 1994) en wordt meer fosforwaterstof uitgewisseld met de omgeving (Chaudhry en Price, 1992). Men kon een actieve uitscheiding van fosforwaterstof aantonen bij een resistente stam van de rijstkever *Rhyzopertha dominica*, die toenam naarmate de temperatuur en de CO₂-concentratie toenamen, een proces van "active respiratoir exclusion" (Price, 1984). Het mechanisme van deze "exclusion" is niet bekend. Naast een verminderde opname of actieve uitscheiding van fosforwaterstof in resistente insecten, het belangrijkste resistentiemechanisme, zijn er aanwijzingen dat er een metabolisch detoxificatieproces kan optreden (Robinson en Bond, 1970; Chaudhry en Price, 1989 en 1990b; Chaudhry, 1997), waardoor fosforwaterstof wordt afgebroken in niet-toxische afbraakproducten die in weefsels van insecten gevonden werden na behandeling met fosforwaterstof (Robinson en Bond, 1970).

Aceetaldehyde

Aceetaldehyde-dampen zijn toxisch voor enkele schimmels (Aharoni en Stadelbacher, 1973), bacteriën en gisten, die bederf van groente en fruit veroorzaken (Aharoni *et al.*, 1979a). In de VS mag het middel worden gebruikt als een additief in voedingsmiddelen en staat het geregistreerd als een fungicide voor gebruik bij de behandeling van aardbeien (Aharoni *et al.*, 1979b). Aceetaldehyde is een vluchtige stof die in kleine hoeveelheden geproduceerd wordt door vruchten en het is een intermediair product van de ademhaling in planten. Het laat geen

residuen achter omdat het afgebroken wordt tot ethanol en azijnzuur (Aharoni *et al.*, 1980).

In een aantal publicaties is de toepassing van aceetaldehyde als begassingmiddel voor de bestrijding van insecten gemeld. Het middel is getoetst op eieren en larven van de twee fruitvliegen *Ceratitis capitata* en *Dacus dorsalis* in een groot screeningsexperiment waarbij 108 verschillende stoffen en mengsels werden geëvalueerd voor gebruik als begassingmiddel (Burditt *et al.*, 1963). Ook biedt aceetaldehyde perspectief als begassingmiddel voor de bestrijding van trips en bladluizen op verse producten zoals aardbeien en sla. Begassing van aardbeien met 2% aceetaldehyde gedurende vier uur bij 21 °C gaf 100% bestrijding van de Californische trips *F. occidentalis*. Daarnaast werd aangetoond dat de effectiviteit van het middel verhoogd kan worden door de toepassing in combinatie met een CA met hoog CO₂-gehalte (Aharoni *et al.*, 1979b; Hartsell *et al.*, 1979). Een aceetaldehyde-concentratie van 0,25% veroorzaakte 100% sterfte bij de groene perzikluis *M. persicae* in een twee uur durende behandeling wanneer geen product aanwezig was. Was er echter een product (kropsla) aanwezig tijdens begassing, dan was een hogere concentratie aceetaldehyde en een langere behandelingsduur vereist (2% aceetaldehyde gedurende 3 uur) om 100% mortaliteit te bereiken. In dit geval werd de lagere effectiviteit waarschijnlijk veroorzaakt door de absorptie van aceetaldehyde door de sla, waardoor er een lagere concentratie aceetaldehyde in de atmosfeer beschikbaar was voor de insecticide-werking (Aharoni *et al.*, 1979a).

Na het gebruik van aceetaldehyde als begassingsmiddel kan fytotoxiciteit optreden. Na een behandeling met 2% aceetaldehyde gedurende vier uur bij 21 °C werd schade bij aardbeien gevonden, maar de fytotoxiciteit werd tegengegaan door de begassing plaats te laten vinden onder een atmosfeer die 50% CO₂ of 1,0% O₂ bevatte (Aharoni *et al.*, 1979b). Bij begassing van drie cultivars van sla met aceetaldehyde-concentraties tot maximaal 2%, kon geen fytotoxiciteit aangetoond worden (Aharoni *et al.*, 1979a).

De resultaten van onderzoek naar de insecticide-werking van aceetaldehyde zijn weergegeven in Tabel 2.4. Uit de resultaten blijkt dat dit middel een perspectief biedt als een potentieel begassingsmiddel omdat na behandelingstijden van één tot vier uur 100% mortaliteit verkregen wordt van *F. occidentalis* en *M. persicae*.

Aceton

De insecticide-werking van aceton dampen is onderzocht voor insecten die voorkomen in opgeslagen graan (Tunc *et al.*, 1997). Een dosis van 123 µl aceton per liter lucht gedurende een behandelingstijd van één tot drie dagen veroorzaakte 100% mortaliteit van eieren en adulten van de Amerikaanse rijstmeelkevers *T. confusum* en eieren en larven van de meelmot *Ephestia kuehniella*. Lagere doses waren minder effectief en een nadeel is dat 100% sterfte pas optreedt na blootstelling gedurende een periode van minimaal 48 uur. Het werkingsmechanisme van aceton is niet bekend, maar het middel vertoont alleen een insecticide-werking wanneer het aan insecten toegediend wordt in dampvorm. Uit ongepubliceerde gegevens van deze onderzoekers is namelijk gebleken dat bij toediening in vloeibare vorm ("topical application") aceton niet toxisch is voor dezelfde insecten.

Aceton wordt onder andere gebruikt als oplosmiddel in toxicologische studies. Het is een product van het metabolisme in levende organismen. Aceton heeft een

relatief lage acute en chronische toxiciteit tegen non-target organismen en wordt eenvoudig afgebroken. Een nadeel is de hoge brandbaarheid van aceton.

Arsine en stibine

Arsine (AsH_3) en stibine (SbH_3) worden genoemd als begassingmiddel met een hogere insecticide-werking dan fosforwaterstof (Chaudhry en Price, 1991). Deze middelen veroorzaakten een hogere mortaliteit bij fosforwaterstof-resistente insecten. Bij gebruik van deze middelen treden waarschijnlijk toxische residuen op.

Blauwzuurgas

Blauwzuurgas (HCN) is zeer toxisch voor insecten en werd in het verleden gebruikt bij de behandeling van plantmateriaal, sierplanten en bestrijding van insecten in kassen totdat andere middelen beschikbaar kwamen die minder fytotoxiciteit veroorzaken (Monro, 1969; Hansen en Hara, 1994). In de VS werd blauwzuurgas gebruikt bij quarantainebehandelingen voor insecten zoals trips, schildluizen en de rozenkever *Asynonychus godmani* op citrusvruchten (Houck *et al.*, 1989), hoewel uit experimenten van Soderstrom *et al.* (1991) bleek dat de mortaliteit van eieren van *A. godmani* op citrusfruit na behandeling met blauwzuurgas zeer laag was. Hansen en Hara (1994) noemen een aantal plaaginsecten die in het verleden effectief behandeld zijn met dit middel. In een publicatie van Hansen *et al.* (1991b) werd de effectiviteit van begassing met blauwzuurgas op verschillende plaaginsecten van bloemen en planten, waaronder bladluis en trips onderzocht. Met een 30 minuten durende begassing met 2500 tot 4600 ppm blauwzuurgas werd een goede bestrijding verkregen van o.a. de bananenbladluis *Pentalonia nigronervosa*. Daarentegen werden de meeste poppen en adulten van de trips *Sciothrips cardamomi* niet gedood. Tegenwoordig is het gebruik van blauwzuurgas in de VS toegestaan (APHIS, 1986; Hansen *et al.*, 1991b) voor de behandeling tegen specifieke plaag-insecten in katoen (katoenwormen en katoenmot, "bollworms"), granen (khaprakever, *Trogoderma granarium*) en tabak, maar niet langer beschikbaar voor andere doeleinden. In Japan wordt blauwzuurgas gebruikt bij de behandeling van geïmporteerd plantmateriaal en vers fruit (Hara, 1994). Fytotoxiciteit is een groot probleem bij blauwzuurgas. In Japan wordt dit middel gebruikt tegen bladluizen op sla, maar door begassing kunnen kroppen sla ernstig beschadigd worden (Aharoni *et al.*, 1986). Uit een andere studie blijkt dat begassing met 2500 ppm blauwzuurgas gedurende 30 minuten, een dosis die in Japan gebruikt wordt als quarantainebehandeling, geen fytotoxiciteit veroorzaakt bij de meerderheid van de getoetste tropische snijbloemen en planten. Wel trad bij deze dosis schade op bij alle cultivars van Protea en bij hogere concentraties blauwzuurgas werd ook schade gevonden in andere soorten (Hansen *et al.*, 1991a). Een extra reden die blauwzuurgas ongeschikt maakt voor de behandeling van snijbloemen is het feit dat het middel zeer oplosbaar is in water en een verdund zuur vormt (Monro, 1969). Bovendien zijn residuen aan het eind van de behandelingsduur niet direct verdwenen, maar wordt het gas nog gedurende langere tijd langzaam afgegeven door het behandelde plantmateriaal (Wit en Van de Vrie, 1985b).

Bij gebruik van blauwzuurgas vindt blokkering van de ademhaling plaats, zelfs bij sublethale doses (Bond, 1961). Cyanide is een sterke ligand van metaalionen en bindt irreversibel aan de haem Fe(III) -groep van het cytochroom-c-oxidase complex

en aan veel andere metallo-enzymen (Solomonson, 1981). In insecten is resistentie tegen blauwzuurgas gevonden (Macdonald en Chakrabarti, 1993).

Door de hoge toxiciteit voor non-target organismen, de lagere efficiëntie bij de bestrijding van sommige soorten insecten, vooral trips, en de problemen van fytotoxiciteit, is blauwzuurgas geen geschikt alternatief voor begassing met methylbromide.

Carbonylsulfide

Recentelijk is de insecticide-werking van carbonylsulfide (COS) gas gemeld (Macdonald en Mills, 1994; Plarre en Reichmuth, 1996; Chaudhry, 1997). De efficiëntie van een begassing met COS werd getoetst op alle levensstadia van het graaninsect *Sitophilus granarius* (Plarre en Reichmuth, 1996). Bij een concentratie van 18 g/m³ gedurende een behandelingstijd van 120 uur en 32 g/m³ gedurende 72 uur werd 100% bestrijding bereikt van alle levensstadia. De insecticide-werking van COS ontstaat waarschijnlijk door de hydrolyse van COS door het enzym carbonic anhydrase, waardoor waterstofsulfide gas (H₂S) in insectenweefsels geproduceerd wordt. Een nadeel is dat COS zeer goed oplosbaar is in water en dan zeer snel wordt afgebroken, waardoor zwavelresiduen kunnen ontstaan in begaste producten.

Dichloorvos

Dichloorvos (DDVP) (dimethyl 2,2-dichlorovinyl phosphate) is een contact-insecticide met een hoge dampspanning en een relatief goed doordringend vermogen en het kan vanwege deze eigenschap ook gebruikt worden als begassingsmiddel. Het is een cholinesterase-remmer, met een lage fytotoxiciteit (Monro, 1969). Het wordt op dit moment in Nederland bijgemengd tijdens begassing met methylbromide om een kortere behandelingsduur te realiseren. In aanwezigheid van water hydrolyseert dichloorvos langzaam tot dichloorazijnzuur. Het middel breekt daardoor snel af: na behandeling van gesloten ruimtes zijn significante residuen na enkele uren verdwenen.

Ethylformaat

Ethylformaat wordt gebruikt voor de desinfestering van verschillende producten zoals granen, peulvruchten, specerijen, gedroogde producten, waaronder vruchten, noten en knollen (Muthu *et al.*, 1984). Het is een vluchtige stof die in kleine hoeveelheden geproduceerd wordt door vruchten. Na begassing blijven geen residuen achter op het product omdat het afgebroken wordt in ethanol en mierzuur (Aharoni *et al.*, 1980). Aan de hand van experimenten die uitgevoerd werden in India, werd geconcludeerd dat ethylformaat een veilig begassingsmiddel is voor opgeslagen voedselproducten. Men vond dat bij een dosis van 300-400 g/m³ gedurende een behandelingsperiode van 48 tot 72 uur alle levensstadia bestreden werden van graaninsecten, waaronder de roestbruine rijstmeelkever *Tribolium castaneum* en de graanmot *Sitotroga cerealella*. De onderzoekers concludeerden dat een dosis van 400 g/m³ gedurende een behandelingstijd van 72 uur als standaard behandeling kan dienen voor de desinfestatie van de meeste producten (Muthu *et al.*, 1984).

Om de toepassing van ethylformaat voor de bestrijding van insecten op vers product tijdens korte behandelingstijden van enkele uren te beoordelen, werden experimenten uitgevoerd met de Californische trips *F. occidentalis* op aardbei. Een

ethylformaat-concentratie van 0,5% gedurende een periode van één uur bij een lage atmosferische druk van 30 mm Hg doodde alle tripsen. Wanneer ethylformaat onder vacuüm werd toegepast op in folie verpakte sla, werd een goede bestrijding verkregen van de groene perzikluis, *M. persicae* (Stewart en Aharoni, 1983). De meest optimale behandeling bestond uit een concentratie van 0,5% ethylformaat onder vacuüm gedurende een periode van één uur. Onder deze omstandigheden werd 98% van de bladluizen gedood. Deze laboratoriumexperimenten werden herhaald op commerciële schaal, waarbij een bestrijding werd bereikt van meer dan 98% (Stewart en Mon, 1984). De onderzoekers concludeerden dat ethylformaat een potentiële nieuw begassingsmiddel is voor de bestrijding van de groene perzikluis op verpakte kropsla. Het effect van ethylformaat op andere stadia dan adulten is onderzocht in een experiment met eieren van de rozenkever *A. godmani* op citrusvruchten. Een behandeling met 2% ethylformaat gedurende twee uur bij 21 °C gaf geen goede bestrijding van de eieren van dit insect (Soderstrom *et al.*, 1991). De resultaten van onderzoek naar de insecticide-werking van ethylformaat op insecten die algemeen voorkomen in snijbloemen zijn weergegeven in Tabel 2.4. Hieruit blijkt dat ethylformaat perspectief biedt als begassingsmiddel van snijbloemen omdat na behandelingstijden van één tot vier uur 100% mortaliteit verkregen wordt van *F. occidentalis* en *M. persicae*.

Fytotoxiciteit in sla bij doses tot 0,5% ethylformaat treedt niet op, maar bij hogere doses van respectievelijk 1,0 en 1,5% werd schade gevonden in 30% en 97% van de kroppen (Stewart en Aharoni, 1983; Stewart en Mon, 1984). Smaak of geur van de sla werd niet beïnvloed door de begassing en residuen konden niet worden aangetoond. Onafhankelijk van de dosis was na een periode van één uur in elke behandeling ongeveer 75% van het ethylformaat geabsorbeerd door de sla (Stewart en Aharoni, 1983).

Methylisothiocyanaat

Het gebruik van methylisothiocyanaat (MITC) als alternatief voor methylbromide is onderzocht voor de bestrijding van *Cydia pomonella*, een quarantaineplaag op appels. Preliminair experimenten lieten zien dat methylisothiocyanaat een effectief middel is voor de bestrijding van het eistadium van dit insect (Ducom, 1996).

Methylfosforwaterstof

Recente studies in Engeland hebben geleid tot de ontdekking van de insecticide-werking van methylfosforwaterstofgas (CH_3PH_2), een analoog van fosforwaterstof (Chaudhry, 1997). In preliminair experimenten werd een hoge mortaliteit gevonden bij fosforwaterstof-resistente stammen van vier soorten insecten die voorkomen in opgeslagen granen (Chaudhry *et al.*, 1996).

Silane en methylsilane

Silane (SiH_4) en methylsilane (CH_3SiH_3) worden ook beschouwd als potentieel nieuwe begassingsmiddelen. Bij de afbraak van deze middelen worden niet-toxische silicon-oxiden gevormd. De gassen zijn echter minder effectief tegen insecten dan fosforwaterstof (Chaudhry, 1997).

Sulfurylfluoride

Sulfurylfluoride (SF) is een begassingsmiddel dat voornamelijk gebruikt wordt bij de bestrijding van termieten in hout (Stewart, 1957). De effectiviteit van

sulfurylfluoride is getoetst tegen een groot aantal soorten termieten (Osbrink *et al.*, 1987). De toxiciteit van sulfurylfluoride zonder en met gelijktijdige toediening van CO₂ werd bepaald voor twee soorten termieten (Scheffrahn *et al.*, 1995). Door het bijmengen van 10-20% CO₂ werd de effectiviteit van sulfurylfluoride met ongeveer een factor 2 verhoogd. In een studie van Reichmuth *et al.* (1996) werd de werking van dit middel getoetst op alle levensstadia van acht insecten in voorkomen in graanopslag. Zij adviseerden dat voor complete bestrijding een hoge dosis nodig was van ca. 80 g/m³. De eigenschappen en het gebruik van sulfurylfluoride worden samengevat door Monro (1969). Het middel is zeer toxisch, heeft geen of weinig effect op de kieming van zaden maar is wel schadelijk voor groene planten, groenten en fruit.

Zwavedioxide

In drie publicaties wordt melding gemaakt van de insecticide-werking van zwavedioxide (SO₂). Bij behandelingen met oplopende concentraties van 100 tot 1000 µg/m³ zwavedioxide nam de sterfte van *Melasoma lapponica* toe. De effectiviteit van de begassing was echter laag, bij de hoogste concentratie zwavedioxide overleefde 70% van de insecten de behandeling (Kozlov *et al.*, 1996). Zwavedioxide begassing gedurende 1,5 uur veroorzaakte 73% mortaliteit van oorwurmen (Maughan, 1986; Hara, 1994) en blootstelling aan 250 tot 800 µg/m³ zwavedioxide was toxisch voor de erwtenbladluis *Acyrtosiphon pisum* (Whittaker en Warrington, 1990). De laatstgenoemde auteurs concludeerden dat bij lage en gemiddelde concentraties zwavedioxide de insecten hun groeisnelheid verhogen, maar dat bij verdere verhoging van de concentratie zwavedioxide giftig is. Bij een lage concentratie zwavedioxide tot 100 µg/m³ werd gevonden dat er geen toxische effecten zijn op *M. lapponica*, maar bij deze concentraties is er een effect op waardplantkwaliteit, waardoor de voedselkwaliteit van de plant verhoogd wordt. Dit heeft tot gevolg dat de overleving en populatiedichtheid van *M. lapponica* toenemen (Kozlov *et al.*, 1996).

Combinaties van begassingsmiddelen

Naast enkelvoudige toepassingen van begassingsmiddelen, wordt in de literatuur ook melding gemaakt van combinaties van meerdere begassingsmiddelen, waardoor een effectievere bestrijding wordt verkregen. Als voorbeeld kunnen genoemd worden de combinatie van methylbromide en fosforwaterstof bij de bestrijding van insecten in de graanopslag. Hierbij bezit methylbromide een relatief snelle werking en zorgt fosforwaterstof voor een goede penetratie in het opgeslagen product (Wohlgemuth *et al.*, 1976).

Mengsels van begassingsmiddelen kunnen een hogere mortaliteit geven dan wanneer deze middelen onafhankelijk van elkaar toegepast worden. Dit effect kan variëren van minder dan additief (Bond en Morse, 1982), additief (Bond, 1978; Bond en Morse, 1982) tot een synergistisch effect, waarbij de mortaliteit hoger is dan de som van de percentages sterfte die gevonden worden wanneer elke component van het mengsel apart wordt toegediend (Bond, 1978). Een andere mogelijkheid is het bijmengen van insecticidesynergisten zoals bijvoorbeeld piperonylbutoxide (Carpenter en Stocker, 1992), die aangrijpen op het detoxificatiesysteem van het insect (Georghiou, 1994), waardoor een effectievere werking van het middel kan worden verkregen.

Naast een verbeterde werking kan door het mengen van middelen ook een antagonistisch effect optreden. Een voorbeeld hiervan is blauwzuurgas, dat de toxiciteit van methylbromide voor *Sitophilus granarius* verlaagd (Bond, 1961). In dit geval waren insecten die verdoofd waren door een sublethale dosis blauwzuurgas minder gevoelig voor een behandeling met methylbromide dan actieve insecten die niet waren voorbehandeld. Bij een dosis van 5,5 en 8 mg/l methylbromide daalde de mortaliteit van 57% naar 12% en van 100% naar 42% van respectievelijk niet-voorbehandelde en met blauwzuurgas voorbehandelde insecten.

Mengsels van begassingsmiddelen worden ook gebruikt bij de bestrijding van insecten in snijbloemen. In Nederland wordt bij de begassing van snijbloemen voor de export gebruik gemaakt van een combinatie van methylbromide en dichloorvos. De laatstgenoemde stof wordt bijgemengd om een snellere behandeling mogelijk te maken. Een Taiwanese studie (Wang en Lin, 1984a) vergeleek verschillende behandelingen voor de bestrijding van insecten in snijbloemen, waaronder begassing met enkele pesticiden. Een van de meest effectieve behandeling bestond uit een combinatie van fosforwaterstof en xyleen gedurende vier uur, waardoor respectievelijk 100% van de tripsen, *Frankliniella intonsa* en *Thrips hawaiiensis*, 96,6% van de bladluizen, *A. gossypii* en *M. persicae* en 98% van de spintmijt, *T. urticae*, werd bestreden. Door een combinatie van roken met 98% deltamethrin bij een concentratie van 1 g/m³ gedurende één uur, gevolgd door een begassing met fosforwaterstof gedurende vijf uur, werd een volledige bestrijding bereikt van alle toetsinsecten.

2.4.2 Aerosolen

Insecticiden kunnen toegepast worden als aerosolen waarbij ze bestaan in druppelvorm. De druppelgrootte bij aerosolen is kleiner dan 10 µm diameter. Als aerosol kunnen insecticiden toegepast worden die een hoge dampdruk hebben. Voorbeelden van insecticiden die gebruikt zijn voor desinfestering van producten zijn pyrethrinen, abamectine, chloorpyrifos, organofosfaten en synthetische pyrethroïden zoals deltamethrin, fenvalerate en permethrin (Seaton en Joyce, 1989; Hara, 1994). Een toepassing van dichloorvos met een concentratie van 32 tot 64 mg/m³ gedurende twee uur bij 20 °C, is een geregistreerde behandeling voor de desinfestatie van snijbloemen in de VS (Seaton en Joyce, 1988).

Doordat het middel nog steeds in de vorm van druppels bestaat, is het minder effectief dan een begassingsmiddel wat betreft de penetratie in bijvoorbeeld bloemen of in dicht op elkaar gepakte bloemstelen (Seaton en Joyce, 1989). Aerosolen worden in het algemeen opgelost in CO₂ en toegepast door middel van een speciaal hogedruk-systeem. Door het gebruik van bijvoorbeeld "forced draft application", "vaporized" formuleringen (Seaton en Joyce, 1989) of gebruik van een "thermal fogging device" wordt de werking van aerosolen effectiever (Muthu *et al.*, 1984; Hansen en Hara, 1994; Hara, 1994; Wang en Lin, 1984a).

Bij de desinfestering van snijbloemen is veel onderzoek gedaan naar de toepassing van insecticiden als aerosolen. In het algemeen worden bestrijdingspercentages van meer dan 90% bereikt gedurende behandelingstijden van enkele uren (Seaton en Woods, 1991; Carpenter en Stocker, 1992; Coetzee en Wright, 1992; Hansen en Hara, 1994; Hara *et al.*, 1995) van algemeen voorkomende insecten zoals trips, bladluizen en spintmijt. Bij de desinfestering van bloemen zijn ook mengsels van

insectiden getoetst (Seaton en Woods, 1991; Hansen en Hara, 1994). De fytotoxiciteit bij gebruik van aerosolen is in het algemeen laag, maar er wordt beschadiging gemeld in enkele soorten (Hamlen en Henley, 1979). Bloemen raken vooral beschadigd wanneer het aerosol direct op de bloemen gespoten wordt (Carpenter en Stocker, 1992). Een ander nadeel is dat er residuen kunnen achterblijven op het product.

2.4.3 Insecticide dips

Insecticide dips worden vooral toegepast bij de desinfestering van tropische snijbloemen bij de export uit tropische gebieden (Hara, 1994). Veel insecticiden die effectief zijn bij bespuitingen kunnen ook gebruikt worden als dip bij de desinfestering van bloemen. Het insecticide fluvalinate staat in de VS geregistreerd als een insecticide dip voor bloemen en plantmateriaal (Hara, 1994) en deltamethrin in Australië voor de behandeling van snijbloemen (Hansen en Hara, 1994). Een evaluatie van dips met insecticiden, oliën en insecticide zepen voor de bestrijding van insecten op bloemen wordt gegeven in de reviews van Hansen en Hara (1994) en Hara (1994). Verscheidene stoffen zijn gebruikt voor dips, waaronder middelen als fluvalinate, permethrin, propoxur, dimethoate, methomyl, citrusolie en olie-sprays, insecticide zepen en waspoeders. Insecticide dips worden toegepast in combinatie met handmatige verwijdering van dode insecten, bijvoorbeeld bij *Heliconia* (Criley en Broschat, 1992; Hansen en Hara, 1994). Uit talloze publicaties blijkt dat de effectiviteit van insecticide dips erg varieert, afhankelijk van het gebruikte middel en het toetsinsect. Bij het merendeel van de publicaties wordt geconcludeerd dat insecticide dips als behandeling na de oogst effectief zijn om de aantallen plaaginsecten te reduceren, maar in bijna alle gevallen wordt 100% mortaliteit niet bereikt (Osborne, 1986; Tenbrink *et al.*, 1990; Waller, 1990, Sulfuryl *et al.*, 1991; Butler *et al.*, 1993; Hata *et al.*, 1993; Hara *et al.*, 1995). Als voorbeeld kan gegeven worden het onderzoek naar de effectiviteit van een fluvalinate dip voor de bestrijding van de groene perzikluiskruiper (*M. persicae*), kaswittevlug (*Trialeurodes vaporariorum*), spintmijt (*T. urticae*) en wolluis (*Phenacoccus solani*) op stekmateriaal van tropische sierplanten (Osborne, 1986). Door een 1 minuut-durende dip in een oplossing van 1,68 g fluvalinate per 100 liter water werden de aantallen van alle vier insecten met tenminste 70% gereduceerd zonder dat bladschade kon worden aangetoond.

Een voordeel bij de toepassing van dips is dat voor behandeling geen complexe apparatuur nodig is. Een nadeel is dat bloemen goed gedroogd moeten worden om problemen met schimmels tegen te gaan (Seaton en Joyce, 1988). Bovendien is de effectiviteit van de behandeling afhankelijk van de gevoeligheid van het insect voor het gekozen insecticide en de mate waarin het insect in contact komt met het insecticide; sommige insecten die zich goed verschuilen hebben een kans om niet geraakt te worden door de behandeling. Verder is de methode arbeidsintensief en kan potentieel een gevaar opleveren voor de gezondheid wanneer geen beschermende kleding en apparatuur gebruikt wordt (Seaton en Joyce, 1988) en kunnen milieuaspecten meespelen. Fytotoxiciteit kan optreden in sommige soorten die gevoelig zijn voor de gebruikte insecticiden, maar in het algemeen veroorzaken chemicaliën die geregistreerd zijn als sprays geen of weinig fytotoxiciteit wanneer ze toegepast worden in dips. Oliën en insecticide zepen veroorzaken in het

algemeen meer fytoxische effecten (Tenbrink *et al.*, 1992; Hansen en Hara, 1994).

2.4.4 Alternatieve insecticide-behandelingen

Als nabehandelmiddel kunnen insecticiden, zoals bijvoorbeeld dichloorvos op verschillende manieren toegepast worden, o.a. geïmpregneerd in verpakkingsmateriaal. De insecticide-werking van dichloorvos geïmpregneerd in polyvinylchloride (PVC) strips is getest op snijbloemen en potplanten (Hamlen en Henley, 1979; Seaton en Joyce, 1988; Hara, 1994). Dichloorvos-geïmpregneerde PVC-strips werden in afgesloten polyethyleen zakken geplaatst met daarin plantmateriaal. Op deze planten waren groene perzikluis *M. persicae*, spintmijt *T. urticae* en wolluis *Phenacoccus solani* uitgezet. Na een behandelingstijd van 12 tot 24 uur vond men een reductie van ongeveer 80 tot 100% van de toetsinsecten. Totale verwijdering van insecten werd echter in de meeste gevallen niet bereikt en bovendien was deze methode fytoxisch voor enkele soorten bloemen (Hamlen en Henley, 1979). Tegen trips op orchideeën (Hata *et al.*, 1993) en anjers (Tjosvold en Ali, 1989) zijn chloorpyrifos-geïmpregneerde verpakkingsmaterialen getoetst, maar deze behandeling was niet effectief.

2.4.5 Bestraling (gammastraling of bètastraling)

Gammabestraling is gebruikt voor het steriliseren van fruitvliegen bij eradicatieprogramma's waar grote aantallen steriele insecten worden uitgezet (Steiner *et al.*, 1965). Als behandeling na de oogst is gammabestraling met succes gebruikt bij de desinfestering van papaya (Akamine en Goo, 1977), kersen (Burditt en Hungate, 1988; Jessup, 1990) en mangoes (Spalding en Von Windeguth, 1988). Voordelen van bestraling bestaan o.a. uit een diepe penetratie van zowel plantenweefsel en verpakkingsmateriaal dat wordt bestraald en de afwezigheid van chemische residuen (Wit en Van de Vrie, 1985a; Seaton en Joyce, 1992). Gammabestraling is ook getest als behandeling bij de desinfestering van snijbloemen (Moy, 1985; Wit en Van de Vrie, 1985a; Seaton en Joyce, 1988; 1992; Seaton *et al.*, 1989). Uit verschillende publicaties is gebleken dat snijbloemen in het algemeen zeer gevoelig zijn voor bestraling. Er is een kleine marge tussen de effectieve dosis die nodig is voor 100% mortaliteit van insecten en de dosis die fytoxiciteit veroorzaakt. Hoewel lagere doses effectief zijn om de ontwikkeling en de voortplanting van insecten stop te zetten (Wit en Van de Vrie, 1985a; Yathom *et al.*, 1990) is dit niet voldoende voor de bestrijding van insecten in bloemen voor de export waarvoor een nultolerantie geldt. De dosis die nodig is om insecten of mijten te steriliseren kunnen oplopen tot ongeveer 0,4 kGy (40 krad), afhankelijk van de soort, sekse, en het ontwikkelingsstadium dat wordt bestraald (Thomou, 1963; Anwar *et al.*, 1975; Fisher, 1981; Wit en Van de Vrie, 1985a; Goodwin en Wellham, 1990; Seaton en Joyce, 1992; Dohino en Tanabe, 1994). Voor acute mortaliteit van insecten zijn echter hogere doses van 1-2,5 kGy (100-250 krad) of nog hoger nodig (Hugue, 1963; Laviolette en Nardon, 1963; O'Brien en Wolfe, 1964; Piriathamrong *et al.*, 1985; Yathom *et al.*, 1990; Seaton en Joyce, 1992). Ter vergelijking, bij doses tussen 0,5 en 1 kGy (50-100 krad) treedt significante schade op bij de meeste snijbloemen (Wit en Van de Vrie, 1985a; Seaton en Joyce, 1988; 1992), en zelfs bij lagere doses van 0,05 kGy tot

0,1 kGy (5 tot 10 krad) is schade gevonden bij 19 verschillende soorten snijbloemen (Wit en Van de Vrie, 1985a). De schade die hierbij optrad bestond uit kleurveranderingen en/of bladverbranding van bloembladeren en/of bladeren, een korter vaasleven, verwelking en het niet- of gedeeltelijk opengaan van bloemen. De laatste jaren vindt in Japan onderzoek plaats naar de lethale effecten van bètabestraling bij de behandeling van spintmijt (*T. urticae*), wolluis (*Pseudococcus comstocki*) en bladmineerder (*Liriomyza trifolii*) (Dohino en Tanabe, 1993; 1994; Dohino *et al.*, 1994; Dohino en Masaki, 1995; Kumagai en Dohino, 1995) en wordt gekeken naar de fytotoxiciteit die hierbij optreedt bij verschillende snijbloemen (Tanabe en Kato, 1992; Tanabe en Dohino, 1993; 1995; Tanabe *et al.*, 1994; Hayashi en Todoriki, 1996). Bij dit onderzoek werd aangetoond dat het lethale effect van gamma- en bètastraling op het insect vergelijkbaar is, en dat in beide gevallen de benodigde dosis voor de bestrijding van spintmijt ongeveer even hoog is. De onderzoekers concluderen verder dat bestraling met behulp van bètastralen als voordelen heeft dat het veiliger is, dat het lagere kosten met zich meebrengt en dat er minder schade wordt toegebracht aan het milieu dan een behandeling met gammastraling (Dohino *et al.*, 1994). Naast de problemen met fytotoxiciteit zijn de weerstand van de consument tegen het gebruik van bestraling en de hoge kosten van een faciliteit waar bestraling moet plaatsvinden (Hara, 1994) belangrijke nadelen waar rekening mee moet worden gehouden.

2.4.6 Temperatuurbehandelingen

Temperatuurbehandeling bestaat uit o.a. koude- en warmtebehandelingen, een behandeling met verwarmde lucht die verzadigd is met water ("vapor heat") of onderdompeling van het product in warm water. Al deze behandelingen hebben als voordeel dat ze in het algemeen makkelijk toe te passen zijn en er geen residuen achterblijven op het gewas. Warmtebehandelingen door onderdompeling in water wordt op Hawaï commercieel toegepast bij de bestrijding van fruitvliegen in tropisch fruit zoals bij bijvoorbeeld bananen (Armstrong, 1982) en papaya (Couey en Hayes, 1986) als een alternatieve quarantainebehandeling ter vervanging van begassing met ethyleendibromide.

Bij de desinfectie van orchideeën is de effectiviteit van verschillende temperatuurbehandelingen onderzocht. Hara *et al.* (1995) evalueerden het effect van verschillende behandelingen na de oogst op de tripssoorten *F. occidentalis* en *Thrips palmi*. Dompeling in heet water gaf een significante reductie van het aantal tripsen, maar 100% mortaliteit werd niet bereikt. Dompeling in heet water van 49,5 °C gedurende 15 of 20 seconden gaf respectievelijk 88,1% en 95,3% reductie in tripsen, met variërende fytotoxiciteit. Het effect van een ultrasoon bad met warm water werd ook getoetst op tripsen op orchideeën, maar er werd geen effectieve bestrijding bereikt en bovendien was de methode fytotoxisch (Hata *et al.*, 1993).

Het gebruik van "vapor heat", bestaande uit verwarmde lucht die verzadigd is met water, is onderzocht voor de bestrijding van fruitvliegen op verschillende vruchten (Hara, 1994) en wordt genoemd als een mogelijke behandeling om tropische snijbloemen en planten te ontdoen van insecten. Na een behandeling met water-verzadigde lucht gedurende 1 uur bij 46,6 °C werden nymphen en adulten van

bladluizen, schildluizen, wolluizen en trips gedood. Anthuriums, protea en orchideeën zijn echter zeer gevoelig voor deze behandeling (Hansen *et al.*, 1992). Koudebehandelingen worden toegepast voor de bestrijding van fruitvliegen in verscheidene soorten fruit (Paull, 1994), maar als gevolg van de lange behandelingstijd en de problemen om deze omstandigheden toe te passen gedurende transport is deze methode slecht toepasbaar bij de desinfectering van bloemen en planten.

2.4.7 "Controlled atmospheres" (CA)

"Controlled atmospheres" (CA's) verschillen van de normale atmosfeer in hun samenstelling van O₂, CO₂ en N₂. Hierbij is gevonden dat CA's met een verhoogd CO₂-gehalte en/of een laag O₂-gehalte een zekere mate van insecticide-werking bezitten (Annis, 1987). CO₂ en O₂ zijn de biologische actieve componenten van lucht, daarnaast kan de werking van stikstof beschouwd worden als een verdunningsmiddel, omdat stikstof vergelijkbaar is met een inert gas zoals helium (Lindgren en Vincent, 1970; Aliniabee, 1972). CA wordt bijvoorbeeld gebruikt om graaninsecten tijdens de opslag van granen te doden, waarbij de behandelingstijd vaak enkele weken beslaat. Naast de desinfectatie van opgeslagen granen is er een grote variatie aan verschillende producten en de bijbehorende plaaginsecten, waarbij de insecticide-activiteit van verschillende CA-condities experimenteel getoetst is met uiteenlopend succes. Als voorbeelden kunnen genoemd worden de desinfectering van de Californische trips (*F. occidentalis*) op aardbeien (Aharoni *et al.*, 1981), de Caraïbische fruitvlieg (*Anastrepha suspensa*) (Benschoter, 1987) en andere insecten (Gauce *et al.*, 1982) op fruit, *Cylas formicarius elegantulus*, de "sweet potato weevil", het belangrijkste plaaginsect op zoete aardappelen (Delate *et al.*, 1990), bladluizen en rupsen op sla (Klaustermayer *et al.*, 1977), mijten (Lidster *et al.*, 1984) en de San Jose-schildluis op appels (Morgan en Gauce, 1975) en insecten op gedroogde vruchten en noten (Soderstrom, 1977, Soderstrom en Brandl, 1990).

Doordat er veel verschillende factoren zijn die mortaliteit van insecten beïnvloeden en doordat mortaliteitsgegevens op verschillende manieren weergegeven worden in de literatuur, is het moeilijk om algemene regels te halen uit de enorme hoeveelheid van verzamelde gegevens met betrekking tot de effecten van CA. (Bailey en Banks, 1980; Annis, 1987; Banks en Annis, 1990; Ke en Kader, 1992; Adler, 1994b). Bailey en Banks (1980), geven een overzicht van de effecten van CA, waarbij achtereenvolgens de literatuur wordt samengevat die de werking behandelt van CA's met een laag O₂, een hoog CO₂-gehalte in combinatie met verschillende gehalten aan O₂ en een hoog CO₂-gehalte. Een grafische benadering met het doel een overzicht te kunnen geven van doseringsschema's die nodig zijn om de belangrijkste insecten in opgeslagen graan te bestrijden, wordt gegeven door Annis (1987). Banks en Annis (1990) bestudeerden de effectiviteit van behandelingen met combinaties van hoge CO₂- en lage O₂-gehalten. Ke en Kader (1992) hebben de toepassing van CA voor de desinfectering van groenten en fruit bekeken door een lijst samen te stellen van de tijd die nodig is om 100% mortaliteit te bereiken bij verschillende CA's bij verschillende temperaturen. Hetzelfde werd gedaan door Adler (1994b), die de behandelingstijd bepaalde die 95 tot 100% mortaliteit gaf bij verschillende levensstadia van het graaninsect *Sitophilus granarius* en het effect van temperatuur op de behandelingstijd. De fysiologische achtergrond wat betreft

het werkingsmechanisme van CA's wordt gegeven door Adler (1994a) en het effect van CA op ademhaling van insecten wordt samengevat in een review van Lighton (1996).

Uit de resultaten van verschillende studies kunnen enkele algemene regels opgesteld worden:

- Een CA met insecticide-werking bestaat in het algemeen uit een atmosfeer met een hoge concentratie kooldioxide (> 60%) en/of een lage concentratie zuurstof (< 1%) (Banks, 1979; Annis, 1987). Atmosferen die intermediaire hoeveelheden CO₂ bevatten (50% tot 60%) zijn meestal net zo effectief als 100% CO₂ (Jay, 1971; Banks, 1979; Annis, 1987; Adler, 1994b).
- De meeste insecten zijn tolerant voor lage O₂-concentraties tot minimaal 2% bij temperaturen tot 20 °C (Banks, 1979; Soderstrom *et al.*, 1986; Benschoter, 1987). Bij verdere verhoging van de temperaturen boven 20 °C gaat echter de mortaliteit omhoog omdat door een verhoging van het metabolisme van het insect bij hogere temperaturen de O₂ een beperkende factor is.
- De meest effectieve CA-omstandigheden hebben onvoldoende insecticide-werking om volledige afdoding te bewerkstelligen in een relatief korte periode van één tot vier uur (Aharoni *et al.*, 1979b; 1980; Hartsell *et al.*, 1979). Langere behandelingen bij hogere CO₂-concentraties van één tot twee dagen resulteren in het algemeen in hogere mortaliteit, die kan oplopen tot 100% (Aharoni *et al.*, 1981; Ke en Kader, 1992).
- De temperatuur tijdens de blootstelling van insecten aan CA is van invloed op de effectiviteit van de behandeling. Bij hogere temperaturen neemt de mortaliteit toe (Carpenter *et al.*, 1996) en kan volstaan worden met een kortere behandelingsduur (Adler, 1994b).
- De effectiviteit van een CA-behandeling wordt beïnvloed door luchtvochtigheid. In het algemeen is de werking van CA effectiever bij een lagere luchtvochtigheid (Bailey en Banks, 1980) omdat het gevaar voor uitdroging groter is. Bij CO₂-concentraties van 21, 51 en 88% werd gevonden dat het waterverlies bij insecten toenam naarmate de relatieve luchtvochtigheid afnam. Het gewichtsverlies zal uiteindelijk resulteren in mortaliteit wanneer een kritische waarde wordt bereikt (Navarro en Calderon, 1974).
- Popstadia, aangetoond bij insecten die voorkomen in opgeslagen granen, zijn in het algemeen het meest tolerante stadium voor CA-behandelingen (Annis, 1987; Adler, 1994b). Dit kan verklaard worden doordat poppen relatief weinig zuurstof gebruiken of door het feit dat dit stadium gebruik kan maken van de reserves die opgeslagen zijn tijdens de larvale stadia. Deze reserves kunnen gebruikt worden als een substraat voor anaerobe energieproductie door middel van glycolyse (Adler, 1994b).

Voor de bestrijding van insecten in aan bederf onderhevige producten voor export zijn korte behandelingstijden van enkele uren noodzakelijk om de kwaliteit te behouden. Korte behandelingsperioden tot vier uur onder hoge CO₂-condities veroorzaken in het algemeen geen significante mortaliteit van insecten (zie Tabel 2.2). De mortaliteit van de groene perzikluiskraker, *M. persicae*, op sla was even hoog als van de controle-insecten na een behandeling van vier uur bij CO₂-concentraties van 25% of 60% bij 21 °C (Hartsell, *et al.*, 1979), en een behandeling gedurende drie tot vier uur met 50 tot 70% CO₂ bij 20-21 °C veroorzaakte geen hogere

mortaliteit van *F. occidentalis* op aardbeien wanneer dit vergeleken werd met de natuurlijke sterfte van controle-insecten onder normale atmosferische omstandigheden (Aharoni *et al.*, 1979b; 1980). Hier staat tegenover dat Carpenter *et al.* (1996) een mortaliteit vonden van 93,8% bij de trips *F. obscuratus* na een vier uur durende behandeling bij 24 °C met 60% CO₂ in afwezigheid van O₂. In het algemeen resulteren langere behandelingsperioden van 24 uur en meer in hogere mortaliteit. Na een behandeling van 24 uur bij 60% CO₂ en 0% O₂ werd 100% mortaliteit bereikt van *F. obscuratus* (Carpenter *et al.*, 1996). Een behandeling met 90% CO₂ bij een temperatuur van 2,5 °C gedurende 48 uur resulteerde in 100% mortaliteit van trips (Aharoni *et al.*, 1981).

Tijdens experimenten waar de insecticide-werking van CA's met een hoog CO₂-gehalte bepaald worden, kan de hoeveelheid aanwezig O₂ van invloed zijn op de effectiviteit van de behandeling. De hoogste mortaliteit van de Nieuw-Zeelandse bloemtrips, *Thrips obscuratus*, werd verkregen wanneer 40 tot 60% CO₂ gecombineerd werd met 0% O₂ (Carpenter *et al.*, 1996). Wanneer de O₂-concentraties verhoogd werden, nam de mortaliteit af. De experimenten toonden aan dat *T. obscuratus* tolerant is voor lage O₂-concentraties tot minimaal 2%. Daarentegen vonden een aantal auteurs dat de toxiciteit van CO₂ verhoogd werd door de aanwezigheid van O₂. Bij de bestrijding van plaaginsecten in graanopslag werd gevonden dat de insecticide-werking van een CA met 60-80% CO₂ in lucht effectiever was dan de werking van CO₂ in afwezigheid van O₂ (Bell, 1984; Annis, 1990). In een andere studie werd aangetoond dat bij een CA van 50% CO₂, de benodigde behandelingsduur om de insecten te doden significant korter was naarmate de O₂-concentratie verhoogd werd van 4 naar 20%. De tijd die nodig was om 50% (LT₅₀) van de juveniele stadia van de rijstklander *Sitophilus oryzae* te doden bedroeg respectievelijk 3,4, 2,2 en 1,7 dagen voor O₂-concentraties van 4, 10 en 20%. Dit effect werd echter niet gevonden voor een ander graaninsect, *S. granarius*. Voor dit insect waren de LT₅₀-waarden niet significant verschillend, en varieerden van 2,4 tot 2,25 dagen bij alle getoetste O₂ concentraties (Fleurat-Lessard en Le Torc'h, 1991).

Er zijn minder studies gedaan naar het effect van lage O₂-concentraties op de mortaliteit van insecten, en de resultaten van verschillende experimenten zijn tegenstrijdig (Storey, 1975; Bailey en Banks, 1980; Bell, 1984; Annis, 1990). In het algemeen vindt een snellere doding plaats van insecten wanneer O₂-concentraties verlaagd worden tot onder 2% (Banks, 1979; Benschoter, 1987). Het optreden van een verhoogde tolerantie of resistentie voor CA wordt besproken in o.a. de review van Adler (1994a) en aangetoond door Bond en Buckland (1979), Donahaye (1991) en Navarro *et al.* (1985). Bij de behandeling van *S. granarius* en *S. oryzae* met een hoog CO₂-gehalte vond men na zeven tot tien generaties nakomelingen die een twee tot drie maal hogere tolerantie bezaten tegen een hoog CO₂-gehalte van 40-75% (Bond en Buckland, 1979; Navarro *et al.*, 1985). Concluderend kan gezegd worden dat voor bestrijding van het merendeel van de algemeen voorkomende plaaginsecten in opslag behandelingsperioden nodig zijn die enkele dagen tot weken duren bij temperaturen van meer dan 20 °C. In het algemeen zorgen de lange behandelingsperioden ervoor dat CA's minder goed toepasbaar zijn voor producten waar een snelle behandeling essentieel is, zoals snijbloemen en verse groentegewassen. Wel kunnen CA's gebruikt worden in combinatie met andere methoden. Door het combineren van behandelingen kunnen behandelingsperioden verkort worden.

Tabel 2.2 Effecten van CA op insecten die algemeen voorkomen in snijbloemen

insect	CA samenstelling		temperatuur (°C)	tijd voor 100% mortaliteit*	plant	publicatie
	O ₂	CO ₂				
<i>Frankliniella occidentalis</i>	2%	90%	2,5	48 uur	aardbeien	Aharoni <i>et al.</i> , 1981
	0,1% 4 dagen + 3% 7 dagen	10% 4 dagen + 5% 7 dagen	2	11 dagen (83%)	bloemen van ijsplant	Shelton <i>et al.</i> , 1996
<i>Thrips obscuratus</i>	0% of hoger	40% of 60%	24	24 uur	geen	Carpenter <i>et al.</i> , 1996
	0%	60%	24 36	4 uur (86%) 2 uur (100%)	geen	Carpenter <i>et al.</i> , 1996
	2%	18%	-	6 dagen (schatting)	bloesems van kiwi en inflorescentie van koolpalm	Potter <i>et al.</i> , 1994
trips	0%	30 of 50%	0 of 5	4 dagen	roos, anjer, sla, broccoli	Zheng <i>et al.</i> , 1993
	0,02%	-	5	7-14 dagen	roos, anjer, sla, broccoli	Zheng <i>et al.</i> , 1993
<i>Myzus persicae</i>	gereduceerde atmosferische druk (2.66 kPa)		2	52 uur	sla	Aharoni <i>et al.</i> , 1986
	0,1% 4 dagen + 3% 7 dagen	0% 4 dagen + 5% 7 dagen	2	11 dagen: (96,8%)	mosterd	Shelton <i>et al.</i> , 1996
bladluizen	0%	30 of 50%	0	4 dagen	roos, anjer, sla, broccoli	Zheng <i>et al.</i> , 1993
	0%	30 of 50%	5	6 dagen	roos, anjer, sla, broccoli	Zheng <i>et al.</i> , 1993
	0,02%	-	5	7 dagen	roos, anjer, sla, broccoli	Zheng <i>et al.</i> , 1993
<i>Cydia pomonella</i>	0%	98%	45	2,9 uur (LT ₉₅)	-	Soderstrom <i>et al.</i> , 1996

* getallen tussen haakjes geven de maximaal bereikte mortaliteit aan, in het geval dat geen 100% mortaliteit werd bereikt.

2.4.8 Etherische oliën met insecticide-activiteit

Uit verschillende publicaties is bekend dat uit planten afkomstige etherische oliën een meer of mindere insecticide-activiteit bezitten. De biologische activiteit van een groot aantal terpenoïden wordt geëvalueerd in een publicatie van Coats *et al.* (1991). Deze stoffen kunnen verdeeld worden op basis van hun biologische activiteit op insecten. Plantstoffen kunnen een acute toxiciteit veroorzaken in insecten bij contact of dampwerking of een afstotende werking hebben (repellency, antifeedant, anti-ovipositie). Daarnaast zijn er stoffen die een effect hebben op de groei, ontwikkeling of reproductie van het insect. De mechanismen die een rol spelen bij de acute toxiciteit van etherische oliën voor insecten zijn nog niet opgehelderd. Symptomen die na behandeling met bijvoorbeeld monoterpenoïden optreden bestaan vaak uit verhoogde activiteit, en snelle "knockdown" effecten. De symptomen van acute toxiciteit van insecten lijken op de symptomen die ontstaan na behandeling met enkele neurotoxische stoffen. De acute toxiciteit van terpenoïden is in het algemeen significant lager dan van conventionele synthetische organische insecticiden, maar hun werking kan effectief zijn onder bepaalde omstandigheden, waarbij gedurende korte tijd hoge concentraties gebruikt worden zoals bijvoorbeeld bij begassing. Verder is gevonden dat bij toepassing van de synergist piperonyl butoxide, de activiteit van terpenoïden verhoogd wordt (Coats *et al.* 1991).

Van een aantal etherische oliën zijn de LD₅₀- of LC₅₀-waarden op een aantal insecten na behandeling met etherische oliën in vloeibare of dampvorm samengevat in Tabel 2.3. Op basis van gegevens uit de literatuur zijn een tiental secundaire plantenstoffen geselecteerd met insecticide-activiteit, die in hoofdstuk 3 van dit verslag getoetst worden op hun insecticide-werking op trips, aardappeltopluis en kaswittevlug.

Door hun vluchtigheid zijn monoterpenoïden zeer geschikt om gebruikt te worden als begassingsmiddel. Bovendien zijn het merendeel van de terpenoïden niet tot weinig toxisch voor zoogdieren.

2.4.9 Andere methoden

Tot deze methoden worden gerekend het verwijderen van insecten met de hand of door uitschudden, het wassen van planten, het gebruik van ultrasone baden, het borstelen van het product, een behandeling onder vacuüm of het gebruik van microgolven.

Het verwijderen met de hand heeft als voordeel dat geen dure apparatuur of gecompliceerde technologie nodig is. Het nadeel is echter dat het arbeidsintensief is. Door de behandeling kan het product beschadigd worden en vaasleven verkort worden (Seaton en Joyce, 1988; Hansen en Hara, 1994).

Het gebruik van microgolven lijkt alleen haalbaar voor droge producten die relatief weinig water bevatten. Bovendien zijn de kosten van energieverbruik relatief hoog vergeleken met de kosten voor bijvoorbeeld begassing (Halverson *et al.*, 1996).

Het effect van een ultrasoon bad met warm water werd getoetst op tripsen op orchideeën, maar er werd geen effectieve bestrijding bereikt en fytoxiciteit trad op (Hata *et al.*, 1993).

In een aantal oudere publicaties is gekeken naar de insecticide-werking van lage druk bij de opslag van tabak en graan (Bare, 1948; Calderon *et al.*, 1966) en meer

Tabel 2.3 Acute toxiciteit van een aantal etherische oliën op insecten

middel	insect	toxiciteit	publicatie
<i>d</i> -limoneen (citrusolie)	huisvlieg	LD ₅₀ 90 µg/insect, topical appl. (24 uur)	Coats <i>et al.</i> 1991
	huisvlieg	LD ₅₀ 5,2 µg/insect, top.appl. + pb* (24 u)	Coats <i>et al.</i> 1991
	kakkerlak	LD ₅₀ 700 µg/insect, top.appl. (24 u)	Coats <i>et al.</i> 1991
	kakkerlak	LD ₅₀ 300 µg/insect, top.appl. + pb* (24 u)	Coats <i>et al.</i> 1991
	kakkerlak	LC ₅₀ 23 ppm (mg/liter) begassing (24 u)	Coats <i>et al.</i> 1991
	kattenvlo	LD ₅₀ 3,2 µg/insect, contact + pb*	Hink en Fee, 1986
	<i>Dendroctonus frontalis</i>	LD ₅₀ 0,47 µg/insect contact?	Coyne en Lott, 1976
	<i>Sitophilus oryzae</i>	LC ₅₀ 19 ppm (mg/liter) begassing (24 u)	Coats <i>et al.</i> 1991
limoneen limoneen- dioxide	<i>Dendroctonus frontalis</i>	LD ₅₀ 0,55 µg/insect	Coyne en Lott, 1976
	<i>Dendroctonus frontalis</i>	LD ₅₀ 0,24 µg/insect	Coyne en Lott, 1976
α -terpineol	huisvlieg	LD ₅₀ 310 µg/insect, top.appl. (24 u)	Coats <i>et al.</i> 1991
	kakkerlak	LD ₅₀ 1070 µg/insect, top.appl. (24 u)	Coats <i>et al.</i> 1991
	kakkerlak	LC ₅₀ > 100 ppm (mg/liter) begassing (24 u)	Coats <i>et al.</i> 1991
	<i>Sitophilus oryzae</i>	LC ₅₀ > 100 ppm (mg/liter) begassing (24 u)	Coats <i>et al.</i> 1991
myrceen	huisvlieg	LD ₅₀ 360 µg/insect, top.appl. (24 u)	Coats <i>et al.</i> 1991
	kakkerlak	LD ₅₀ > 1580 µg/insect, top.appl. (24 u)	Coats <i>et al.</i> 1991
	kakkerlak	LC ₅₀ > 100 ppm (mg/liter) begassing (24 u)	Coats <i>et al.</i> 1991
	<i>Sitophilus oryzae</i>	LC ₅₀ > 100 ppm (mg/liter) begassing (24 u)	Coats <i>et al.</i> 1991
	<i>Dendroctonus frontalis</i>	LD ₅₀ 0,62 µg/insect	Coyne en Lott, 1976
linalool	huisvlieg	LD ₅₀ > 100 µg/insect, top.appl. (24 u)	Coats <i>et al.</i> 1991
	huisvlieg	LD ₅₀ 32 µg/insect, top.appl. + pb (1:1)* (24 u)	Coats <i>et al.</i> 1991
	huisvlieg	LD ₅₀ 7,2 µg/insect, top.appl. + pb (1:5)* (24 u)	Coats <i>et al.</i> 1991
	kakkerlak	LD ₅₀ 610 µg/insect, top.appl. + pb* (24 u)	Coats <i>et al.</i> 1991
	kakkerlak	LC ₅₀ 12 ppm (mg/liter) begassing (24 u)	Coats <i>et al.</i> 1991
	<i>Sitophilus oryzae</i>	LC ₅₀ 14 ppm (mg/liter) begassing (24 u)	Coats <i>et al.</i> 1991
pulegone	huisvlieg	LD ₅₀ 166 µg/insect, top.appl. (24 u)	Coats <i>et al.</i> 1991
	huisvlieg	LD ₅₀ 7,7 µg/insect, top.appl. + pb* (24 u)	Coats <i>et al.</i> 1991
	kakkerlak	LD ₅₀ 260 µg/insect, top.appl. (24 u)	Coats <i>et al.</i> 1991
	kakkerlak	LC ₅₀ 9,6 ppm (mg/liter) begassing (24 u) ♀: 17 ppm; ♂: 4,5 ppm	Coats <i>et al.</i> 1991
	<i>Sitophilus oryzae</i>	LC ₅₀ 3,1 ppm (mg/liter) begassing (24 u)	Coats <i>et al.</i> 1991

*pb = piperonylbutoxide (pb) toegevoegd als synergist

recentelijk is gekeken naar de bestrijding van de groene perzikluis *M. persicae* op sla (Aharoni *et al.* 1986). In deze publikatie werd *M. persicae* op sla blootgesteld aan een vacuüm van 2.66 kPa gedurende 52 uur en deze behandeling doodde alle luizen. Hoewel een behandeling onder gereduceerde druk insecticide-werking bezit, is een nadeel dat insecten hier gedurende een langere periode aan blootgesteld moeten worden om een effectieve bestrijding te verkrijgen. Meer is te verwachten van het gebruik van vacuüm in combinatie met begassing. In dit geval zorgt het aanbrengen van vacuüm ervoor dat het begassingmiddel beter en sneller kan penetreren in het product (Stewart *et al.*, 1980), waardoor een effectievere werking van het begassingsmiddel wordt bereikt.

Wassen is alleen effectief voor insecten die zich op het oppervlak van het product bevinden

"Systems approach"

Een benadering die al toegepast wordt voor verscheidene quarantaine insecten op vruchten (Moffitt, 1989; Hara, 1994) zou ook toegepast kunnen worden bij de bestrijding van insecten in snijbloemen. Bij deze benadering wordt plaagbestrijding tijdens en na de teelt verenigd in een systeem, waardoor acceptabele resultaten ontstaan (Wood en Wood, 1991; Coetzee en Wright, 1992; Hata *et al.*, 1992). Dit systeem is gebaseerd op het feit dat bestrijdingsmethoden tijdens de teelt de aantallen plaaginsecten tot een zodanig laag peil reduceren dat een behandeling na de oogst 100% effectief is. Hata *et al.*, (1992) combineerden een twee-wekelijkse insecticide-behandeling van *Alpinia purpurata* tijdens de teelt met een behandeling na de oogst, die bestond uit een insecticidendip van 5 minuten met een combinatie van fluvalinate en insecticide zeep. Door het combineren van deze behandelingen werden alle plaaginsecten verwijderd van het gewas.

Gedacht kan ook worden aan insectenvrije teelt, waarbij het gewas na de oogst vrij is van insecten. Een effectieve biologische of geïntegreerde bestrijding tijdens de teelt is dan noodzakelijk. Optimalisering van geïntegreerde bestrijding tijdens de teelt heeft reeds alle aandacht maar door de nul-tolerantie die noodzakelijk is bij bloemen voor export of voor quarantaine-insecten, lijkt de toepassing van biologische of geïntegreerde bestrijding tijdens de teelt in dit geval moeilijk toepasbaar (Parrella en Jones, 1987; Hansen en Hara, 1994).

2.4.10 Combinaties

Algemeen

Een aantal combinaties die interessant lijken als alternatief voor behandeling van bloemen en planten met methylbromide zijn bijvoorbeeld CA in combinatie met begassing, al dan niet in combinatie met een verhoogde temperatuur. In dit onderdeel worden een aantal combinaties van behandelingen besproken die reeds toegepast of onderzocht worden op commerciële of experimentele schaal.

CA en temperatuur

Om de behandelingsduur van een toepassing met CA te verkorten kan een CA-behandeling gecombineerd worden met hogere temperaturen. In het algemeen geldt dat een verhoging van de temperatuur een toenemende mortaliteit van insecten veroorzaakt (Marzke *et al.*, 1970; Soderstrom *et al.* 1986; White *et al.*, 1988), en dat de LT_{50} (de tijd die nodig is om 50% van de insecten te doden) verkort wordt (Storey, 1975).

Het gebruik van CA's bij hogere temperaturen ($> 32^{\circ}\text{C}$) wordt vermeld door Jay (1986) en Soderstrom *et al.* (1992; 1996a en b). Jay (1986) liet zien dat toediening van 99% CO_2 bij een hoge temperatuur van 32, 38 en 43°C resulteerde in een reductie van de behandelingstijd van 24 uur bij 32°C tot 6 uur bij 38 en 43°C om 99% mortaliteit te bereiken van de roestbruine rijstmeelkever *T. castaneum*. Soderstrom *et al.* (1992) liet zien dat zowel verhoging van de temperatuur (tot $> 38^{\circ}\text{C}$), verhoging van de CO_2 -concentratie en verlaging van de O_2 -concentratie een toename van de mortaliteit veroorzaakten van *T. castaneum* larvae. Carpenter *et al.* (1996) toonden aan dat een temperatuur van 36°C of

hoger een snelle doding van de Nieuw-Zeelandse bloementrips, *T. obscuratus*, veroorzaakte (zie Tabel 2.2). De snelle toename in mortaliteit tussen 24 en 36 °C geeft aan dat er een drempelwaarde is waarboven een effect voor trips optreedt. Deze drempelwaarde is lager dan de waarde die voor veel andere insecten geldt. Uit het artikel van Potter *et al.*, (1994) blijkt dat de interacties tussen temperatuur, CO₂-concentratie en behandelingstijd op de mortaliteit van *T. obscuratus* zeer complex zijn. Het effect van de temperatuur hing hierbij af van de CO₂-concentratie en de behandelingstijd. Ook werd gevonden dat onder lage O₂-condities (2% O₂) bij een temperatuur van 20 °C de mortaliteit hoger was dan bij lagere temperaturen. Dit effect zou een gevolg kunnen zijn van een toegenomen O₂-stress die ontstaat bij hogere temperatuur omdat de stofwisseling van het insect dan hoger is en dus meer O₂ nodig is (Potter *et al.*, 1994).

Het effect van CA kan verschillen bij hoge en lage temperaturen. Het effect van temperatuur kan bovendien verschillend zijn wanneer CA's met hoge CO₂-concentraties en lage O₂-concentraties (dus bestaande uit N₂) vergeleken worden. Adler (1994b) bestudeerde de effecten van temperatuur bij N₂- of CO₂-begassing. Beneden 20 °C zijn CA's met hoge CO₂-concentraties effectiever dan een N₂-atmosfeer: er treedt een snellere doding op bij hoge CO₂-gehalten. Bij temperaturen van 25 °C of hoger is de effectiviteit van CO₂- en N₂-atmosferen vergelijkbaar. Waarschijnlijk worden de toxische eigenschappen van CO₂ minder beïnvloed door lage temperaturen (5-15 °C); doordat CO₂ bij lage temperaturen toch goed oplost in water, kan de hogere passieve opname van CO₂ toch compenseren voor het effect van een lager metabolisme en ademhaling van insecten bij lagere temperaturen. Soderstrom *et al.* (1996a) vonden dat een hoge temperatuur in combinatie met hoge CO₂- of lage O₂-concentraties de mortaliteit van larven van de appelbladroller *Cydia pomonella* verhoogden. Hogere temperaturen (maximum getest was 45 °C) veroorzaakten een snellere doding. Bovendien was een 98% CO₂-atmosfeer effectiever dan een lage O₂-atmosfeer (0,5%). De minimale tijd die nodig was voor 95% mortaliteit was 2,9 uur bij 98% CO₂ en 45 °C.

Voor lagere temperaturen geldt dat insecten in het algemeen minder actief zijn en om die reden zou een hoge CO₂- of lage O₂-concentratie in de atmosfeer een lagere impact kunnen hebben op de mortaliteit van insecten. De meeste experimenten met CA-condities zijn uitgevoerd bij lagere temperaturen van 0 tot 5 °C, omdat het meestal om producten gaat die gedurende langere tijd bij lagere temperaturen opgeslagen of vervoerd worden, zoals bijvoorbeeld bij het vervoer van groente en fruit. Een voorbeeld waarbij CA met een lage temperatuur mogelijk toegepast zou kunnen worden is voor de bestrijding van insecten in snijbloemen tijdens vervoer per schip (Shelton *et al.*, 1996). Deze onderzoekers vonden dat tijdens laboratoriumexperimenten een CA bij 2 °C gedurende een periode van elf dagen significante toename optrad van de mortaliteit van de groene perzikluis en de Californische trips, alhoewel dit effect niet optrad gedurende de opslag tijdens vervoer per schip. Een ander nadeel is de lange periode die nodig is om een significante mortaliteit te verkrijgen.

Tabel 2.4 Gecombineerd effect van CA en begassingsmiddel op insecten die algemeen voorkomen in snijbloemen

insect	CA samenstelling		tempe- ratuur (°C)	tijd voor 100% mortaliteit	plant	publicatie
	O ₂	CO ₂				
<i>Frankliniella occidentalis</i>	1,0	0	1,5% aceetaldehyde	21	4 uur	Aharoni <i>et al.</i> , 1979a
	21,0	0	2,0% aceetaldehyde	21	4 uur	Aharoni <i>et al.</i> , 1979a
	10,4	51,1	2,0% aceetaldehyde	21	4 uur	Aharoni <i>et al.</i> , 1979a
	1,0	0	2,0% aceetaldehyde	21	4 uur	Aharoni <i>et al.</i> , 1979a
	560 mm Hg + 70% CO ₂		1,75% aceetaldehyde	19-21	3 uur	Aharoni <i>et al.</i> , 1980
	30 mm Hg		1,0% ethylformate	19-21	1 uur	Aharoni <i>et al.</i> , 1980
			300 µl/l fosforwaterstof	24	2 uur	Karunaratne <i>et al.</i> , 1997
<i>Heliothrips haemorrhoidalis</i>		lucht			-	
<i>Myzus persicae</i>		lucht	0,25% aceetaldehyde	21	2 uur	Aharoni <i>et al.</i> , 1979b
		lucht	2,0% aceetaldehyde	21	3 uur	Aharoni <i>et al.</i> , 1979b
	10,3	51,1	1,0% aceetaldehyde	21	4 uur	Hartsell <i>et al.</i> , 1979
	13,5	35,7	1,5% aceetaldehyde	21	4 uur	Hartsell <i>et al.</i> , 1979
		lucht	5000-10000 µl/l fosforwaterstof	24	6 uur	Karunaratne <i>et al.</i> , 1997
<i>Epiphyas postvittana</i>	14	33	1000 µl/l fosforwaterstof	24	4 uur	Karunaratne <i>et al.</i> , 1997
		lucht	2500 µl/l fosforwaterstof	24	6 uur	Karunaratne <i>et al.</i> , 1997
<i>Aphis gossypii</i> <i>Myzus persicae</i> <i>Plutella xylostella</i> <i>Tetranychus urticae</i> <i>T. kanzawaii</i> <i>Thrips palmi</i> <i>Trialeurodes vaporariorum</i> <i>Planococcus kraunhiae</i>	5% CO ₂ (balans lucht)		10 g/m ³ methylbromide en 3g/m ³ fosforwaterstof	10 of 15	4 uur	chryasant en orchidee Soma, 1995

CA onder hoge druk

Een recentelijk ontwikkelde effectieve behandelingsmethode voor de disinfestatie van producten als kruiden, specerijen, thee, tabak, bonen en noten bestaat uit het toedienen van CO₂ onder een hoge druk van 20 tot 40 bar. Bij een temperatuur van 20 °C bij 30 bar CO₂ vond in een periode van 1 uur 100% bestrijding plaats van twaalf soorten insecten (Prozell *et al.*, 1996). Het lethale effect lijkt te bestaan uit een combinatie van een toegenomen opslag van CO₂ in de insectenweefsels waardoor de pH afneemt, en de beschadiging van celmembranen nadat de hoge druk opgeheven is (Ulrichs *et al.*, 1996).

Begassing onder hoge CO₂-omstandigheden

Er zijn veel factoren die de toxiciteit en effectiviteit van begassing kunnen beïnvloeden. Als voorbeeld kunnen genoemd worden temperatuur, CO₂- en O₂-concentratie, luchtdruk en luchtvochtigheid. Experimenten die uitgevoerd zijn door Bond (1990) laten zien dat CA de gevoeligheid van insecten voor het begassingsmiddel beïnvloed. Omdat een begassingsmiddel, zoals fosforwaterstof of methylbromide, en een natuurlijk product zoals een etherische olie, als overeenkomst hebben dat ze beide een dampwerking vertonen, kan het onderzoek dat is uitgevoerd naar de werking van begassingsmiddel met en zonder combinaties van andere methoden, informatie verschaffen over de werking van etherische olie, daarom is deze informatie samengevat uit de aanwezige literatuur. Het is reeds lange tijd bekend dat de effectiviteit van begassingsmiddelen bij de bestrijding van insecten verhoogd kan worden door het bijmengen van CO₂ (Kashi en Bond, 1975; Rajendran en Muthu, 1989). In verscheidene publicaties werd gevonden dat de toxiciteit van begassingsmiddelen zoals methylbromide, fosforwaterstof, blauwzuurgas, acrylonitrile, sulfurylfluoride, chloorpicrine en ethyleenoxide tegen graaninsecten toenam wanneer CO₂ werd bijgemengd (Cotton, 1932; Jones, 1938; Aliniabee en Lindgren, 1969; Kashi en Bond, 1975; Bond en Buckland, 1978; Calderon en Leesch, 1983; Desmarchelier, 1984; Desmarchelier en Wohlgemuth, 1984; Rajendran en Muthu, 1989; El-Lakwah *et al.*, 1991; Scheffrahn *et al.*, 1995). De effectievere werking van de combinatie van begassingsmiddel en CO₂ komt tot uitdrukking in de lagere dosis begassingsmiddel die in dat geval nodig is of een verkorting van de behandelingsduur. Bond en Buckland (1978) vonden dat voor een optimale werking van acrylonitrile, een 20-50% CO₂-concentratie bijgemengd moest worden. Een lagere CO₂-concentratie van 10% en een hogere van 90% werkten minder goed. Ren *et al.* (1994) toonden aan dat de optimale concentratie van CO₂ voor een synergistische werking op fosforwaterstof 5-35% bedroeg. Bij commerciële toepassing van methylbromide en CO₂ voor de bestrijding van algemeen voorkomende insecten bij de opslag van granen (*T. castaneum*, *Rhyzopertha dominica*, *S. oryzae*) werd gevonden dat de dosis van methylbromide teruggebracht kon worden tot 1/3 van de dosis die nodig was wanneer methylbromide werd toegepast onder normale atmosferische omstandigheden (Williams *et al.*, 1984). Toepassingen van begassingmiddel en CO₂ in de USSR worden samengevat en besproken door Mordkovich *et al.* (1985). Het merendeel van de begassing vindt plaats met methylbromide. De toepassing wordt steeds vaker gecombineerd met een CO₂-behandeling, waardoor lagere concentraties methylbromide noodzakelijk zijn. Enkele voorbeelden van deze toepassing op praktijkschaal in de USSR zijn de begassing van aardappels geïnfecteerd met de aardappelmot *Phthorimaea operculella*, druiven met daarop de

druifluis *Viteus vitifoliae* (Litvinov *et al.*, 1985) en de bescherming van fruit tegen de oosterse fruitmot *Cydia molesta* (Mordkovich en Vashakmadze, 1983). Een combinatie van fosforwaterstof en CO₂ is gebruikt bij de bestrijding van *V. vitifoliae* op plantmateriaal van druiven (Mordkovich en Chernei, 1993), de San Jose-schildluis *Quadraspidiotus perniciosus* op plantmateriaal van appels en de katoenmot, *Pectinophora gossypiella* op katoen (Mordkovich *et al.*, 1985). Er zijn echter een aantal specifieke voorbeelden bekend waarbij de toevoeging van CO₂ bij het begassingsmiddel geen verhoogde mortaliteit tot gevolg heeft. Een voorbeeld is bij de bestrijding van eieren van de rozenkever, *A. godmani* op citroen, waarbij het bijmengen van CO₂ geen versterkend effect gaf te zien op de werking van methylbromide (Soderstrom *et al.*, 1991). In experimenten met twee graaninsecten, larven van de Moorse warenkever *Tenebroides mauritanicus* en adulten van *S. granarius* werd slechts een kleine verhoging van de mortaliteit gevonden wanneer 30% CO₂ samen werd toegepast met methylbromide (Bond en Buckland, 1978). In een publicatie van Desmarchelier en Wohlgemuth (1984) werd geen effect gevonden van het bijmengen van CO₂ op de werking van fosforwaterstof op eieren en pupae van *Sitophilus*-soorten, hoewel wel een hogere mortaliteit gevonden werd bij *T. castaneum*.

Bij de begassing van snijbloemen, planten en groentengewassen zijn verscheidene experimenten met een combinatiebehandeling van begassingsmiddel en CO₂ uitgevoerd op laboratoriumschaal. De toxiciteit van fosforwaterstof, al dan niet in combinatie met een hoog CO₂-gehalte of de afwezigheid van O₂, is getoetst bij 24 °C op een aantal insecten die algemeen voorkomen op snijbloemen in de USA, waaronder de katrips, *H. haemorrhoidalis* en de groene perzikluis, *M. persicae* (Karunaratne *et al.*, 1997). Tripsen waren gevoeliger voor fosforwaterstof dan bladluizen en bijmengen van CO₂ gaf geen additioneel effect. Bij bladluizen werd daarentegen wel een zeer sterk effect verkregen van het bijmengen van CO₂. Een vier uur durende begassing met fosforwaterstof veroorzaakte geen hogere mortaliteit bij bladluizen, maar de meest effectieve behandeling bleek te bestaan uit een vier uur durende behandeling met fosforwaterstof (1000 µl/l) en 33% CO₂ die als gevolg had dat alle bladluizen gedood werden. Soma (1995) onderzocht de effectiviteit van mengsels van methylbromide en fosforwaterstof in combinatie met CO₂ voor de bestrijding van een aantal plaaginsecten van snijbloemen zoals, *T. palmi*, de kaswittevlieg *T. vaporariorum*, de katoenluis *Aphis gossypii*, de koolmot *Plutella xylostella*, de spintmijt *T. urticae*, *Tetranychus kanzawai* en de wolluis *Planococcus kraunhiae*. Perfecte desinfestering werd bereikt met een behandeling van 10 g/m³ methylbromide, 3 g/m³ fosforwaterstof en 5% CO₂ gedurende een behandeling van drie tot vier uur bij 15 °C. De hoeveelheid methylbromide kon op deze manier teruggebracht worden tot 1/3 van de hoeveelheid die gebruikt werd bij een toegepassing van enkel methylbromide. Aceetaldehyde is een ander begassingsmiddel waarbij het effect van bijmengen van CO₂ is bekeken. In een publicatie van Hartsell *et al.* (1979) trad de hoogste sterfte van de groene perzikluis, *M. persicae* op na het toepassen van aceetaldehyde bij een atmosfeer met 25-60% CO₂. Bij 10% CO₂ werd geen toename in de mortaliteit aangetoond vergeleken met de toepassing van enkel aceetaldehyde. Totale mortaliteit trad op bij een vier uur durende behandeling van 1% aceetaldehyde in 50-60% CO₂ of 1,5% aceetaldehyde in 35% CO₂, vergeleken met respectievelijk 32% en 92% mortaliteit wanneer alleen aceetaldehyde werd toegediend. Een lagere CO₂-

concentratie van 10% had geen additioneel effect op de werking van acetaldehyde.

- *Werkingsmechanisme van een hoog CO₂ gehalte bij begassing* -

Bij hogere CO₂-concentraties wordt de ademhaling van insecten gestimuleerd doordat de stigmata vaker of langer geopend worden (Miller, 1974). Uit studies aan ademhaling van insecten, bleek dat de zuurstofopname geleidelijk toenam wanneer de CO₂-concentratie in de atmosfeer verhoogd werd tot 30%. Bij verdere verhoging van de CO₂-concentratie daalde de opgenomen hoeveelheid O₂ echter weer. De auteurs concludeerden dat in eerste instantie door verhoging van het CO₂-gehalte de zuurstofopname wordt gestimuleerd, maar dat nog hogere concentraties van meer dan 30% directe toxische effecten veroorzaken, wat tot uitdrukking komt in een verlaging van de zuurstofopname (Ren *et al.*, 1994). In een andere publicatie (Kashi en Bond, 1975) werd ook aangetoond dat de zuurstofopname door het insect toenam met 20% wanneer de CO₂-concentratie verhoogd werd naar 4%, maar dat de zuurstofopname niet verder toenam wanneer de CO₂-concentratie werd verhoogd van 4% naar 64%. Naast de zuurstofopname werd ook de opname van het begassingsmiddel gevolgd. Met een stijgende concentratie CO₂ tot een peil van 20% vonden er tegelijkertijd een geleidelijke toename plaats van de opname van fosforwaterstof door het insect tijdens begassing (Kashi en Bond, 1975; Ren *et al.*, 1994). Hierdoor nam de toxiciteit van fosforwaterstof met een factor 3 toe. Kashi en Bond (1975) concluderen dat de toegenomen toxiciteit van fosforwaterstof bij intermediaire CO₂-concentraties te wijten is aan de stimulering van de ademhaling, waardoor een toegenomen interactie van fosforwaterstof bij de "target site" plaatsvindt. Bij verdere verhoging van CO₂-concentratie tot meer dan 30% CO₂ vlakke de fosforwaterstof opname door insecten af en daalt de zuurstofopname. De onderzoekers concluderen dat wanneer de CO₂-concentratie eenmaal boven 30% is, de toxiciteit van fosforwaterstof geleidelijk afneemt door het effect van narcose. De verhoogde toxiciteit vindt bovendien alleen plaats bij een gelijktijdige toediening van fosforwaterstof en CO₂, maar niet wanneer CO₂ voor of na de fosforwaterstofbehandeling toegepast werd. De auteurs concluderen daarom dat de "site of action" voor CO₂ en fosforwaterstof verschillend zijn, omdat er geen aanwijzing is dat er een additief effect is wanneer een behandeling de andere volgt of vooraf gaat. Eerdere resultaten lieten zien bij behandeling met fosforwaterstof, zelfs bij een sublethale dosis, de "site of action" zodanig beschadigd wordt dat vele dagen nodig zijn voor het herstelproces (Bond en Uptis, 1973). Het ontbreken van een effect wanneer CO₂ wordt toegevoegd na de behandeling met fosforwaterstof, samen met de verhoogde toxiciteit die wordt veroorzaakt bij gelijktijdig toediening, impliceert dat CO₂ op een andere plaats aangrijpt dan fosforwaterstof. Een ander effect kan zijn dat in de aanwezigheid van CO₂, de "site of action" van fosforwaterstof gevoeliger wordt voor fosforwaterstof (Kashi en Bond, 1975).

Begassing onder lage O₂-omstandigheden

Het effect van een laag O₂-gehalte op de werking van een begassingsmiddel is bestudeerd door verschillende onderzoekers, maar de gevonden resultaten stemmen niet altijd met elkaar overeen. Verschillende onderzoekers (Bond, 1963; Bond *et al.* 1967; Kashi, 1981a en b) lieten zien dat hoe lager de O₂-concentratie

bij begassing, des te lager de mortaliteit van de insecten. In experimenten van Johnston en Whittle (1994) kon geen effect aangetoond worden van een laag O₂-gehalte tot minimaal 1% op de toxiciteit van fosforwaterstof voor *R. dominica*, hoewel bekend is dat voor de opname en werking van fosforwaterstof zuurstof nodig is. Aceetaldehyde is een ander begassingsmiddel waarbij het effect van een laag O₂-gehalte is bekeken. In een publicatie van Hartsell *et al.* (1979) trad geen hogere sterfte van de groene perzikluis, *M. persicae* op na het toepassen van aceetaldehyde in combinatie met 1-2% O₂ wanneer dit vergeleken werd met de sterfte bij aceetaldehyde onder normale atmosferische omstandigheden.

Begassing bij lage of hoge temperaturen

De toxiciteit van fosforwaterstof bij de desinfectatie van opgeslagen graan nam af wanneer de temperatuur verlaagd werd naar 5 °C (Bond, 1990). Mueller (1994) concludeerde dat een combinatie van een lage fosforwaterstof-concentratie (65-100 ppm), hoge temperatuur (32-37 °C) en een CO₂-concentratie van 4 tot 6% perspectieven biedt als een vervanger van methylbromide-begassing in opslag van granen. Er werd onder deze omstandigheden 100% mortaliteit van toetsinsecten verkregen in een behandelingstijd van 24 uur of minder. In een studie van Soderstrom *et al.* (1991) werd gevonden dat wanneer de begassing met methylbromide plaatsvond bij hogere temperaturen de mortaliteit van eieren van de rozenkever, *A. godmani* toenam. Hierdoor kon de behandelingstijd die nodig is voor een effectieve bestrijding verkort worden.

Begassing onder lage druk of vacuüm

Verschillende aspecten van begassing onder vacuüm van insecten in graanopslag zijn uitgebreid bestudeerd van 1930 tot 1970 en een review van deze literatuur wordt gegeven door Bhambhani (1964) en Monro (1969). Wanneer begassing plaatsvindt onder vacuüm kan het middel beter en sneller penetreren in het product, waardoor een effectievere doding plaatsvindt, vooral van insecten die beter beschermd zijn doordat ze goed verborgen zitten in bijvoorbeeld bloemen en groeipunten (Bond en Monro, 1967). Bovendien kan een gebrek aan O₂ een factor zijn die de gevoeligheid van insecten voor het begassingsmiddel doet toenemen en kan meer van het middel geabsorbeerd worden wanneer dit wordt toegediend onder vacuüm dan onder normale atmosferische druk (Bhambhani, 1964). Verder bleek uit verschillende experimenten dat een methode waarbij het vacuüm wordt opgeheven maar de begassing voortgezet wordt onder atmosferische druk, in het algemeen effectiever is dan wanneer het vacuüm tot het eind van de begassing wordt volgehouden.

Een behandeling met een combinatie van methylbromide, vacuüm en CO₂ is getoetst door Calderon en Leesch (1983). In deze experimenten werd aangetoond dat de gevoeligheid voor methylbromide van twee graaninsecten, *T. castaneum* en *S. oryzae*, toenam met een factor 2 wanneer methylbromide toegediend werd in combinatie met 20% CO₂ onder lage druk.

Ook bij de begassing van verpakt product, zoals bijvoorbeeld bij de bestrijding van de groene perzikluis (*M. persicae*) op sla in commerciële polyethyleenverpakking, werd aangetoond dat middelen als aceetaldehyde (Stewart *et al.*, 1980) en ethylformaat (Stewart en Aharoni, 1983), beter kunnen penetreren in de geperforeerde verpakkingen wanneer een vacuüm wordt toegepast; onder normale atmosferische druk daarentegen vindt slechte penetratie plaats.

2.5 CA/MA BEWAARONDERZOEK AAN SNIJBLOEMEN

2.5.1 Overzichtsartikelen

Bewaring van snijbloemen onder "controlled atmosphere" (CA) en "modified atmosphere" (MA) is rond 1980 een belangrijk aandachtspunt geweest van bewaaronderzoek bij snijbloemen. In verschillende overzichtsartikelen wordt dit onderwerp besproken.

Rogers (1973) noemt twee redenen voor CA-bewaring. Verminderde ademhaling, waardoor minder verbruik van koolhydraten optreedt en remming van de werking van ethyleen. Een optimale zuurstofconcentratie (O_2) voor bewaring ligt beneden 1%, terwijl voor de optimale kooldioxide (CO_2) concentratieniveaus van 2 tot 20% worden genoemd.

Staby (1977) geeft een meer gedetailleerd overzicht van onderzoek aan CA-bewaring van bloemen. Thornton was in 1930 de eerste die over dit onderwerp publiceerde met werk aan rozen.

Staby vermeldt op basis van verschillende auteurs de volgende effecten:

- Een hogere CO_2 -concentratie vertraagde de bloemopening bij roos, maar de effecten waren per cultivar verschillend
- Bij concentraties boven 25% trad schade op
- Bij roos verkleuren de petalen
- Bij anjer werd geconstateerd dat minder aantasting door Botrytis optrad

Kortdurende CA-bewaring had ten opzichte van gekoeld bewaren geen voordelen. De hoogste, door Staby genoemde, CO_2 -concentratie is 30%.

Halevy en Mayak (1981) constateren dat CA bewaring van snijbloemen, in tegenstelling tot vruchten en groenten, geen algemeen gebruik is. Goszczyńska en Rudnicki (1988), die alle aspecten van bewaring van snijbloemen bespreken, komen tot dezelfde conclusie. Voor de mogelijk positieve werking van CA-condities op planten noemen zij nog dezelfde argumenten als Rogers (1973).

De genoemde overzichtsartikelen hebben gemeen, dat de auteurs kijken naar positieve effecten van CA-condities op de bewaring van snijbloemen, met name verlenging van de mogelijke bewaarduur heeft hun aandacht. In Nederland is door Harkema (1984) onderzoek gedaan aan CA-bewaring van snijbloemen. Zijn conclusies sluiten aan op de overzichtsartikelen.

Op basis van de literatuur is te concluderen:

- Er te veel verschillen zijn tussen de producten om één algemene methode te kunnen adviseren.
- CA-bewaring geeft geen verbetering ten opzichte van koeling
- CO_2 -concentraties bij langere behandeling boven de 30% zijn schadelijk
- De beschrijving van de schade is in veel artikelen onduidelijk
- O_2 -verlaging heeft minder effect op verlenging bewaarduur dan CO_2 -verhoging

Omdat de positieve effecten op lange bewaring te gering zijn heeft dit onderzoek bij siergewassen geen vervolg gekregen.

2.5.2 CA-bewaring en Botrytis

Bij rozen is aantasting door *Botrytis cinerea* een belangrijke vorm van schade tijdens transport en afzet. Phillips *et al.* (1985) pasten CA-condities toe om de aantasting van roos door deze schimmel te verminderen. Bewaring waarbij de CO₂-concentratie in lucht werd verhoogd tot 20 of 30% had een duidelijk remmend effect op de aantasting door *Botrytis cinerea*. Zes dagen bewaring had bij de cultivar 'Samantha' een negatief effect op de houdbaarheid. Bij andere cultivars werd dit niet geconstateerd, maar het remmende effect op Botrytis heeft hierbij waarschijnlijk een groter positief effect op het vaasleven gehad, dan dat de fysiologische schade als gevolg van CO₂ een negatieve uitwerking had. Hammer *et al.* (1990) constateren dat zeven dagen bewaring bij meer dan 10% CO₂ in lucht bladverbranding geeft. Zij constateren opnieuw dat bewaring bij verhoogde CO₂-concentraties de bloemknopontwikkeling vertraagd. De CO₂-behandeling had geen effect op het versgewicht van de rozen. Het positieve effect van CO₂, remming van de aantasting door *Botrytis cinerea*, is een gunstig neveneffect voor toepassing van een alternatieve behandeling onder andere bij roos. Roos is het product dat het meeste wordt begast en gevoelig is voor Botrytis.

2.5.3 CA bewaring en ethyleen

Ethyleen is een bekend verouderingshormoon, dat op de naogstkwaliteit van een groot aantal snijbloemen een negatief effect heeft. Het bekendste product hiervoor is anjer. Bewaring bij een verhoogde CO₂-concentratie heeft een remmend effect op de veroudering van anjer door ethyleen (Halevy en Mayak, 1981). Mathooko (1996) bespreekt de mogelijke werkingsmechanismen van CO₂ in de regulatie van de ethyleen biosynthese. Volgens Mathooko werkt extra CO₂ remmend op de productie van ACC en de oxidatie hiervan tot ethyleen. Hierdoor zal er geen autocatalyse van ethyleen optreden. Dit positieve effect zal na het opheffen van de CA-omstandigheden direct verloren gaan.

2.6 ONDERZOEK NAAR DESINFESTERING VAN BLOEMEN EN PLANTEN IN DE LAATSTE JAREN

In Nederland heeft na het werk van Wit en Van de Vrie (1985b) vrijwel geen onderzoek naar desinfestering van bloemen meer plaatsgevonden. In Amerika (Cantwell *et al.*, 1995; Joyce en Reid, 1986) en Nieuw-Zeeland (Irving en Honnor, 1994) is wel onderzoek gedaan met het doel om bloemen en planten middels CO₂-begassing insectenvrij te maken. Roos en anjer bleken redelijk tolerant voor hoge CO₂-concentraties gedurende maximaal 24 uur (Tabel 2.5). Langere blootstelling is in het algemeen schadelijk.

In een eigen experiment met hoge CO₂- en lage O₂-concentraties gedurende twee uur werd geen schadelijk effect op roos en chrysant gevonden. Per product zal steeds nagegaan moeten worden waar de grens van schadelijkheid ligt (Tabel 2.6).

Tabel 2.5 Visuele beoordeling van roos en anjer na een behandeling met 100% CO₂ voorafgegaan door en gevolgd door 7 dagen bewaring in lucht bij 0 °C en 6 uur bij 20 °C

CO ₂ -behandeling duur in uren	roos temperatuur in °C			anjel temperatuur in °C		
	0	10	20	0	10	20
4	7,5	9	9	9	9	8
8	6,5	8	9	9	8	8
16	6,5	8	8	9	9	7
24	4,5	7,5	8	9	9	7

9 = uitstekend - 1 = onacceptabel
bron : Cantwell *et al.* 1995

Tabel 2.6 Reactie diverse gewassen op 60% CO₂ in lucht gedurende 7 dagen bij 1°C

gewas	schadebeeld na bewaring	op de vaas
alstroemeria	slap blad	bruine bloemen en bladeren
anjel	geen	geen
chrysant	slap blad bruine bloemen	verdroogde bladeren
cyclamen	geen	blauwe en verschrompelde bloemen
gerbera	verkleurde bloembladen geknikte stelen ook bij lagere concentraties	geen vaasgegevens
gypsophila	geen	draaien van de bloemsteel verdroogde bloem
iris	geen	bruine necrotische bladvlekken donkere bloemen, kromme steel
lelie	geen	tragere bloemopening
narcis	geen	geremde bloemopening
roos	verkleurde bloembladen	geremde bloemopening, verkleuring, bruin worden en verdrogen bloemblad

bron : Joyce en Reid (1986)

2.7 LITERATUUR

- Adler, C.S., 1994a. Carbon dioxide - more rapidly impairing the glycolytic energy production than nitrogen? In: Highley, E., Wright, E.J., Banks, H.J. and Champ, B.R. (eds.). Stored product protection: 7-10. Proc. 6th intl. working conf. stored-product protection, 17-23 april 1994, Canberra, Australia, 1274 pp.
- Adler, C.S., 1994b. A comparison of the efficacy of CO₂-rich and N₂-rich atmospheres against the granary weevil *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). In: Highley, E., Wright, E.J., Banks, H.J. and Champ, B.R. (eds.). Stored product protection: 11-15. Proc. 6th intl. working conf. stored-product protection, 17-23 april 1994, Canberra, Australia, 1274 pp.
- Aharoni, Y., Apelbaum, A. and Copel, A., 1986. Use of reduced atmospheric pressure for control of the green peach aphid on harvested head lettuce. HortScience 21: 469-470.
- Aharoni, Y., Hartsell, P.L., Stewart, J.K. and Young, D.K., 1979b. Control of western flower thrips on harvested strawberries with acetaldehyde in air, 50% carbon dioxide or 1% oxygen. Journal of Economic Entomology 72: 820-822.
- Aharoni, Y. and Stadelbacher, G.J., 1973. The toxicity of acetaldehyde vapors to postharvest pathogens of fruits and vegetables. Phytopathology 63: 544-545.
- Aharoni, Y., Stewart, J.K. and Guadagni, D.G., 1981. Modified atmospheres to control western flower thrips on harvested strawberries. Journal of Economic Entomology 74: 338-340.
- Aharoni, Y., Stewart, J.K., Guadagni, D.G. and Mon, T.R., 1980. Thrips mortality and strawberry quality after vacuum fumigation with acetaldehyde or ethyl formate Journal of the American Society for Horticultural Science 105: 926-929.
- Aharoni, Y., Stewart, J.K., Hartsell, P.L. and Young, D.K., 1979a. Acetaldehyde-A potential fumigant for control of the green peach aphid on harvested head lettuce. Journal of Economic Entomology 72: 493-495.
- Akamine, E.K. and Goo, T.S., 1977. Effects of gamma irradiation on shelf life extension of fresh papayas (*Carica papaya* L. var. Solo). Research Bulletin 165. Hawaii Agricultural Experiment Station, University of Hawaii, 23 pp.
- Alexeef, G.V. and Kilgore, W.W., 1983. Methyl bromide. Residue Reviews 88: 101-153.
- Aliniazee, M.T., 1972. Susceptibility of the confused and red flour beetles to anoxia produced by helium and nitrogen at various temperatures. Journal of Economic Entomology 65: 60-64.
- Aliniazee, M.T. and Lindgren, D.L., 1969. Effect of carbon dioxide on toxicity of hydrocyanic acid and methylbromide to adults of confused flour beetles and granary weevil at two different temperatures. Journal of Economic Entomology 62: 904-906.
- Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), 1986. Section VI, T300 - Schedules for miscellaneous plant products. PPQ Treatment Manual. US Department of Agriculture, Washington, DC.
- Annis, P.C., 1987. Towards rational controlled atmosphere schedules: a review of current knowledge. In: Donahaye, E. and Navarro, S. (eds.). Proceedings of the 4th international working conference on stored-product protection: 128-148. Tel Aviv, Israel, 1987.
- Annis, P.C., 1990. Requirements for fumigation and controlled atmospheres as options for pest and quality control in stored grain. In: Champ, B.R., Highley, E. and Banks, H.J. (eds.). Fumigation and controlled atmosphere storage in grain: 70-82. Proceedings of an international conference, Singapore, 14-18 February 1989. ACIAR Proceedings, No. 25.
- Anwar, M., Chatha, N., Ohinata, K. and Harris, E.J., 1975. Gamma irradiation of melon fly: laboratory studies of the sexual competitiveness of flies treated as pupae 2 days before eclosion or as 2-day-old adults. Journal of Economic Entomology 68: 733-735.
- Armstrong, J.W., 1982. Development of a hot-water immersion quarantine treatment for Hawaiian-grown 'Brazilian' bananas. Journal of Economic Entomology 75: 787-790.

- Bailey, S.W. and Banks, H.J., 1980. A review of recent studies of the effects of controlled atmospheres on stored products pests. In: Shejbal, J. (ed.). *Controlled atmosphere storage of grain*: 101-108. Elsevier, Amsterdam, 608 pp.
- Banks, H.J., 1979. Recent advances in the use of modified atmospheres for stored product pest control. In: *Proceedings of the 2nd international working conference on stored-product entomology*: 198-217. Sept. 10-16, 1978, Ibadan, Nigeria. USDA, Savannah, Georgia
- Banks, H.J. and Annis, P.C., 1990. Comparative advantages of high CO₂ and low O₂ types of controlled atmospheres for grain storage. In: Calderon, M. and Barkai-Golan, R. (eds.). *Food preservation by modified atmospheres*: 93-120. CRS, Boca-Raton, 402 pp.
- Bell, C.H., 1976a. The tolerance of developmental stages of four stored-product moths to phosphine. *Journal of Stored Products Research* 12: 77-86.
- Bell, C.H., 1976b. The tolerance of immature stages of four stored-product moths to methyl bromide. *Journal of Stored Products Research* 12: 1-10.
- Bell, C.H., 1984. Effects of oxygen on the toxicity of carbon dioxide to storage insects. In: Ripp, B.E., Banks, H.J., Bond, E.J., Calverley, D.J., Jay, E.G. and Navarro, S. (eds.). *Practical aspects of controlled atmosphere and fumigation in grain storages*: 67-74. *Proceedings of a international symposium*, 11-22 April 1983, Perth, Western Australia. Elsevier, Amsterdam.
- Benschoter, C.A., 1987. Effects of modified atmospheres and refrigeration temperatures on survival of eggs and larvae of the Caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in laboratory diet. *Journal of Economic Entomology* 80: 1223-1224.
- Bhambhani, H.J., 1964. Recent advances in vacuum fumigation. *World Review of Pest Control* 3: 53-56.
- Bolter, C.J. and Chefurka, W., 1990a. The effect of phosphine treatment on superoxide dismutase, catalase and peroxidase in the granary weevil, *Sitophilus granarius*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 36: 52-60.
- Bolter, C.J. and Chefurka, W., 1990b. Extramitochondrial release of hydrogen peroxide from insect and mouse liver mitochondria using the respiratory inhibitors phosphine, myxothiazol and antimycin and spectral analysis of inhibited cytochromes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 278: 65-72.
- Bond, E.J., 1956. The effect of methyl bromide on the respiration of the cadelle *Tenebroides mauritanicus* (L.) (Coleoptera: Ostomidae). *Canadian Journal of Zoology* 34: 405-415.
- Bond, E.J., 1961. The action of fumigants on insects. II - The effect of hydrogen cyanide on the activity and respiration of certain insects. *Canadian Journal of Zoology* 39: 437-444.
- Bond, E.J., 1963. The action of fumigants on insects - the effects of oxygen on the toxicity of fumigants to insects. *Canadian Journal of Biochemical Physiology* 41: 993-1114.
- Bond, E.J., 1978. Toxicity of mixtures of methyl bromide and phosphine to insects. *Journal of Economic Entomology* 71: 341-342.
- Bond, E.J., 1990. Current scope and usage of fumigation and controlled atmospheres for pest control in stored products. In: Champ, B.R., Highley, E. and Banks, H.J. (eds.). *Fumigation and controlled atmosphere storage in grain*: 20-29. *Proceedings of a international conference*, Singapore, 14-18 February 1989. ACIAR Proceedings, No. 25.
- Bond, E.J. and Buckland, C.T., 1978. Control of insects with fumigants at low temperatures: toxicity of fumigants in atmospheres of carbon dioxide. *Journal of Economic Entomology* 71: 307-309.
- Bond, E.J. and Buckland, C.T., 1979. Development of resistance of carbon dioxide in the granary weevil. *Journal of Economic Entomology* 72:770-771.
- Bond, E.J. and Monro, H.A.U., 1967. The role of oxygen in the toxicity of fumigants to insects. *Journal of Stored Products Research* 3: 295-310.
- Bond, E.J., Monro, H.A.U. and Buckland, C.T., 1967. The influence of oxygen on the toxicity of fumigants to *Sitophilus granarius*. *Journal of Stored Products Research* 3: 289-294.

- Bond, E.J. and Morse, P.M., 1982. Joint action of methyl bromide and phosphine on *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Stored Products Research* 18: 83-94.
- Bond, E.J., Robinson, J.R. and Buckland, C.T., 1969. The toxic action of phosphine. *Journal of Stored Products Research* 5: 289-298.
- Bond, E.J. and Uptis, E., 1973. Response of three insects to sublethal doses of phosphine. *Journal of Stored Products Research* 8: 307-313.
- Brain, K. and Cornor, B., 1988. The toxicity of pesticides to wild life. Miscellaneous Publication No 8/88, Western Australian Department of Agriculture, South Perth, W.A. 6151.
- Burditt, A.K., Jr., Hinman, F.G. and Balock, J.W., 1963. Screening of fumigants for toxicity to eggs and larvae of the Oriental fruit fly and Mediterranean fruit fly. *Journal of Economic Entomology* 56: 261-265.
- Burditt, A.K. and Hungate, F.P., 1988. Gamma irradiation as a quarantine treatment for cherries infested by Western cherry fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology* 81: 859-862.
- Butler, G.D., Jr., Henneberry, T.J., Stansly, P.A. and Schuster, D.J., 1993. Insecticidal effects of selected soaps, oils and detergents on the sweetpotato whitefly: (Homoptera: Aleyrodidae). *Florida Entomologist* 76: 161-167.
- Calderon, M. and Leesch, J.G., 1983. Effect of reduced pressure and CO₂ on the toxicity of methyl bromide to two species of stored-product insects. *Journal of Economic Entomology* 76: 1125-1128.
- Cantwel, M.I., M.S. Reid, A. Carpenter and X. Nie, 1995. Short-term and long-term high carbon dioxide treatments for insect disinfestation of flowers and leafy vegetables. In: L. Kushwaha, R. Serwatowski and R. Brook (eds). *Harvest and postharvest technologies for fresh fruits and vegetables*. 287-292.
- Carlson, S.D., 1967. Fumigation of the confused flour beetle with methyl bromide at high and low rates of respiration. *Journal of Economic Entomology* 60: 684-687.
- Carpenter, A. and Stocker, A., 1992. Enviro-sols as postharvest fumigants for asparagus and cut flowers. *Proc. 45th New Zealand Plant Protection Conf. 1992: 21-26*. New Zealand Plant Protection Society, Rotorua, New Zealand.
- Carpenter, A., Wright, S and Lash, P., 1996. Response of adult New Zealand flower thrips, *Thrips obscuratus* (Thysanoptera: Thripidae) to high carbon dioxide and low oxygen atmospheres at various temperatures. *Bulletin of Entomological Research* 86: 217-221.
- Champ, B.R. and Dyte, C.E., 1976. Report of the FAO global survey of pesticide susceptibility of stored grain pests. *FAO Plant Production and Protection Service No. 5*. FAO, Rome.
- Chaudhry, M.Q., 1991. Biochemical mode of action of phosphine, and mechanisms of resistance in two species of stored-product beetles. PhD thesis, 1991, University of Reading, UK, 180 pp.
- Chaudhry, M.Q., 1997. A review of the mechanisms involved in the action of phosphine as an insecticide and phosphine resistance in stored product insects. *Pesticide Science* 49: 213-228.
- Chaudhry, M.Q., MacNicoll, A.D., Mills, K.A. and Price, N.R., 1996. The potential of methylphosphine as a fumigant for the control of phosphine-resistant strains of four species of stored-product insects. *Phytoparasitica* 24: 216. Abstracts of papers presented at the international conference on controlled atmosphere and fumigation (CAF) in stored products. April 21-26, 1996, Cyprus International Conference Centre, Nicosia, Cyprus.
- Chaudhry, M.Q. and Price, N.R., 1989. Biochemistry of phosphine uptake in susceptible and resistant strains of two species of stored product beetles. *Comparative Biochemistry and Physiology C; Comparative Pharmacology and Toxicology* 94C: 425-430.
- Chaudhry, M.Q. and Price, N.R., 1990. Insect mortality at doses of phosphine which produce equal uptake in susceptible and resistant strains of *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae). *Journal of Stored Products Research* 26: 101-108.

- Chaudhry, M.Q. and Price, N.R., 1992. Comparison of the oxidant damage induced by phosphine and the uptake and tracheal exchange of phosphorus-32-radiolabelled phosphine in the susceptible and resistant strains of *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 42: 167-179.
- Chefurka, W., Kashi, K.P. and Bond, E.J., 1976. The effect of phosphine on electron transport in mitochondria. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 6: 65-84.
- Coats, J.R., Karr, L.L. and Drewes, C.D., 1991. Toxicity and neurotoxic effects of monoterpenoids in insects and earthworms. In: Hedin, P.A. (ed.). *Naturally occurring pest bioregulators*: 305-316. ACS Symposium series 449, 456 pp.
- Coetzee, J.H. and Wright, M.G., 1992. Post-harvest treatment and disinfestation of protea cut flowers. *Protea News* 12: 19-20.
- Cotton, R.T., 1932. The relation of respiratory metabolism of insects to their susceptibility to fumigants. *Journal of Economic Entomology* 25: 1088-1103.
- Couey, H.M. and Hayes, C.F., 1986. Quarantine procedure for Hawaiian papaya using fruit selection and a two-stage hot-water immersion. *Journal of Economic Entomology* 79: 1307-1314.
- Coyne, J.F. and Lott, L.H., 1976. Toxicity of substances in pine oleoresin to southern pine beetles. *Journal of the Georgia Entomological Society* 11: 301-305.
- Criley, R.A. and Broschat, T.K., 1992. Heliconia: botany and horticulture of a new floral crop. *Horticultural Reviews* 14: 1-55.
- Delate, K.M., Brecht, J.K. and Coffelt, J.A., 1990. Controlled atmosphere treatments for control of sweetpotato weevil (Coleoptera: Curculionidae) in stored tropical sweet potatoes. *Journal of Economic Entomology* 83: 461-465.
- Desmarchelier, J.M., 1984. Effect of carbon dioxide on the efficacy of phosphine against different stored-product insects. *Mitteilungen Biologische Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft* 220: 57 pp.
- Desmarchelier, J.M. and Wohlgemuth, R., 1984. Response of several species of insects to mixtures of phosphine and carbon dioxide. In: Ripp, B.E., Banks, H.J., Bond, E.J., Calverley, D.J., Jay, E.G. and Navarro, S. (eds.). *Practical aspects of controlled atmosphere and fumigation in grain storages*: 75-81. Proc. Intl. Symp. 11-22 April 1983, Perth, Western Australia.
- Dohino, T. and Masaki, S., 1995. Effects of electron beam irradiation on comstock mealybug, *Pseudococcus comstocki* (Kuwana) (Homoptera: Pseudococcidae). *Research Bulletin of the Plant Protection Service, Japan* 31: 31-36
- Dohino, T. and Tanabe, K., 1993. Electron beam irradiation of eggs and adult females of two spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Research Bulletin of the Plant Protection Service, Japan* 29: 11-18.
- Dohino, T. and Tanabe, K., 1994. Electron beam irradiation of immature stages and adult males of two spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Research Bulletin of the Plant Protection Service, Japan* 30: 27-34.
- Dohino, T., Tanabe, K. and Hayashi, T., 1994. Comparison of lethal effects of electron beams and gamma rays on eggs of two spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Research Bulletin of the Plant Protection Service, Japan* 30: 69-73.
- Ducom, V., 1996. The efficacy of methylisothiocyanate against *Cydia pomonella* on apple. *Phytoparasitica* 24: 246. Abstracts of papers presented at the international conference on controlled atmosphere and fumigation (CAF) in stored products. April 21-26, 1996, Cyprus International Conference Centre, Nicosia, Cyprus
- Fisher, K.T., 1981. Fruit fly under attack from the sterile-insect-technique. *Journal of Agriculture, Western Australia* 22: 51-52.
- Fleurat-Lessard, F., 1990. Effect of modified atmospheres on insects and mites infesting stored products. In: Calderon, M. and Barkai-Golan, R. (eds.). *Food preservation by modified atmospheres*: 21-38. CRS, Boca-Raton, 402 pp.

- Fleurat-Lessard, F. and Le Torc'h, J.M., 1991. Influence de la teneur en oxygene sur la sensibilité de certains stades juveniles de *Sitophilus oryzae* et *Sitophilus granarius* au dioxyde de carbone. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 58: 37-47.
- Gaunce, A.P., Morgan, C.V.G. and Meheriuk, M., 1982. Control of tree fruit insects with modified atmospheres. In: Richardson, D.G. and Meheriuk, M. (eds.). *Controlled atmospheres for storage and transport of perishable agricultural commodities*: 383-390. Proceedings of the 3th controlled atmosphere research conference, Oregon State University School of Agriculture, Symposium Series 1. Timber Press, Beaverton, Oregon.
- Georghiou, G.P., 1994. Principles of insecticide resistance management. *Phytoprotection* 75 (Suppl.): 51-59.
- Goszczyńska, D.M., and R.M. Rudnicki, 1988. Storage of cut flowers. *Horticultural Reviews* 10:35-62.
- Goodwin, S. and Wellham, T.M., 1990. Gamma irradiation for disinfestation of cut flowers infested by two-spotted spider mite (Acarina: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology* 83: 1455-1458.
- Halevy, A.H. and S. Mayak, 1981. Senescence and postharvest physiology of cut flowers - part 2. *Horticultural Reviews* 3: 59-143.
- Halverson, S.L., Burkholder, W.E., Bigelow, T.S., Nordheim, E.V. and Misenheimer, M.E., 1996. High-power microwave radiation as an alternative insect control method for stored products. *Journal of Economic Entomology* 89: 1638-1648.
- Hamlen, R.A. and Henley, R.W., 1979. Pest control and phytotoxicity on indoor ornamental plants with dichlorvos fumigation. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 104: 136-138.
- Hammer, P.E., S.F. Yang, M.S. Reid and J.J. Marois, 1990. Postharvest control of *Botrytis cinerea* infections on cut roses using fungistatic storage atmospheres. *J.Amer.Soc.-Hort.Sci* 115(1):102-107.
- Hansen, J.D., Chan, H.T. Jr., Hara, A.H. and Tenbrink, V.L., 1991a. Phytotoxic reaction of Hawaiian cut flowers and foliage to hydrogen cyanide fumigation. *HortScience* 26: 53-56.
- Hansen, J.D. and Hara, A.H., 1994. A review of postharvest disinfestation of cut flowers and foliage with special reference to tropicals. *Postharvest Biology and Technology* 4: 193-212.
- Hansen, J.D., Hara, A.H., Chan, H.T.Jr. and Tenbrink, V.L., 1991b. Efficacy of hydrogen cyanide fumigation as a treatment for pests of Hawaiian cut flowers and foliage after harvest. *Journal of Economic Entomology* 84: 532-536.
- Hansen, J.D., Hara, A.H. and Tenbrink, V.L., 1992. Vapor heat: A potential treatment to disinfest tropical cut flowers and foliage. *HortScience* 27: 139-143.
- Hara, A.H., 1994. Ornamentals and flowers. In: Paull, R.E. and Armstrong, J.W. (eds.). *Insect pests and fresh horticultural products: treatments and responses*: 329-347. CAB international, Wallingford, UK, 360 pp.
- Hara, A.H., Hata, T.Y., Tenbrink, V.L. and Hu, B.K.S., 1995. Postharvest treatments against western flower thrips, (*Frankliniella occidentalis* (Pergande)) and melon thrips (*Thrips palmi* Karny) on orchids. *Annals of Applied Biology* 126: 403-415.
- Harkema, H., 1984. CA-bewaring van enkele snijbloemen. Sprenger Instituut, Wageningen. Interimrapport 38. pp 14.
- Hartsell, P.L., Aharoni, Y., Stewart, J.K. and Young, D.K., 1979. Acetaldehyde toxicity to the green peach aphid on harvested head lettuce in high carbon dioxide or low oxygen atmospheres. *Journal of Economic Entomology* 72: 904-905.
- Harvey, J.M., Harris, C.M. and Hartsell, P.L., 1989. Tolerances of California nectarine cultivars to methyl bromide quarantine treatments. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 114: 626-629.

- Hata, T.Y., Hara, A.H., Hu, B.K.S., Kaneko, R.T. and Tenbrink, V.L., 1993. Field sprays and insecticidal dips after harvest for pest management of *Frankliniella occidentalis* and *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae) on orchids. *Journal of Economic Entomology* 86: 1483-1489.
- Hata, T.Y., Hara, A.H., Jang, E.B., Imaino, L.S., Hu, B.K.S. and Tenbrink, V.L., 1992. Pest management before harvest and insecticidal dip after harvest as a systems approach to quarantine security for red ginger. *Journal of Economic Entomology* 85: 2310-2316.
- Hayashi, T. and Todoriki, S., 1996. Sugars prevent the detrimental effects of gamma irradiation on cut chrysanthemums. *HortScience* 31:117-119.
- Hink, W.F. and Fee, B.J., 1986. Toxicity of D-limonene, the major component of citrus peel oil, to all life stages of the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera; Pulicidae). *Journal of Medical Entomology* 23: 400-404.
- Hobbs, S.K and Bond, E.J., 1989. Response of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) to sublethal treatments with phosphine. *Journal of Stored Products Research* 25: 137-146.
- Hole, B.D., Bell, C.H., Mills, K.A. and Goodship, G., 1976. The toxicity of phosphine to all developmental stages of 13 species of stored product beetles. *Journal of Stored Products Research* 12: 235-244.
- Houck, L.G., Jenner, J.F., Moreno, D.S. and Mackey, B.E., 1989. Permeability of polymer film wraps for citrus fruit fumigated with hydrogen cyanide to control California red scale. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 114: 287-292.
- Huque, H, 1963. Preliminary studies on irradiation of some common stored-grain insects in Pakistan. In: Radiation and radioisotopes applied to insects of agricultural importance: 455-463. Proceedings IAEA and FAO Symposium, 22-26 april 1963, Athens, Greece.
- Irving, D.E., and L. Honnor, 1994. Carnations: effects of high concentrations of carbon dioxide on flower physiology and longevity. *Postharv. Biol. Technol.* 4: 281-287.
- Jay, E.G., 1971. Suggested conditions and procedures for using carbon dioxide to control insects in grain storage facilities. USDA, ARS, Bulletin 51-56: 6 pp.
- Jay, E.G., 1986. Factors affecting the use of carbon dioxide for treating raw and processed agricultural products. In: GASCA seminar on fumigation technology in developing countries: 173-189. Tropical development and research institute Slough, UK.
- Jessup, A.J., 1990. Gamma irradiation as a quarantine treatment for sweet cherries against Queensland fruit fly. *HortScience* 25: 456-458.
- Johnston, F.M. and Whittle, C.P., 1994. Effects of low oxygen phosphine fumigations on adult *Rhyzopertha dominica* In: Highley, E., Wright, E.J., Banks, H.J. and Champ, B.R. (eds.). *Stored product protection: 104-107*. Proc. 6th intl. working conf. stored-product protection, 17-23 april 1994, Canberra, Australia. CAB International, Wallingford, UK, 1274 pp., 2 volumes. ISBN 0-85198-932-2.
- Jones, R.M., 1938. Toxicity of fumigant-CO₂ mixtures to the red flour beetle. *Journal of Economic Entomology* 31: 298-308.
- Joyce, D.C. and M.S. Reid, 1986. Effect of pathogen-suppressing modified atmospheres on stored cut flowers. In : Blankenship M.S. (ed). *Controlled atmospheres for storage and transport of perishable agricultural commodities*. 185-198.
- Karunaratne, C., Moore, G.A., Jones, R. and Ryan, R., 1997. Phosphine and its effect on some common insects in cut flowers. *Postharvest Biology and Technology* 10: 255-262.
- Kashi, K.P., 1981a. Responses of five species of stored product insects to phosphine in oxygen deficient atmospheres. *Pesticide Science* 12: 111-115.
- Kashi, K.P., 1981b. Toxicity of phosphine to five species of stored product insects to phosphine in atmospheres of air and nitrogen. *Pesticide Science* 12: 116-121.
- Kashi, K.P., 1982. Dose mortality responses of five species of stored products insects to phosphine. *International Pest Control* 24: 46-48.
- Kashi, K.P. and Bond, E.J., 1975. The toxic action of phosphine: role of carbon dioxide on the toxicity of phosphine to *Sitophilus granarius* (L.) and *Tribolium confusum* DuVal. *Journal of Stored Products Research* 11: 9-15.

- Kashi, K.P. and Chefurka, W., 1976. The effect of phosphine on the absorption and circular dichroic spectra of cytochrome c and cytochrome oxidase. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 6: 350-362.
- Ke, D. and Kader, A.A., 1992. Potential of controlled atmospheres for postharvest insect disinfestation of fruits and vegetables. *Postharvest News and Information* 3: 31N-37N.
- Klaustermeyer, J.A., Kader, A.A. and Morris, L.L., 1977. Effect of controlled atmospheres on insect control in harvested lettuce. In: Dewey, D.H. (ed.). *Controlled atmospheres for the storage and transport of perishable agricultural commodities*. Hort. Rept 28: 203-204. Proceedings of the 2nd National Controlled Atmosphere Research Conference, Michigan State University, East Lansing, 301 pp.
- Klijstra, J., 1996. Controlled atmospheres and other alternatives to current uses of methyl bromide in the Netherlands. *Phytoparasitica* 24: 245. Abstracts of papers presented at the international conference on controlled atmosphere and fumigation (CAF) in stored products. April 21-26, 1996, Cyprus International Conference Centre, Nicosia, Cyprus.
- Kozlov, M.V., Zvereva, E.L. and Selikhovkin, A.V., 1996. Decreased performance of *Melasma lapponica* (Coleoptera: Chrysomelidae) fumigated by sulphur dioxide: Direct toxicity versus host plant quality. *Environmental Entomology* 25: 143-146.
- Kumagai, M. and Dohino, T., 1995. Electron beam irradiation of immature stages of leafminer, *Liriomyza trifolii* (Burgess) (Diptera: Agromyzidae). *Research Bulletin of the Plant Protection Service, Japan* 31: 83-88.
- Laviolette, P. and Nardon, P., 1963. Influence of irradiation on the adults of *Sitophilus sasakii* takahashi (Curculionidae) and their offspring. In: *Radiation and radioisotopes applied to insects of agricultural importance*: 431-441. Proceedings IAEA and FAO Symposium, 22-26 april 1963, Athens, Greece.
- Lidster, P.D., Stanford, K.H. and McRae, K.B., 1984. Effects of temperature and controlled atmospheres on survival of overwintering populations of European red mite eggs on stored 'McIntosh' apples. *HortScience* 19: 257-258.
- Lighton, J.R.B., 1996. Discontinuous gas exchange in insects. *Annual Review of Entomology* 41: 309-324.
- Lindgren, D.L. and Vincent, L.E., 1970. Effect of atmosphere gases alone or in combination on the mortality of granary and rice weevils. *Journal of Economic Entomology* 63: 1926-1929.
- Litvinov, P.I., Glushkova, S.A. and Chernei, L.B., 1985. Disinfestation of planting material containing root phylloxera. (in Russian) *Zashchita Rastenii* 7: 39-40.
- MacDonald, O.C., 1993. Susceptibility of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) to fumigation with methyl bromide *Annals of Applied Biology* 123: 531-537.
- MacDonald, O.C. and Chakrabarti, B., 1993. Methyl bromide and plant health. In: Ebbels, D. (ed.). *Plant health and the European single market*. British Crop Protection Council (BCPC) Monograph 54: 393-396.
- MacDonald, O.C. and Cheek, S., 1994. Efficacy of methyl bromide fumigation as a quarantine treatment for *Bemisia tabaci* on *Poinsettia*. *Mededelingen van de Faculteit van de Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent* 59 (2b): 619-623.
- MacDonald, O.C. and Mills, K.A., 1994. Plant quarantine treatments: Are there alternatives to methyl bromide? Brighton Crop Protection Conference - Pests and diseases 1994, 1: 183-190.
- MacDonald, O. C. and Mitchell, R.J., 1996. Evaluation of methylbromide as a fumigant against *Liriomyza huidobrensis*. *Annals of Applied Biology* 128 (suppl. 17): 2-3.
- Marzke, F.O., Press, A.F. and Pearman, G.C., 1970. Mortality of the rice weevil, the Indianmeal moth, and *Trogoderma glabrum* exposed to mixtures of atmospheric gases at various temperatures. *Journal of Economic Entomology* 63: 570-574.
- Mathooko, F.M., 1996. Regulation of ethylene biosynthesis in higher plants by carbon dioxide. *Postharvest Biol. and Technol.* 7:1-26.
- Maughan, J., 1986. Post harvest treatment of protea cut flowers to eradicate arthropods. *Protea National*, June 1986: 13-17.

- Miller, P.L., 1974. Respiration-aerial gas transport. In: Rockstein, M. (ed.). The physiology of insecta, vol. 6; The insect and the internal environment: Homeostasis III. Academic Press, New York, pp. 345-402.
- Moffitt, H.R., 1989. A systems approach to meeting quarantine requirements for insect pests of deciduous fruit. Proceedings of the Washington State Horticultural Association 85: 223-225.
- Monro, H.A.U., 1969. Manual of fumigants for insect control. FAO, Rome.
- Mordkovich, Ya., B. and Chernei, L.B., 1993. Phostoxin for fumigation of planting stock. (in Russisch) Zashchita Rastenii 12: 30.
- Mordkovich, Ya.B., Menshikov, N.S. and Luzan, N.K., 1985. Modern means and methods of plant product fumigation in the USSR. Bulletin Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes 15: 5-7.
- Mordkovich, Ya B. and Vashakmadze, G.G., 1983. Disinfestation of fresh fruits by the Oriental fruit moth. (in Russisch). Zashchita Rastenii 6: 34.
- Morgan, C.V.G. and Gaunce, A.P., 1975. Carbon dioxide as a fumigant against the San Jose scale (Homoptera: Diaspididae) on harvested apples. Can. Entomol. 107: 935-936.
- Mortimer, E.A. and Powell, D.F., 1988. Factors affecting the efficacy of methyl bromide fumigation to control *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) in imported chrysanthemum cuttings. Annals of Applied Biology 112: 33-39.
- Moy, J.H., 1985. Radiation disinfestation of food and agricultural products. Proceedings of an International Conference. 14-18 November 1983, Honolulu, Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, Hawaii.
- Mueller, D.K., 1994. A new method of using low levels of phosphine in combination with heat and carbon dioxide In: Highley, E., Wright, E.J., Banks, H.J. and Champ, B.R. (eds.). Stored product protection: 123-125. Proc. 6th intl. working conf. stored-product protection, 17-23 april 1994, Canberra, Australia. CAB International, Wallingford, UK, 1274 pp.
- Muthu, M., Rajendran, S., Krishnamurthy, T.S., Narasimhan, K.S., Rangaswamy, J.R., Jayaram, M. and Majumder, S.K., 1984. Ethyl formate as a safe general fumigant. In: Ripp, B.E., Banks, H.J., Bond, E.J., Calverley, D.J., Jay, E.G. and Navarro, S. (eds.). Practical aspects of controlled atmosphere and fumigation in grain storages: 369-393. Proceedings of a International Symposium, 11-22 April 1983, Perth, Western Australia. Elsevier, Amsterdam.
- Nakakita, H., 1976. The inhibitory site of phosphine. Journal of Pesticide Science 1: 235-238.
- Nakakita, H., 1987. The mode of action of phosphine. Journal of Pesticide Science 12: 299-309.
- Nakakita, H., Saito, T. and Iyatomi, K., 1974. Effect of phosphine on the respiration of adult *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera, Curculionidae). Journal of Stored Products Research 10: 87-92.
- Nakakita, H. and Winks, R.G., 1981. Phosphine resistance in immature stages of a laboratory selected strain of *Tribolium castaneum* (Coleoptera; Curculionidae). Journal of Stored Products Research 17: 43-52.
- Navarro, S. and Calderon, M., 1974. Exposure of *Ephestia cautella* Walker pupae to carbon dioxide concentrations at different relative humidities: the effect on adult emergence and loss in weight. Journal of Stored Products Research 10: 237-241.
- Navarro, S., Dias, R. and Donahaye, E., 1985. Induced tolerance of *Sitophilus oryzae* adults to carbon dioxide. Journal of Stored Products Research 21: 207-213.
- O'Brien, R.D. and Wolfe, L.S., 1964. Radiation, radioactivity and insects. American Inst. Biol. Sciences and US Atomic Energy Commission. Monograph Series on Radiation Biology. Academic Press, 211 pp.
- Osborne, L.S., 1986. Dip treatment of tropical ornamental foliage cuttings in fluvinate to prevent spread of insect and mite infestations. Journal of Economic Entomology 79: 465-470.

- Osbrink, W.L.A., Scheffrahn, R.H., Su, N.-Y. and Rust, M.K., 1987. Laboratory comparisons of sulfuryl fluoride toxicity and mean time of mortality among ten termite species (Isoptera: Hodotermitidae, Kalotermitidae, Rhinotermitidae). *Journal of Economic Entomology* 80: 1044-1047.
- Parrella, M.P. and Jones, V.P., 1987. Development of integrated pest management strategies in floricultural crops. *Bulletin of the Entomological Society of America* 33: 28-34.
- Paull, R.E., 1994. Response of tropical horticultural commodities to insect disinfestation treatments. *HortScience* 29: 988-996.
- Paull, R.E. and Armstrong, J.W. (eds.), 1994. *Insect pests and fresh horticultural products: treatments and responses*. CAB international, Wallingford, UK, 360 pp.
- Phillips, D.J., D.A. Margosan and D.C. Fouse, 1985. Postharvest control of botrytis rot of roses with carbon dioxide. *Plant Disease* 69:789-790.
- Pike, V., 1994. Laboratory assessment of the efficacy of phosphine and methyl bromide fumigation against all life stages of *Liposcelis entomophilus* (Enderlein). *Crop protection* 13: 141-145.
- Piriathamrong, S., Chouvalitvongporn, P. and Sudathit, B., 1985. Disinfestation and vase-life extension of orchids by irradiation. In: Moy, J.H. (ed.). *Radiation disinfestation of food and agriculture products: 222-225*. Proceedings of an International Conference, 14-18 November 1983, Honolulu. Institute of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii at Manoa, Honolulu..
- Piarre, R. and Reichmuth, Ch., 1996. Effects of carbonyl sulfide on *Sitophilus granarius*, *Fusarium avenaceum* and *Fusarium culmorum*, with remarks regarding its possible corrosion on copper. *Phytoparasitica* 24: 217. Abstracts of papers presented at the international conference on controlled atmosphere and fumigation (CAF) in stored products. April 21-26, 1996, Cyprus International Conference Centre, Nicosia, Cyprus
- Ploeger, C., 1997. Bedrijfseconomische aspecten van insectenvrije export van snijbloemen. Den Haag, LEI-DLO mededeling 588 pp 33.
- Potter, M.A., Carpenter, A., Stocker, A. and Wright, S., 1994. Controlled atmospheres for the postharvest disinfestation of *Thrips obscuratus* (Thysanoptera: Thripidae). *Journal of Economic Entomology* 87: 1251-1255.
- Price, N.R., 1980a. The effect of phosphine on respiration and mitochondrial oxidation in susceptible and resistant strains of *Rhyzopertha dominica*. *Insect Biochemistry* 10: 65-71.
- Price, N.R., 1980b. Some aspects of the inhibition of cytochrome c oxidase by phosphine in susceptible and resistant strains of *Rhyzopertha dominica*. *Insect Biochemistry* 10: 147-150.
- Price, N.R., 1981. A comparison of the uptake and metabolism of ³²P-radiolabelled phosphine in susceptible and resistant strains of the lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica*). *Comparative Biochemistry and Physiology C; Comparative Pharmacology and Toxicology* 69C: 129-131.
- Price, N.R., 1984. Active exclusion of phosphine as a mechanism of resistance in *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae). *Journal of Stored Products Research* 20: 163-168.
- Price, N.R. and Dance, S.J., 1983. Some biochemical aspects of phosphine action and resistance in three species of stored product beetle. *Comparative Biochemistry and Physiology C; Comparative Pharmacology and Toxicology* 76C: 277-281.
- Price, N.R., Mills, K.A. and Humphries, L.A., 1982. Phosphine toxicity and catalase activity in susceptible and resistant strains of the lesser grain borer (*Rhyzopertha dominica*). *Comparative Biochemistry and Physiology C; Comparative Pharmacology and Toxicology* 73C: 411-413.
- Price, N.R. and Walter, C.M., 1987. A comparison of some effects of phosphine, hydrogen cyanide and anoxia in the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae). *Comparative Biochemistry and Physiology C; Comparative Pharmacology and Toxicology* 86C: 33-36.

- Prozell, S., Reichmuth, Ch., Ziegler, G., Schartmann, B., Matissek, R., Kraus, J., Gerard, D. and Rogg, S., 1996. Control of pests in cocoa beans and hazelnuts with carbon dioxide under high pressure. *Phytoparasitica* 24: 232. Abstracts of papers presented at the international conference on controlled atmosphere and fumigation (CAF) in stored products. April 21-26, 1996, Cyprus International Conference Centre, Nicosia, Cyprus
- Rajak, R.L. and Hewlett, P.S., 1971. Effect of some synergists on the insecticidal potency of phosphine. *Journal of Stored Products Research* 7: 15-19.
- Rajendran, S. and Muthu, M., 1989. The toxic action of phosphine in combination with some alkyl halide fumigants and carbon dioxide against the eggs of *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Stored Products Research* 25: 225-230.
- Reichmuth, C., 1994. Uptake of phosphine by stored-product pest insects during fumigation. In: Highley, E., Wright, E.J., Banks, H.J. and Champ, B.R. (eds.). *Stored product protection: 157-162*. Proceedings of the 6th international working conference on stored-product protection, 17-23 april 1994, Canberra, Australia. CAB International, Wallingford, UK, 1274 pp.
- Reichmuth, C., Schöller, M. and Dugast, J.-F., 1996. On the efficacy of sulfuryl fluoride against stored-product pest moths and beetles. *Phytoparasitica* 24: 216. Abstracts of papers presented at the international conference on controlled atmosphere and fumigation (CAF) in stored products. April 21-26, 1996, Cyprus International Conference Centre, Nicosia, Cyprus
- Ren, Y.L., O'Brien, I.G. and Whittle, C.P., 1994. Studies on the effect of carbon dioxide in insect treatment with phosphine. In: Highley, E., Wright, E.J., Banks, H.J. and Champ, B.R. (eds.). *Stored product protection: 173-177*. Proceedings of the 6th international conference on stored-product protection, 17-23 april 1994, Canberra, Australia. CAB International, Wallingford, UK, 1274 pp.
- Robinson, J.R. and Bond, E.J., 1970. The toxic action of phosphine. *Journal of Stored Products Research* 6: 133-146.
- Rogers, M.N., 1973. An historical and critical review of postharvest physiology research on cut flowers. *HortScience* 8(3):189-194.
- Sato, K. and Suwanai, M., 1973. Studies on the characteristics of action of fumigants II. Entrance of hydrogen phosphide into weevil body under conditions of the failure to respire for the weevil. *Botyu-Kagaku* 38: 213-216.
- Scheffrahn, R.H., Wheeler, G.S. and Su, N.Y., 1995. Synergism of methyl bromide and sulfuryl fluoride toxicity against termites (Isoptera: Kalotermitidae, Rhinotermitidae) by admixture with carbon dioxide. *Journal of Economic Entomology* 88: 649-653.
- Seaton, K.A. and Joyce, D.C., 1988. Post-harvest insect disinfestation treatments for cut flowers and foliage. W. Aust. Dept. of Agriculture, Farmnote No. 89/88, Agdex 280/56, South Perth, W.A.
- Seaton, K.A. and Joyce, D.C., 1989. Postharvest disinfestation of cut flowers for export. In: *Horticultural Research and Extension Update - 1989*, Western Australian Department of Agriculture, South Perth, W.A.: 1-7.
- Seaton, K.A. and Joyce, D.C., 1992. Gamma irradiation for insect disinfestation damages native Australian cut flowers. *Scientia Horticulturae* 52: 343-355.
- Seaton, K.A., Joyce, D.C. and Enright, T.J., 1989. Quarantine insect disinfestation of cut flowers: a short review. In: *Production and Marketing of Australian Flora*. Proceedings of a Symposium, University of Western Australia: 1-11.
- Seaton, K.A. and Woods, W.M., 1991. Review of field and postharvest control of insects in Proteaceae. Sixth Biennial Conference of the International Protea Association, sept. 22-27, 1991, Perth, W.A., 10 pp.
- Seo, S.T., Akamine, E.K., Goo, T.T.S., Harris, E.J. and Lee, C.Y.L., 1979. Oriental and Mediterranean fruit flies: fumigation of papaya, avocado, tomato, bell pepper, eggplant and banana with phosphine. *Journal of Economic Entomology* 72: 354-359.

- Shelton, M.D., Walter, V.R., Brandl, D. and Mendez, V., 1996. The effects of refrigerated, controlled-atmosphere storage during marine shipment on insect mortality and cut-flower vase life. *HortTechnology* 6: 247-250.
- Soderstrom, E.L., 1977. Research on the use of a low oxygen atmosphere for insect control in dried fruits and tree nuts. In: Dewey, D.H. (ed.). *Controlled atmospheres for the storage and transport of perishable agricultural commodities*. Hort. Rept 28: 205-206. Proceedings of the 2nd National Controlled Atmosphere Research Conference, Michigan State University, East Lansing, 301 pp.
- Soderstrom, E.L. and Brandl, D., 1990. Controlled atmospheres for the preservation of tree nuts and dried fruits. In: Calderon, M. and Barkai-Golan, R. (eds.). *Food preservation by modified atmospheres*. CRS, Boca -Raton, pp. 83-92.
- Soderstrom, E.L., Brandl, D.G., Hartsell, P.L. and Mackey, B., 1991. Fumigants as treatments for harvested citrus fruits infested with *Asynonychus godmani* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology* 84: 936-941.
- Soderstrom, E.L., Brandl, D.G. and Mackey, B., 1992. High temperature combined with carbon dioxide enriched or reduced oxygen atmospheres for control of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Stored Products Research* 28: 235-238.
- Soderstrom, E.L., Brandl, D.G. and Mackey, B.E., 1996a. High temperature alone and combined with controlled atmospheres for control of diapausing codling moth (Lepidoptera, Tortricidae) in walnuts. *Journal of Economic Entomology* 89: 144-147.
- Soderstrom, E.L., Brandl, D.G. and Mackey, B.E., 1996b. High temperature and controlled atmosphere treatment of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) infested walnuts using a gas-tight treatment chamber. *Journal of Economic Entomology* 89: 712-714.
- Soderstrom, E.L., Mackey, B.E. and Brandl, D.G., 1986. Interactive effects of low-oxygen atmospheres, relative humidity, and temperature on mortality of two stored-product moths (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology* 79: 1303-1306.
- Solomonson, L.P., 1981. Cyanide as a metabolic inhibitor. In: Vennesland, B., Conn, E.E., Knowles, C.J., Westley, T. and Wissing, F. (eds.) *Cyanide in Biology*: 11-28. Academic Press, London.
- Soma, Y., 1995. Disinfestation of insect pests on cut flowers by mixed gas fumigation. Research conference on fumigation disinfestation of agricultural products, Science forum. Feb. 20, 1995, 4 pp.
- Spalding, D.H. and von Windeguth, D.L., 1988. Quality and decay of irradiated mangos. *HortScience* 23: 187-189.
- Staby, G.L., 1977. Controlled atmosphere and low pressure storage of floral crops - overview. *Horticultural Report* 28. Department of Horticulture Michigan State University East Lansing, Michigan, USA.
- Steiner, L.F., Harris, E.J., Mitchell, W.C., Fujimoto, M.S. and Christenson, L.D., 1965. Melon fly eradication by overflooding with sterile flies. *Journal of Economic Entomology* 58: 519-522.
- Stewart, D., 1957. Sulfuryl fluoride - a new fumigant for control of the drywood termite *Kaloterme minor* (Hagen). *Journal of Economic Entomology* 50: 7-11.
- Stewart, J.K. and Aharoni, Y., 1983. Vacuum fumigation with ethyl formate to control the green peach aphid in packaged head lettuce. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 108: 295-298.
- Stewart, J.K., Aharoni, Y., Hartsell, P.L. and Young, D.K., 1980. Acetaldehyde fumigation at reduced pressure to control the green peach aphid on wrapped and packed head lettuce. *Journal of Economic Entomology* 73: 149-152.
- Stewart, J.K. and Mon, T.R., 1984. Commercial-scale vacuum fumigation with ethyl formate for postharvest control of the green peach aphid (Homoptera: Aphididae) *Journal of Economic Entomology* 77: 569-573.

- Storey, C.L., 1975. Mortality of various stored product insects in low oxygen atmospheres produced by an exothermic inert atmosphere generator. *Journal of Economic Entomology* 68: 316-318.
- Tanabe, K. and Dohino, T., 1993. Effects of electron beam irradiation on cut flowers. *Research Bulletin of the Plant Protection Service, Japan* 29: 1-9.
- Tanabe, K. and Dohino, T., 1995. Responses of 17 species of cut flowers to electron beam irradiation *Research Bulletin of the Plant Protection Service, Japan* 31: 89-94.
- Tanabe, K., Dohino, T. and Misumi, T., 1994. Effects of electron beam irradiation on ethylene production and senescence of cut flowers. *Research Bulletin of the Plant Protection Service, Japan* 30: 75-82.
- Tanabe, K. and Kato, T., 1992. Electron beam irradiation to control pests on carnation cut flowers - Effects of irradiation on the quality of plants. *Research Bulletin of the Plant Protection Service, Japan* 28: 27-31.
- Taylor, R.W.D., 1994. Methyl Bromide - Is there any future for this noteworthy fumigant? *Journal of Stored Products Research* 30: 253-260.
- Tenbrink, V.L., Hansen, J.D. and Hara, A.H., 1990. Postharvest control of banana aphid using dips, 1989. *Insecticide & Acaricide Tests* 15: 338-339.
- Tenbrink, V.L., Hansen, J.D. and Hara, A.H., 1991. Postharvest control of mealybugs using dips, 1990. *Insecticide & Acaricide Tests* 16: 258.
- Tenbrink, V.L., Hu, B.K. and Hara, A.H., 1992. Phytotoxicity of three formulations of insecticidal soap in postharvest dip treatments of dendrobium orchids, 1991. *Insecticide & Acaricide Tests* 17: 349.
- Thomou, H., 1963. Sterilization of *Dacus oleae* Gmel. by gamma irradiation. In: *Radiation and radioisotopes applied to insects of agricultural importance: 413-424. Proceedings IAEA and FAO Symposium, 22-26 april 1963, Athens, Greece.*
- Tjosvold, S.A. and Ali, A.D., 1989. Fumigation of western flower thrips using banana bags (Polyethylene-D) during simulated shipment of cut flowers. In: *Flower and Nursery Report: 3-4. Department Environ. Hort., University of California, Davis, California.*
- Tunc, I., Erler, F., Dagli, F. and Calis, O., 1997. Insecticidal activity of acetone vapours. *Journal of Stored Products Research* 33: 181-185.
- Ulrichs, Ch., Reichmuth, Ch. and Raemann, W., 1996. Carbon dioxide under high pressure to control the cigarette beetle, *Lasioderma serricorne*. *Phytoparasitica* 24: 233. Abstracts of papers presented at the international conference on controlled atmosphere and fumigation (CAF) in stored products. April 21-26, 1996, Cyprus International Conference Centre, Nicosia, Cyprus
- UNEP., 1995. Montreal Protocol on substances that deplete the ozone layer. Rep. Methyl Bromide Tech. Opt. Committee. 1996 assessment. Unit. Nat. Env't. Prog. Vienna, Austria.
- Waller, J.B., 1990. Insecticidal soaps for post harvest control of thrips in asparagus. *Proceedings of the New Zealand Weed and Pest Control Conference* 43: 60-62.
- Wang, C.L. and Lin, R.T., 1984a. Study on the quarantine treatments of insect pests on chrysanthemum cutflowers-fumigation and smoking methods. *Journal of Agricultural Research of China* 33: 88-93.
- White, N.,D.,G., Jayas, D.S. and Sinha, R.N., 1988. Interaction of carbon dioxide and oxygen levels, and temperature on adult survival and reproduction of *Cryptolestes ferrugineus* in stored wheat. *Phytoprotection* 69: 31-39.
- Whittaker, J.B. and Warrington, S., 1990. Effects of atmospheric pollutants on interactions between insects and their food plants. In: Burdon, J.J. and Leather, S.R. (eds.). *Pests, pathogens and plant communities: 97-110. Blackwell, Oxford.*
- Williams, P., Minett, W. Savage, P., Wilson, A.D., Buchanan, S.A. and Guiffre, V., 1984. Commercial potential of methyl bromide and carbon dioxide mixtures for disinfesting grain. In: Ripp, B.E., Banks, H.J., Bond, E.J., Calverley, D.J., Jay, E.G. and Navarro, S. (eds.). *Practical aspects of controlled atmosphere and fumigation in grain storages:*

- 55-65. Proceedings International Symposium, 11-22 April 1983, Perth, Western Australia. Elsevier, Amsterdam.
- Wit, A.K.H. and Van de Vrie, M., 1985a. Gamma irradiation for post harvest control of insects and mites in cutflowers. Mededelingen van de Faculteit van de Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent 50: 697-704.
- Wit, A.K.H. and Van de Vrie, M., 1985b. Fumigation of insects and mites in cutflowers for post harvest control. Mededelingen van de Faculteit van de Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent 50: 705-712.
- Wit, A.K.H. en M. Van de Vrie, 1986. Bestrijding van insekten en mijten in snijbloemen na de oogst. Bloemisterij Onderzoek in Nederland over 1985: 138.
- Wohlgemuth, R., Drosihn, J. and El-Lakwah, F., 1976. Versuche zur Begasung unter Quarantaene liegender geschuetteter Expeller in Shuten gegen Khaprakaefer (*trogoderma granarius* Ev.). Mitteilungen Biologische Bundesanstalt fur Land und Forstwirtschaft 173: 29 pp.
- Wood, J. and Wood, E., 1991. Insecticide disinfestation of protea cut flowers and foliage. Protea News 10: 15-17.
- Yathom, S., Padova, R., Tal, S. and Ross, I., 1990. Effects of gamma radiation on the immature-stages of *Liomyza trifolii*. Phytoparasitica 18: 117-124.
- Zheng, J., Reid, M.S., Ke, D. and Cantwell, M.I., 1993. Atmosphere modification for postharvest control of thrips and aphids on flowers and green leafy vegetables. Proceedings from the sixth international controlled atmosphere research conference: 394-401. Cornell University, Ithaca, New York, June 15-17, 1993.

3. INVENTARISATIE ETHERISCHE OLIËN

Het doel van dit projectonderdeel is om vast te stellen welke etherische oliën op de gekozen insecten de hoogste insecticide-werking vertonen. Tevens wordt nagegaan of de gebruikte stoffen bij effectieve dosering een nadelige invloed hebben op de kwaliteit van snijbloemen.

Bij aanvang van het project is, in overleg met de begeleidingscommissie, gekozen voor drie soorten plaag-insecten die belangrijke problemen veroorzaken bij de export van sierteeltproducten (Tabel 3.1). De fytotoxische effecten van de verschillende oliën is getest op respectievelijk roos, chrysantheem en lelie.

Tabel 3.1 Overzicht van de plaag insecten die in het project zijn bestudeerd

Insect	wetenschappelijke benaming	levensstadium
wittevlieg	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	adult
trips	<i>Frankliniella occidentalis</i>	larve en adult
aardappeltopluis	<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	adult

3.1 PRIMAIRE SELECTIE ETHERISCHE OLIËN MET INSECTICIDE-WERKING

Op basis van literatuur gegevens zijn in eerste instantie een tiental secundaire plantstoffen geselecteerd met anti-insect werking (Garg and Banerjee, 1996; Cutler, 1995; Rice and Coats, 1994; Calderone and Spivak, 1995; Beckstrom-Sternberg and Duke, 1994; Su *et al.*, 1972; Weaver *et al.*, 1991; Duke, 1994; Shaaya *et al.*, 1991). De selectie (zie Tabel 3.2) omvat stoffen met insecticide-werking (S (-) limoneen; 1,8 cineol; (+/-) linalool; S (+) carvon; geraniol; *trans*-cinnamaldehyde; carvacrol), met larvicide-werking (eugenol; thymol) en insectenwerende werking (S (-) limoneen; 1,8 cineol; *p*-cymeen; (+/-) linalool; geraniol). In de beoogde toepassing van deze stoffen wordt er vanuit gegaan dat blootstelling via de gasfase plaatsvindt. Bij acht van de tien geselecteerde stoffen is deze applicatie-vorm goed mogelijk. Uitzonderingen zijn *trans*-cinnamaldehyde en thymol. Bij verdamping aan de lucht oxideert *trans*-cinnamaldehyde snel tot het niet vluchtige en onwerkzame cinnamic acid (Smid *et al.*, 1996). Thymol is bij kamertemperatuur een vaste stof en heeft onder deze omstandigheden een te lage dampspanning. De laatste twee stoffen vallen om deze reden in eerste instantie af voor verder onderzoek. Alleen bij toepassing onder anaërobe omstandigheden, zoals die zich bij een combinatie van CA en etherische oliën voordoen, en bij gebleken effectiviteit, kan *trans*-cinnamaldehyde worden gebruikt.

Conclusie

Op basis van de bestaande literatuur kan een test-panel van acht vluchtige plantenstoffen worden geselecteerd met insecticide-werking.

3.2 SELECTIE OP WITTEVLIEG

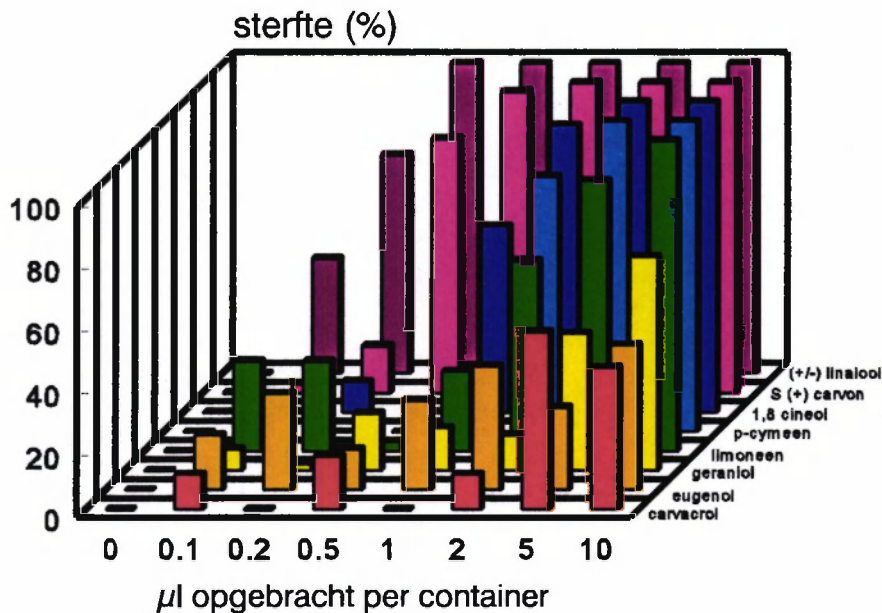
De insecticide-werking van acht geselecteerde stoffen (S (-) limoneen, 1,8 cineol; (+/-) linalool, S (+) carvon, geraniol, carvacrol, eugenol en *p*-cymeen) is met gebruikmaking van een *in vitro*-screening getest op adulten van wittevlieg. Per testcontainer van 298 ml werden 25 individuen gedurende twee uur bij kamertemperatuur blootgesteld aan een oplopende dosis van de verschillende teststoffen. Deze experimenten zijn in tweevoud uitgevoerd.

Figuur 3.1 laat zien dat linalool en carvon het meest effectief wittevlieg afdoden. Dat wil zeggen dat al bij een relatief lage dosering (0,3 tot 0,7 $\mu\text{l/l}$ linalool en 0,7 tot 1,7 $\mu\text{l/l}$ carvon) 100% doding wordt waargenomen. Bij een vijf tot tien maal hogere dosering van cineol, cymeen en limoneen wordt eveneens 100% doding gevonden. Met geraniol, eugenol en carvacrol wordt bij de hoogste dosering geen 100% doding waargenomen.

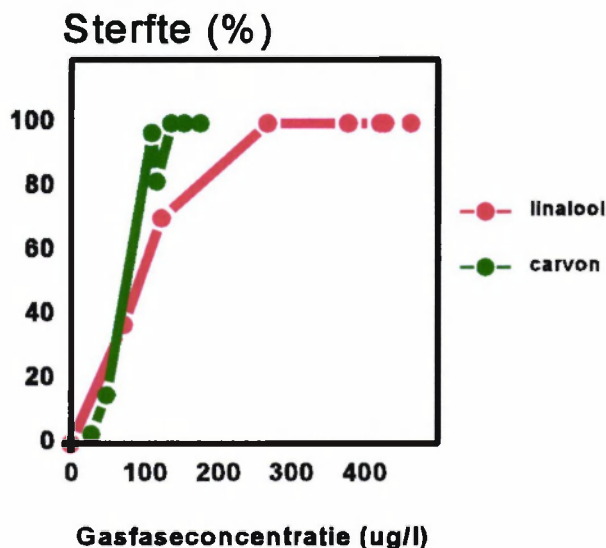
Tabel 3.2 Overzicht van de bij aanvang van het project geselecteerde plantenstoffen met anti-insecten werking. De grijze blokken geven de specifieke, gedocumenteerde werking van de stoffen aan

stof	werking		
	insecticide	larvicide	insectifuge
carvacrol			
S (+) carvon			
1,8 cineol			
<i>trans</i> -cinnamaldehyde			
<i>p</i> -cymeen			
eugenol			
geraniol			
S (-) limoneen			
(+/-) linalool			
thymol			

De mate van vluchtigheid van de verschillende stoffen bepaalt de dampspanning die bij een gegeven dosering onder de experimentele omstandigheden wordt bereikt. Linalool is bijvoorbeeld vluchtiger dan carvon, waardoor bij dezelfde dosering een hogere concentratie in de dampfase wordt waargenomen. Daarom is in een volgende set experimenten de relatie tussen de mate van insecticide-werking en de concentratie in de dampfase van de plantenstoffen bepaald. Dit is gedaan door tijdens de blootstelling van de insecten aan linalool en carvon,



Figuur 3.1 Effect van acht verschillende vluchtige plantenstoffen op de overleving van wittevlieg. Per experiment zijn 25 insecten gedurende twee uur bij kamertemperatuur blootgesteld aan een oplopende dosis van de teststoffen in containers van 298 ml. De meetwaarden zijn gemiddelden van een duplobepaling.



Figuur 3.2 Concentratie afhankelijke doding van wittevlieg door linalool en carvon onder standaardcondities zoals beschreven in bijschrift van figuur 3.1.

gasmonsters te nemen en deze met behulp van GC (gaschromatografie) te analyseren. Uit deze analyse blijkt dat in aanwezigheid van 89 µg/L linalool, 50% sterfte optreedt. Om ditzelfde effect te bereiken is 72 µg/L carvon nodig (Fig. 3.2).

Dit betekent dat het insecticide-effect van linalool en carvon op wittevlieg een vergelijkbare concentratie-afhankelijkheid vertonen. Echter, door de grotere vluchtigheid van linalool wordt deze concentratie al bij een lagere dosis bereikt (Fig. 3.1).

Conclusie

Linalool en carvon vertonen op wittevlieg de hoogste insecticide-werking. Met linalool, carvon, 1,8 cineol, *p*-cymeen en limoneen wordt onder de experimentele omstandigheden 100% doding waargenomen.

3.3 INSECTICIDE-WERKING ETHERISCHE OLIËN OP TRIPSLARVEN EN ADULTEN

Linalool en carvon vertonen met wittevlieg als doelwit-organisme, de hoogste insecticide-werking (zie § 3.2). In de volgende fase zijn beide stoffen getest op tripsadult, tripslarve en aardappeltopluis. In deze serie experimenten is steeds de relatie tussen dosering, gasfaseconcentratie en overleving bepaald zoals beschreven in § 3.2. De resultaten zijn samengevat in Tabel 3.3.

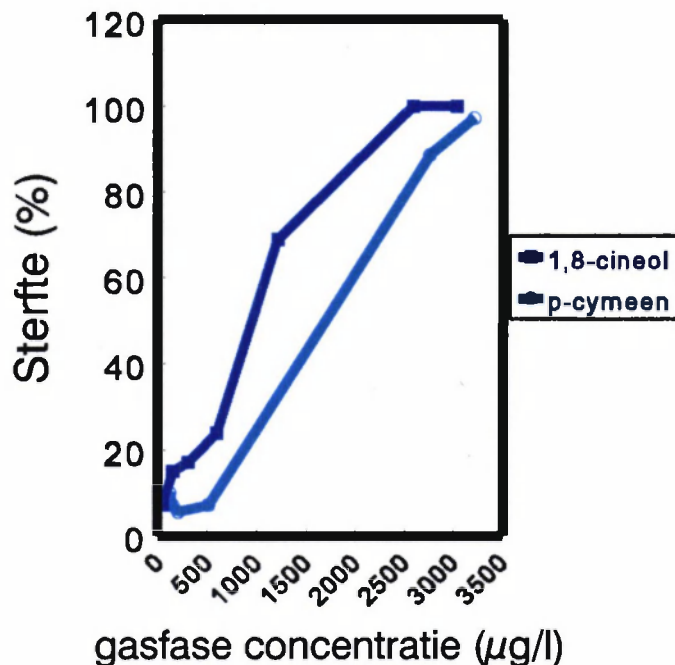
Duidelijk is dat, in vergelijking met wittevlieg, zowel adulten als larven van trips minder gevoelig zijn voor blootstelling aan linalool en carvon. Dit komt tot uiting in de hogere LD₅₀-waarden voor doding van tripsadult en tripslarve. Verder wordt onder de experimentele omstandigheden, bij de hoogste toegepaste dosis linalool en carvon geen 100% doding waargenomen.

Tabel 3.3 Overzicht van LD₅₀-waarden in µg/L van green-chemicals op wittevlieg, tripsadult, tripslarve en aardappeltopluis

stof	wittevlieg	tripsadult	tripslarve	luis
(+/-) linalool	89	180 ^a	220 ^a	>> max dosis
S (+) carvon	72	nb ^b	95 ^a	85 ^a
1,8 cineol	nb ^b	900	2100	1800 ^a
<i>p</i> -cymeen	nb ^b	1700	2700 ^a	195 ^a
limoneen	nb ^b	nb ^b	nb ^b	2000 ^a
geraniol	nb ^b	>> max dosis	nb ^b	>> max dosis

a) geen 100% doding bij hoogste dosering

b) niet bepaald



Figuur 3.3 Concentratie afhankelijke doding van adulte tripsen door blootstelling aan 1,8 cineol en *p*-cymeen gedurende twee uur bij 20°C.

Met 1,8 cineol en *p*-cymeen werd wel 100% doding van adulte tripsen gevonden (Tabel 3.3 en Fig. 3.3). In aanwezigheid van de hoogste dosering 1,8 cineol werd ook 100% doding van tripslarven gevonden, terwijl bij de hoogste dosering *p*-cymeen slechts 56% doding werd waargenomen. Door de hogere vluchtigheid bereiken cymeen en cineol, in vergelijking met linalool en carvon, bij dezelfde dosering een veel hogere concentratie in de gasfase.

Conclusie

Cymeen en 1,3 cineol lijken voor de bestrijding van tripsen de meest geschikte kandidaten. Bij alle getetste stoffen zijn tripsadulten gevoeliger dan larven.

3.4 INSECTICIDE-WERKING ETHERISCHE OLIËN OP AARDAPPELTOPLUIS

In een derde serie experimenten is het effect van linalool, carvon, 1,8 cineol, *p*-cymeen, limoneen en geraniol op *Macrosiphum euphorbiae* (aardappeltopluis) onderzocht. De resultaten zijn samengevat in Tabel 3.3. Linalool en geraniol zijn de minst effectieve stoffen voor dit organisme. Bij de hoogste dosering linalool en geraniol vinden we minder dan 50% doding. 1,8 cineol en *p*-cymeen geven de beste resultaten met respectievelijk 93% en 90% doding bij de hoogste dosering. Opvallende is de relatief lage LD₅₀-waarde van *p*-cymeen voor doding van aardappeltopluis. De insecticide-activiteit van limoneen op aardappeltopluis is vergelijkbaar met de activiteit van cineol en cymeen.

Conclusie

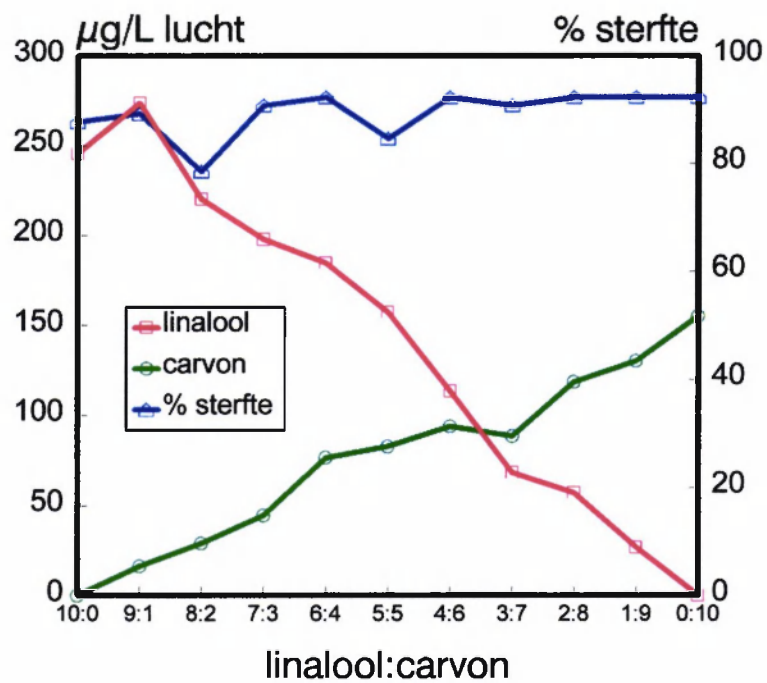
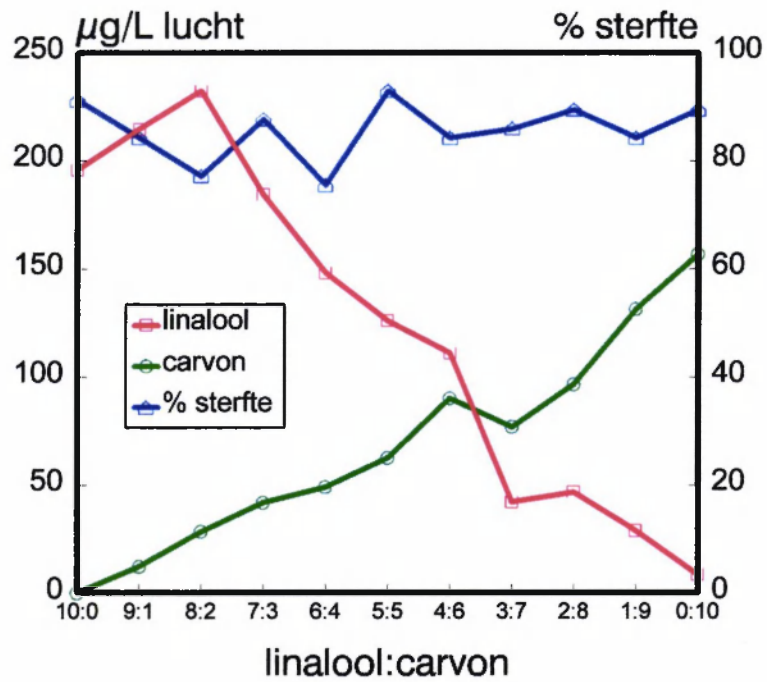
Van alle geteste organismen blijkt aardappeltopluis de meest resistente. Van de geteste stoffen geven *p*-cymeen en 1,8 cineol de beste bestrijdingsresultaten.

3.5 EFFECT VAN MENGSELS VAN LINALOOL EN CARVON OP TRIPS

Om na te gaan of secundaire plantenstoffen elkaars insecticide-werking kunnen beïnvloeden (antagonisme, additieve werking, synergisme) is het effect van mengsels van linalool en carvon op de overleving van tripsadult en tripslarve bestudeerd (Fig. 3.4a en b). Omdat met linalool of carvon alleen geen 100% sterfte bij trips wordt gevonden (zie § 3.3), kan met deze combinatie de interactie tussen beide stoffen nauwkeurig worden bestudeerd. Verschillende verhoudingen van linalool en carvon geven, onder de experimentele omstandigheden, zowel bij tripsadulten als bij tripslarven steeds ongeveer 90% sterfte. Deze waarnemingen geven aan dat carvon en linalool een additieve werking hebben. Dit suggereert dat beide stoffen een vergelijkbaar werkingmechanisme hebben.

Conclusie

De insecticide-werking van linalool wordt niet negatief beïnvloed door carvon. Beide stoffen kunnen in mengsels toegepast worden maar versterken elkaars werking niet (geen synergie). Bij combinaties getest op tripslarven en -adulten wordt een additief effect waargenomen.



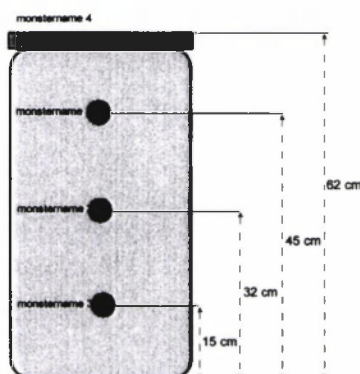
Figuur 3.4 Effect van mengsels van linalool en carvon op tripsadult (boven) en tripslarve (onder). De insecten zijn gedurende twee uur, bij kamertemperatuur behandeld. De gepresenteerde data zijn gemiddelde waarden van duplobepalingen. Per bepaling zijn 25 organismen behandeld.

3.6 FYTOTOXICITEIT ETHERISCHE OLIËN

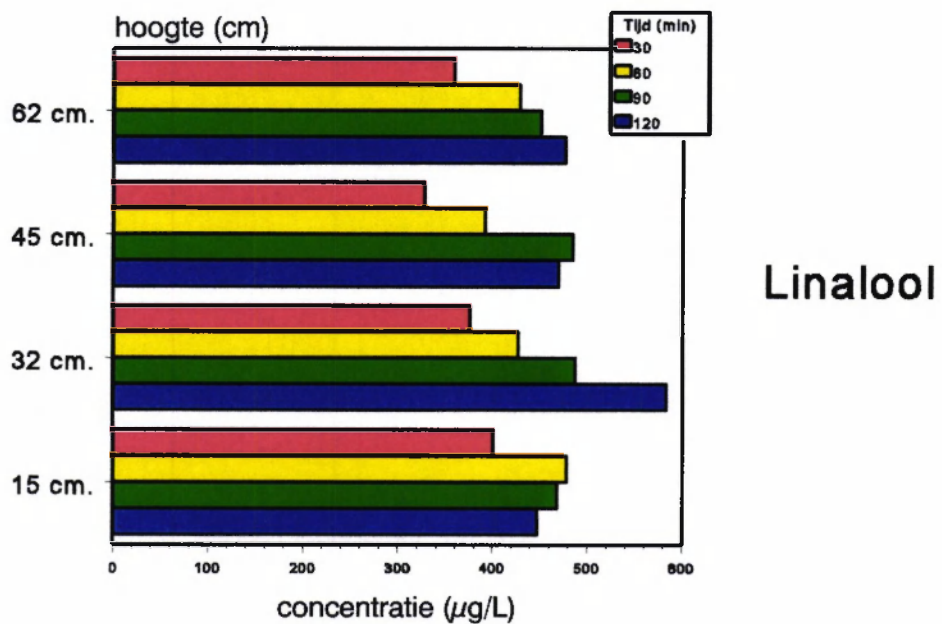
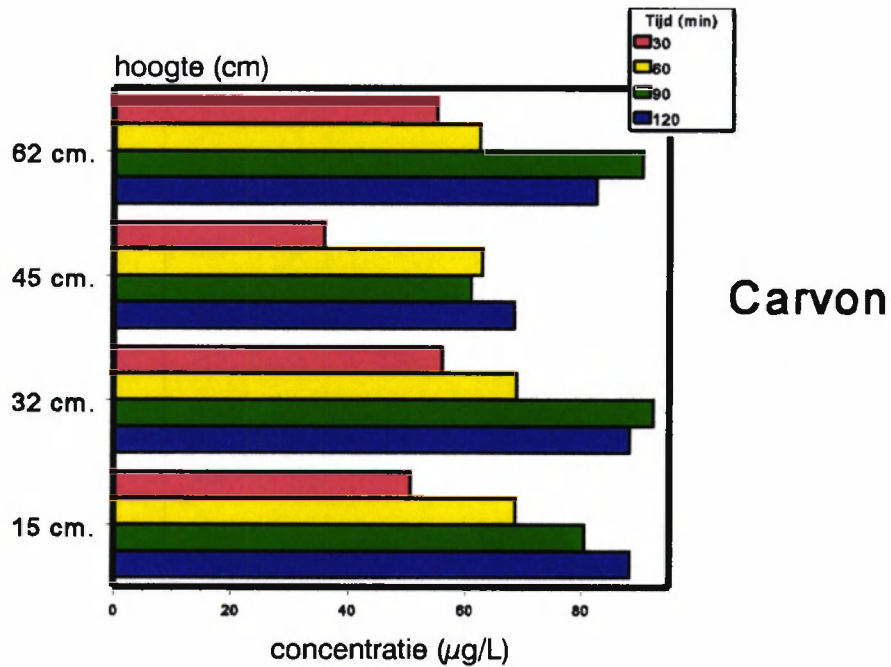
Om de fytotoxiciteit van de geselecteerde *green*-chemicals op een drietal soorten snijbloemen te onderzoeken is een proefopstelling gebouwd met een inhoud van 60 liter (Fig. 3.5). In deze opstelling kunnen bossen van 10 tot 25 snijbloemen geplaatst worden die vervolgens gedurende twee uur bij kamertemperatuur worden blootgesteld aan de test-stoffen. De etherische oliën met insecticide-werking worden gedoseerd op een schijf filtreerpapier en met behulp van een ventilator geforceerd in de dampfase gebracht. Op verschillende plaatsen (zie Fig. 3.5) in de container kunnen gasmonsters worden genomen om de verdeling en concentratie van de test-stoffen in het vat te analyseren. Na behandeling worden de snijbloemen op vaas gezet en in een geconditioneerde uitbloeiruimte geplaatst (18°C; 12 uur licht - 12 uur donker; 60% relatieve luchtvochtigheid)) om het vaasleven van behandelde objecten te vergelijken met onbehandelde controles. Afhankelijk van de grootte van de snijbloemen worden per object 10-25 stelen behandeld. Om de verdeling van oliën in dampfase van de 60 liter-containers te controleren zijn linalool en carvon eerst gedoseerd in afwezigheid van snijbloemen. Zowel carvon als linalool geven een gelijkmatige verdeling in de testcontainer (Fig. 3.6a en b). Beide stoffen bereiken binnen 30 minuten 70% tot 80% van de maximale concentratie. De hoogste gasfase-concentratie wordt bereikt na ongeveer 90 - 120 minuten. Opvallend is dat de bereikte concentraties vergelijkbaar of zelfs hoger zijn dan in de 300 ml containers. Dit kan verklaard worden door het gebruik van een ventilator in het 60 liter-systeem.

Conclusie

Dit experiment laat zien dat de opschaling van de proefopstelling van 300 ml naar 60 liter (200-voudige opschaling) geen problemen geeft.



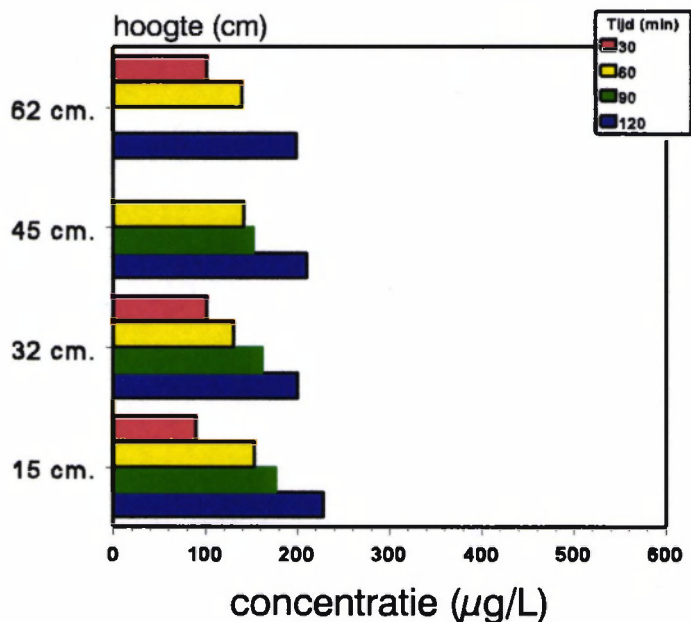
Figuur 3.5 Proefopstelling van 60 liter-container voor behandeling van snijbloemen met insecticide etherische oliën. Op de bodem van de container bevindt zich een unit voor dosering met behulp van geforceerde verdamping van de oliën.



Figuur 3.6 Verdeling van de gasfaseconcentratie van carvon (boven) en linalool in 60 liter-containers bij 20 °C. Per container is 2 ml olie gedoseerd. Metingen zijn 30 min., 60 min., 90 min. en 120 min. na dosering uitgevoerd op verschillende plaatsen in de container.

3.6.1 Effecten van insectide-oliën op roos

Rozen (cultivar First Red) zijn gedurende twee uur, bij 20°C blootgesteld aan linalool, carvon, *p*-cymeen of 1,8 cineol. Van alle teststoffen is steeds 2 ml gedoseerd in het 60 liter-vat. De werkelijke gasfase-concentratie van beide teststoffen is gedurende de behandeling bepaald met behulp van GC-analyse van gasmonsters (Fig. 3.7, voorbeeld met linalool). De rozen behandeld met linalool en carvon zijn na twaalf dagen vaasleven beoordeeld op verkleuring van de bloembladen en verwelking (Tabel 3.4).



Figuur 3.7 Verdeling van de gasfaseconcentratie van linalool in 60 liter-containers bij 20 °C, geladen met 25 rozen. Per container is 2 ml olie gedoseerd. Metingen zijn 30 min., 60 min., 90 min. en 120 min. na dosering uitgevoerd op verschillende plaatsen in de container.

Het eerste dat opvalt is dat in aanwezigheid van snijbloemen de gasfase-concentratie in de container, bij dezelfde dosering, gehalveerd is (vergelijk Figuur 3.6 en 3.7). In een ongeladen container wordt 450 µg/l linalool gemeten terwijl in een geladen container een concentratie van slechts 210 µg/l wordt gemeten. De carvon-concentratie in ongeladen containers is 70 - 80 µg/l tegen 15-20 µg/l in met rozen geladen containers. Een verklaring voor deze waarneming kan zijn dat een deel van de vluchtige stoffen wordt opgenomen door de planten, waardoor de gasfase-concentratie daalt.

Uitbloei-analyse van de rozen laat zien dat met linalool behandelde rozen de minste verkleuring en laagste percentage verwelking vertonen. De verschillen met de controlegroep zijn echter niet significant (Tabel 3.4). Behandeling met carvon lijkt

echter een duidelijk negatieve invloed op de kwaliteit van rozen te hebben. Dit komt tot uiting in de waarneming dat na twaalf dagen 100% van alle bloemen verwelkt is. Verder valt op dat alle met carvon behandelde bloemen duidelijk verkleurd zijn. Dit effect is reeds enkele uren na de begassing zichtbaar. Tenslotte valt op dat in de groei-punten van zij scheuten necrotische plekken ontstaan.

Conclusie

Carvon geeft bij de gebruikte concentratie (~60 µg/L) direct schade aan rozen. Linalool-behandeling heeft bij 200 µg/L geen nadelige invloed op de kwaliteit van rozen.

Tabel 3.4 Effect van behandeling met linalool en carvon van rozen (cv First Red, niet voorbehandeld) op vaasleven. De rozen (25 per object) zijn na twaalf dagen (20°C, 60% RV, 12 uur licht - 12 uur donker) beoordeeld door drie onafhankelijke experts op bloemverkleuring en verwelking

parameter	% bloemen na behandeling met:		
	controle	linalool	carvon
blauwverkleuring bloem	92%	84%	100%
niet verwelkt	4%	20%	0%
verwelking stadium 1 ^a	64%	48%	0%
verwelking stadium 2 ^b	32%	32%	100%

1) Stadium 1: Begin verwelking zichtbaar

2) Stadium 2. Volledig verwelkt

Omdat cymeen en cineol met name op trips en aardappeltiopluis een goede insecticide-werking hebben, is de ook de invloed van deze twee stoffen op het vaasleven van rozen onderzocht. Beide stoffen bereiken ongeveer 90 minuten na dosering (2 ml) hun maximale concentratie in de gasfase (zie Fig. 3.8). Een opvallend verschil met de linalool-behandeling is dat de maximale gemeten waarde voor cymeen en cineol vergelijkbaar is met de waarde die gemeten wordt in vaten zonder rozen. Dit suggereert dat cymeen en cineol minder sterk of zelfs helemaal niet worden geabsorbeerd door de planten in het vat.

Het effect van cymeen en cineol op de rozen is bepaald door de bloemen na behandeling op vaas te zetten en na vier dagen een aantal kwaliteitskenmerken te beoordelen (Tabel 3.5). Met name vanwege de duidelijke effecten van cymeen en cineol zijn de bloemen niet na twaalf dagen (zoals bij linalool en carvon, zie Tabel 3.4) maar na de aangegeven vier dagen beoordeeld. Zowel bij cymeen als bij cineol zien we in 100% van de gevallen bladschade optreden. De schade bij met cymeen behandelde rozen beperkt zich tot lichtgroene vlekken op het blad. De schade bij met cineol behandelde rozen is veel groter. In dit laatste geval zien we dat alle stelen verwelkte bladeren dragen. De bloemopening bij met cymeen behandelde

rozen is enigszins vertraagd terwijl bij met cineol behandelde bloemen een sterk vertraagde bloemopening wordt waargenomen.

Conclusie

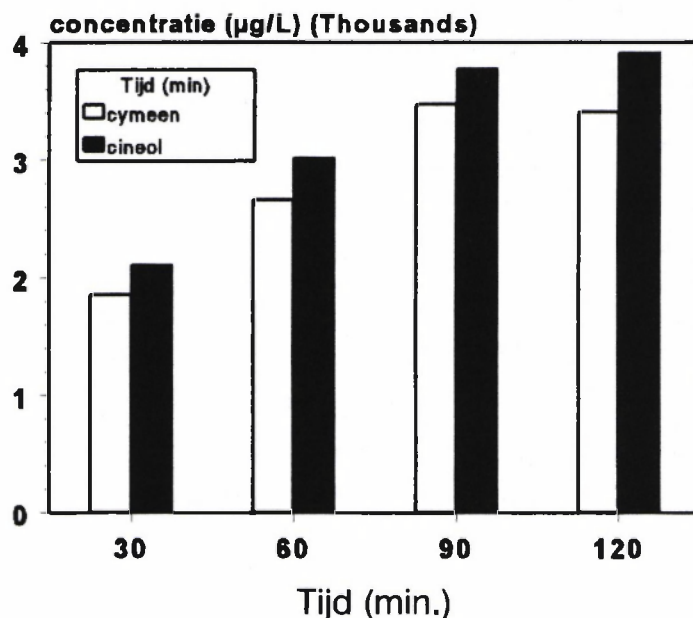
1,8 Cineol heeft bij de gebruikte dosering (3,8 mg/L lucht) een sterk fytotoxische werking op rozen. De fytotoxische effecten van cymeen (3,5 mg/ L lucht) op roos zijn beperkt.

Tabel 3.5 Effect van p-cymeen- en 1,8 cineol-behandeling van rozen (cv First Red, niet voorbehandeld) op vaasleven. De rozen (25 per object) zijn na vier dagen (18°C, 60% RV, 12 uur licht - 12 uur donker) beoordeeld door drie onafhankelijke experts op blad - en bloemschade alsmede bloemopening

parameter	% bloemen na behandeling met:		
	controle	p-cymeen	1,8 cineol
bladschade ^a	10%	100%	100%
bloemschade	15%	35%	85%
bloemopening ^b	+++	++	+

a) bij cymeen: lichte vlekken op het blad; bij cineol verwelking van het blad

b) +++ normale bloemopening, ++ vertraagde bloemopening; + sterk vertraagde opening



Figuur 3.8 Verdeling van de gasfaseconcentratie van p-cymeen en 1,8 cineol I in 60 liter-containers bij 20 °C, geladen met 25 rozen. Per container is 2 ml olie gedoseerd. Metingen zijn 30 min., 60 min., 90 min. en 120 min. na dosering uitgevoerd op 32 cm hoogte in de container.

3.6.2 Absorptie van linalool door roos, chryasant en lelie

In afwezigheid van bloemen in de containers wordt bij een dosering van 2 ml linalool, een gasfase-concentratie van 470 $\mu\text{g/L}$ gemeten (zie Fig. 3.6 en Tabel 3.6). Zoals reeds in § 3.6.1 is gemeld, wordt bij dezelfde dosering in aanwezigheid van 25 rozen een concentratie van 210 $\mu\text{g/L}$ in de gasfase gemeten. Dit is een aanwijzing dat een belangrijk deel van de linalool die in dampvorm aanwezig is, wordt geabsorbeerd door de rozen. In aanwezigheid van 25 chrysanten wordt een nog lagere concentratie in de lucht gevonden (124 $\mu\text{g/L}$, zie Tabel 3.6). De laagste concentratie linalool wordt waargenomen in aanwezigheid van tien lelies.

Conclusie

Bij blootstelling aan linalool nemen snijbloemen (rozen, chrysanten, lelies) een aanzienlijk deel van de vluchtige stof op uit de atmosfeer.

Tabel 3.6 Gasfaseconcentratie van linalool in 60 liter-containers bij 20°C, geladen met 25 rozen, 20 chrysanten of 10 lelies. Per container is 1 of 2 ml olie gedoseerd. Metingen zijn 120 min. na dosering uitgevoerd op 45 cm hoogte in de container

product	gasfaseconcentratie linalool in bij dosering van:	
	1 ml/container	2ml/container
geen		470 $\mu\text{g/L}$
roos	-	210 $\mu\text{g/L}$
chryasant	83 $\mu\text{g/L}$	124 $\mu\text{g/L}$
lelie	-	76 $\mu\text{g/L}$

3.6.3 Effecten van insectide-oliën op chryasant en lelie

In de eerste serie experimenten met linalool zijn geen fytotoxische effecten bij rozen aangetoond. In de volgende serie experimenten zijn chrysanten (cultivar White Reagan) en lelies (cultivar Casa Blanca) gedurende twee uur bij kamertemperatuur behandeld met linalool. Chrysanten zijn behandeld met twee doseringen: 1 ml per 60 l. container en 2 ml per 60 l. container. Lelies zijn behandeld met 2 ml per 60 l. container. In geen enkel geval kon een schade tengevolge van blootstelling aan linalool worden waargenomen. Dit wordt duidelijk geïllustreerd met de gegevens in Tabel 3.7. Na 16 dagen op de vaas was geen significant verschil in bloemverwelking en bloemopening waarneembaar tussen linalool begaste en onbehandelde bloemen.

Conclusie

Linaloolbehandeling heeft bij 124 $\mu\text{g/L}$ en 76 $\mu\text{g/L}$ geen nadelige invloed op de kwaliteit van respectievelijk chrysanten (White Reagan) en lelies (Casa Blanca).

Tabel 3.7 Effect van linaloolbehandeling van lelies (cv Casa Blanca, standaard voorbehandeld) op vaasleven. De lelies (20 stelen per object) zijn na 16 dagen (18 °C, 60% RV, 12 uur licht - 12 uur donker) beoordeeld op bloemverwelking en bloemopening

kenmerk	behandeling	
	controle	linalool
% verwelkte bloemen	26	24
% bloemen in knop	4,6	2,3

3.7 TOXICOLOGISCH DOSSIER LINALOOL

Op basis van uitgebreide literatuurstudies wordt linalool door verschillende internationale instanties (waaronder Council of Europe, FAO/WHO) geclassificeerd als een GRAS-verbinding (Generally Recognised as Safe). Een samenvatting van het toxicologisch dossier wordt gegeven in appendix A.

3.8 FYTOTOXICITEIT BIJ TOMATEN EN PAPRIKA

In een pilot experiment is vastgesteld dat blootstelling aan linalool (350-400 µg/L) geen negatieve effecten heeft op de kwaliteit van tomaten en paprika's (zie Appendix B).

3.9 MOTIVERING FASE I SELECTIE ETHERISCHE OLIËN

Bij de uiteindelijke selectie van de meest geschikte etherische oliën met insecticide-werking moet met een groot aantal criteria rekening worden gehouden. Ten eerste moeten stoffen geselecteerd worden met voldoende insecticide-werking tegen zoveel mogelijk verschillende soorten doelwit organismen. Tegelijkertijd moeten de stoffen geen of een zeer lage fytotoxiciteit hebben bij toepassing op snijbloemen. Verder moeten de stoffen in toxicologisch opzicht een veilig karakter hebben. Rekening houdend met deze drie (biologisch-technische) criteria en op basis van onze resultaten kunnen linalool (matige tot goede insecticide-werking, geen fytotoxiciteit en GRAS-status) en *p*-cymeen (goede insecticide-werking, lage fytotoxiciteit en GRAS-status) geselecteerd worden voor verder onderzoek in de tweede fase van het project. Naast genoemde criteria spelen voor een succesvolle praktijk-implementatie nog economische overwegingen een rol, zoals bijvoorbeeld de beschikbaarheid en prijs op de wereldmarkt.

In de tweede fase van dit project zal de insecticide-werking van linalool en *p*-cymeen in combinatie met extreme gascondities (hoog CO₂ en laag O₂) worden onderzocht.

3.10 LITERATUUR

- Beckstrom-Sternberg, S.M. and Duke, J.A. (1994) Potential for synergistic action of phytochemicals in spices. In: G. Charalambous (Editor) Spices, herbs and edible fungi, Elsevier Science B.V. Amsterdam, pp. 201-223.
- Calderone, N.W. and Spivak, M. 1995. Plant extracts for control of the parasitic mite *Varroa jacobsoni* (acari, varroidae) in colonies of the western honey bee (hymenoptera, apidae). J. Econ. Entomol. 88: 1211- 1215.
- Cutler, H.G. 1995. Natural product flavor compounds as potential antimicrobials, insecticides, and medicinals. Agro-Food-Industry Hi-Tech, 19-23.
- Duke, J.A. (1994) Biologically-active compounds in important spices. In: G. Charalambous (Editor) Spices, herbs and edible fungi, Elsevier Science B.V. Amsterdam, pp. 225-250.
- Garg, S.C. and Banerjee, A.K. 1996. Insect and pest control activity of essential oils. J. Essent. Oil Res. (In Press)
- Rice, P.J. and Coats, J.R. 1994. Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (*Diptera: Muscidae*), red flour beetle (*Coleoptera: Tenebrionidae*), and southern corn rootworm (*Coleoptera: Chrysomelidae*). J. Econ. Entomol. 87: 1172-1179.
- Shaaya, E., Ravid, U., Paster, N., Juven, B., Zisman, U. and Pissarev, V. 1991. Fumigant toxicity of essential oils against four major stored-product insects. J. Chem. Ecol. 17: - 499-504.
- Smid, E.J., Hendriks, L., Boerrigter, H.A.M. and Gorris, L.G.M. 1996. Surface disinfection of tomatoes using the natural plant compound *trans*-cinnamaldehyde. Postharvest Biol. Technol. 9: 343-350
- Su, H.C.F., Speirs, R.D. and Mahany, P.G. 1972. Toxicity of citrus oils to several stored-product insects: laboratory evaluation. J. Econ. Entomol. 65: 1438-1441.
- Weaver, D.K., Dunkel, F.V., Ntezurubanza, L., Jackson, L.L. and Stock, D.T. 1991. The efficacy of linalool, a major component of freshly-milled *Ocimum canum* Sims (Lamiaceae), for protection against postharvest damage by certain stored product Coleoptera. Journal of Stored Products Research, 27: 213-220.

4. GECOMBINEERD EFFECT VAN ETHERISCHE OLIËN EN CA-CONDITIES

4.1 INLEIDING

Een CA met insecticide-werking bestaat in het algemeen uit een inert gas (meestal stikstof) in combinatie met een lage concentratie zuurstof (< 1%) en/of een hoge concentratie kooldioxide (> 60%) (Annis, 1987; Taylor, 1994). De meest effectieve CA-omstandigheden lijken echter onvoldoende insecticide-werking te hebben om volledige doding in een relatief korte periode van één tot vier uur te bewerkstelligen. Dit is onderzocht voor o.a. *Frankliniella occidentalis* op aardbei (Aharoni *et al.*, 1979b, 1980) en *Myzus persicae* op sla (Hartsell *et al.*, 1979), waarbij een blootstelling van drie tot vier uur aan CO₂-concentraties variërend van 25 tot 70% bij 20-21 °C geen verhoging van de mortaliteit lieten zien ten opzichte van controle-insecten die in lucht van normale atmosferische samenstelling werden gehouden. Langere behandelingen bij hogere CO₂-concentraties van één tot twee dagen resulteren in het algemeen in hogere mortaliteit, die kan oplopen tot 100% voor *F. occidentalis* bij 90% CO₂ (Aharoni *et al.*, 1981). In tegenstelling tot eerdergenoemde resultaten, werd in een publicatie een hoge mortaliteit van 93,8-94,2% gemeld van *Thrips obscuratus*, bij een CA met 40 tot 60% CO₂ en 0% O₂ bij 24 °C gedurende een behandeltijd van vier uur (Carpenter *et al.*, 1996). Hierbij speelt waarschijnlijk een rol dat in de experimenten van Carpenter *et al.* (1996) de incubatie plaatsvond in 10 ml buizen zonder aanwezigheid van een voedselplant, terwijl in de eerdergenoemde experimenten de insecten werden geïncubeerd op de voedselplant. De temperatuur bij de blootstelling van insecten aan CA is ook van invloed, waarbij hogere temperaturen de mortaliteit doen toenemen. Er is een snelle toename van mortaliteit van *F. occidentalis* wanneer de temperatuur verhoogd wordt van 24 naar 36 °C (Carpenter *et al.*, 1996). Het lijkt de moeite waard om het effect van hogere temperatuur in combinatie met CA te onderzoeken, omdat dit de behandeltijd nog verder omlaag kan brengen. Er zijn verschillende parameters die de gevoeligheid van insecten ten opzichte van CA bepalen, waaronder biotische factoren (soort insect, levensstadium, leeftijd, gewicht/grootte en sex, voedselplant), fysiologische status (waterbalans, activiteit, ademhaling, voedselstatus) en fysische factoren (temperatuur, relatieve luchtvochtigheid, concentraties van CO₂ en O₂ en tijdsduur van de behandeling) (Fleurat-Lessard, 1990). Indien mogelijk, moeten de effecten van CA gescheiden worden in de effecten van hoge CO₂- en lage O₂-concentraties. In algemeen zullen hoge CO₂- en lage O₂-gehalten (Fleurat-Lessard, 1990) invloed hebben op overleving, afhankelijk of insecten verlies van water kunnen beperken, hun metabolisme kunnen vertragen en producten van glycolyse kunnen accumuleren. Een van de effecten van het houden van insecten onder hoge CO₂-omstandigheden is dat het insect de stigmata vaker of langer openzet, waardoor meer verlies van water zal optreden en waardoor uitdroging kan plaatsvinden (Lighton, 1996). Een behandeling met een etherische olie met insecticide-werking geeft net als CA, niet bij alle plaaginsecten volledige doding in een blootstellingsperiode van twee uur. Uit de literatuur is bekend dat de effectiviteit van begassingsmiddelen verhoogd kan worden door de behandeling te combineren met een CA met hoge CO₂- en/of lage O₂-concentratie. In een atmosfeer van 30% CO₂ was de

insecticide-werking van het middel acrylonitrile op drie algemeen voorkomende voorraadinsecten in graan vier tot zeven maal zo hoog dan de werking van het middel onder normale atmosferische omstandigheden. De effectiviteit van waterstofcyanide daarentegen werd niet significant verhoogd door bijmengen van CO₂ (Bond en Buckland, 1978). Bij een proef met bladluizen werd een hogere mortaliteit gevonden wanneer bladluizen begast werden met aceetaldehyde in een atmosfeer van 25-60% CO₂ (Hartsell *et al.*, 1979). Een CO₂-concentratie van 10% daarentegen leidde niet tot verhoging van de sterfte. Bovendien was er ook geen effect van lage O₂- (1-2%) concentraties wanneer dit werd toegepast gedurende de begassing met aceetaldehyde (Hartsell *et al.* 1979). In analogie met begassingsmiddelen, zou CA ook effect kunnen hebben op een behandeling met etherische olie. Een synergistisch effect van CO₂ op een begassingsmiddel kan het gevolg zijn van een effect van CO₂ op het detoxificatiesysteem in het insect (Carlson, 1967). Een andere mogelijkheid is dat een hoog CO₂-gehalte tijdens begassing ervoor zorgt dat de stigmata van het insect vaker of langer openstaan, waardoor een betere penetratie van het begassingsmiddel in het lichaam van het insect plaatsvindt (Aharoni *et al.*, 1980). Het doel van de huidige experimenten is om na te gaan of combinatie van etherische oliën en extreme CA-condities elkaars werking aanvullen of versterken.

4.2 MATERIAAL EN METHODEN

4.2.1 Pilot experimenten

Vooraf aan de experimenten zijn een aantal pilot-proeven gedaan om de opstelling te optimaliseren. Door veranderingen verschilt de experimentele uitvoering van voorgaande experimenten met etherische oliën. Er is besloten om de grootte van de flessen terug te brengen van 300 ml naar 100 ml in verband met de kortere flushperiode die in dat geval nodig is. Na analyse van flush-tijden is gekozen voor 8 minuten flushen met een totale stroomsnelheid van 100 ml/min. Bovendien blijkt uit de analyse van gassen in de tijd, dat de uitwisseling van gassen door het septum na twee uur incubatie minimaal is. Tijdens deze pilot-proeven werd ook gekeken naar het effect van luchtbevochtiging, maar kon er geen verschil aangetoond worden in mortaliteit van tripsen uit flessen met onbevochtigde of bevochtigde lucht. Na twee experimenten is echter toch besloten de lucht te bevochtigen omdat er in deze experimenten wel een effect optrad. Bij de 100% N₂-behandeling is bovendien gebleken dat een uur na de incubatietijd een groot aantal tripsen (18 van de 29), die direct na het opheffen van de CA nog immobiel waren, bijgekomen zijn uit de verdoving. Er is daarom besloten voor een extra controle van de mortaliteit één uur na afloop van de behandelingsduur. Een extra controle na 24 uur bleek niet noodzakelijk. Verder is gekeken naar de etherische olieconcentratie in de 100 ml-flessen, waarbij twee niveaus van de etherische olie bereikt moeten worden. Het hoge niveau moet vergelijkbaar zijn aan de LD₅₀ en het lage niveau moet op minder dan de helft van deze hoeveelheid liggen. In eerste instantie is gekozen om linalool en cymeen toe te dienen in hoeveelheden van 0,5 µl en 1 µl. Uit de resultaten van experiment A blijkt echter dat het toedienen van 0,5 µl linalool niet genoeg verschilt van de behandeling waar 1 µl wordt toegediend; beide waarden liggen dicht bij de maximum dampconcentratie. In volgende

experimenten is daarom voor de lage concentratie etherische olie 0,1 μ l opgebracht.

4.2.2 Experimentele opstelling

Insecten worden verzameld van de waardplant. In het geval van de Californische trips, *F. occidentalis*-larven en -adulten is dit chrysant. De aardappeltopluis, *Macrosiphum euphorbiae*, wordt gekweekt op chrysant, Gerbera of roos en kaswittevlug *Trialeurodes vaporariorum* is afkomstig van Gerbera. In elke fles worden ongeveer 35 insecten overgebracht. De flessen worden afgesloten met een dop met daarin een rubber septum.

In de behandelingen met etherische olie wordt de olie op een ponsje filterpapier (doorsnee 6 mm) gepipetteerd en in de fles gebracht. In experiment A is 0,5 μ l en 1 μ l linalool toegevend, in latere experimenten is 0,1 μ l en 1 μ l van de etherische olie op een ponsje aangebracht. Omdat het toedienen van 0,1 μ l praktisch slecht reproduceerbaar is, is er een verdunning gemaakt van 1:10 in ethanol, zodat 0,1 μ l etherische olie + 0,9 μ l ethanol wordt opgebracht. Om een eventueel effect van ethanol op te heffen bij de andere behandelingen, wordt ook hier ethanol toegevoegd. Bij de hoogste concentratie wordt in dat geval 1 μ l olie + 0,9 μ l ethanol opgebracht. De controle bestaat uit het aanbrenge van 0,9 μ l ethanol op het ponsje in één fles, aan de tweede fles wordt geen ethanol toegevoegd. Er blijken geen verschillen in mortaliteit op te treden tussen flessen met of zonder toediening van ethanol.

Door het septum van de afgesloten flessen wordt een injectienaald gestoken die aangesloten is op een slang, waardoor de te testen atmosfeer in de fles gebracht wordt. Een langere naald zorgt ervoor dat de atmosfeer zich gelijkmatiger in de fles kan verdelen. Een tweede injectienaald in het septum zorgt voor de doorstroom van de test-atmosfeer in de fles en de afvoer van gassen uit de fles. De totale stroomsnelheid bedraagt 100 ml per minuut. De gassen worden gemengd met een mengpaneel. In de eerste twee experimenten is de lucht niet bevochtigd voordat het in de fles is geleid, in experiment 3 en verdere experimenten zal bevochtigen van de lucht wel plaatsvinden. Dit wordt gedaan door het gas door water te laten borrelen voordat het in de flessen geleid wordt. Na 8 minuten flushen worden de naalden uit het septum gehaald en de fles gedurende twee uur bewaard bij 20 °C. Aan het einde van de behandelingstijd wordt de gassamenstelling en de hoeveelheid etherische olie in de flessen gemeten en geanalyseerd met behulp van een gaschromatograaf. Na het opheffen van de CA worden vervolgens de insecten gecontroleerd op immobiliteit. Aktieve insecten worden geteld en verwijderd, immobiele insecten worden overgebracht naar glazen petrischalen die afgesloten worden met parafilm. In elke petrischaal wordt een stukje vochtig filtreerpapier gedaan om de luchtvochtigheid hoog te houden. Na een periode van een uur worden de insecten nogmaals gecontroleerd op activiteit; insecten die na aanraken niet bewegen worden geteld als dode insecten.

Het experiment wordt volgens het onderstaande schema uitgevoerd, waarbij elke behandeling in duplo wordt gedaan.

Tabel 4.1 Schema van de proefopzet van het experiment met een combinatie van CA en etherische olie

instelling van de CA			dosis etherische olie		
% CO ₂	% N ₂	%O ₂	geen	1/2 LD ₅₀	LD ₅₀
0	100	0	1 & 2 [#]	3 & 4	5 & 6
20	80	0	7 & 8	9 & 10	11 & 12
50	50	0	13 & 14	15 & 16	17 & 18
100	0	0	19 & 20	21 & 22	23 & 24
0	79	21	25 & 26	27 & 28	29 & 30

[#] Nummer van de flessen; in totaal 30 flessen per experiment

4.3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

4.3.1 Experiment A: Gecombineerd effect van linalool en CA op adulten van de Californische trips *F. occidentalis*.

De resultaten van het experiment A staan vermeld in Tabel 4.2. De hoogste mortaliteit van 100% wordt verkregen bij een combinatie van 0,5 µl linalool en een CO₂-gehalte van ongeveer 50%. Bij alle combinaties van linalool met CA is het resultaat beter dan wanneer linalool gecombineerd wordt met gewone atmosfeer. Geconcludeerd wordt dat er een versterkend effect is van het bijmengen van CO₂, of het weglaten van O₂ op de werking van linalool. Vergeleken met wat bekend is uit de literatuur is er een vrij hoge sterfte (66,6%) bij een CA met een hoog CO₂-gehalte van 50%. Dit zou te wijten kunnen zijn aan de hogere experimentele temperatuur. Een gedeelte van de incubatie heeft plaatsgevonden in het lab, waar een temperatuur heerste van ongeveer 28 °C. In een volgend experiment zullen de flessen gedurende twee uur geïncubeerd worden in een klimaatcel met een constante temperatuur van 20 °C. Binnen een uur na het opheffen van de atmosfeer met insecticide-werking komt er een aanzienlijk gedeelte van de tripsen (17%) bij uit de verdoving als gevolg van blootstelling aan deze atmosfeer. Het is daarom van belang om de uiteindelijke mortaliteit een uur na het opheffen van de insecticide-atmosfeer vast te stellen in plaats van direct na het openen van de flessen. De mortaliteit is opnieuw gecontroleerd 24 uur na aanvang van het experiment. In de behandeling met een hoog CO₂-gehalte werden op dit tijdstip vijf tripsen gevonden die bijgekomen waren uit de verdoving. Bij de rest van de behandelingen zijn geen tripsen gevonden die 24 uur later bijgekomen zijn.

Tabel 4.2 Gecombineerd effect van linalool en CA op adulte Californische trips, *F. occidentalis*

atmosfeer werkelijke waarden			% mortaliteit ^a hoeveelheid toegediend linalool		
% CO ₂	% N ₂	% O ₂	geen	0,5 µl	1 µl
0.3	99.7	0.3	10.4	95.1	93.8
8.2	80.8	9.5	0	72.6	91.7
43.9	56.3	3.7	66.6	100	98.7
20.9	62.5	14.8	46.4	94.9	99.0
0.1	76.8	18.3	2.7	38.6	38.1

^a gemiddelde waarde van twee waarnemingen

Bij de instelling van de CA's is in sommige gevallen niet de atmosfeer bereikt die is ingesteld. De afwijking tussen de ingestelde waarden en de gemeten waarden is waarschijnlijk veroorzaakt doordat vooraf het systeem niet lang genoeg doorgestroomd is. Op het moment dat de flessen aangesloten werden had de atmosfeer zich waarschijnlijk nog niet voldoende ingesteld. Bij een lage stroomsnelheid van 100 ml/min is het van belang voldoende tijd te nemen zodat het gehele systeem doorgestroomd wordt en de gewenste atmosfeer zich kan instellen.

Bij het opbrengen van linalool op de ponsjes is uitgegaan van de LD₅₀-waarde voor tripsadulten. Er is 1/3 van de hoeveelheid genomen die voor de grotere flessen, met ongeveer 3x zoveel inhoud, opgebracht is. Daarnaast is rekening gehouden met de hoeveelheid die praktisch op te brengen is (in verband met pipetfout). Er is daarom gekozen voor 0,5 µl en 1 µl linalool. Uit de bepalingen van de linaloolconcentraties blijkt echter dat de lage en hoge concentratie niet veel verschillen en dat ze beide dicht bij de maximum dampspanning liggen. In de flessen met CA zijn bij de lage en hoge hoeveelheid linalool concentraties gemeten van respectievelijk 265 (± 25) en 350 (± 33) µg/l linalool. In de controleflessen (bij een gassamenstelling van 76,8% N₂ en 18,3% O₂), die niet geflushed zijn, werden lagere concentraties gemeten van respectievelijk 180 en 250 µg/l linalool. De hogere concentraties bij het flushen zouden veroorzaakt kunnen worden door een verhoogde verdamping als gevolg van meer luchtbeweging in de fles door het flushen. Doordat de waarden te dicht bij elkaar liggen wordt bij toekomstige experimenten bij de lage concentratie 0,1 µl etherische olie opgebracht.

4.3.2 Experiment B: Gecombineerd effect van linalool en CA op adulten van de Californische trips *F. occidentalis*.

De resultaten van experiment B staan vermeld in Tabel 4.3. Er treedt 100% sterfte op bij een hoge linaloolconcentratie in combinatie met CO₂-gehaltes van 20 tot 100%. Een hogere concentratie van linalool werkt in alle gevallen beter (of even goed, in het geval van linalool + 20% CO₂) dan de lage linaloolconcentratie.

Daarnaast wordt 100% sterfte gevonden bij een CO₂ /N₂-concentratie van 20%/80%, waarbij het al dan niet toevoegen van linalool geen effect heeft; bij alle behandelingen met deze CA trad 100% sterfte op.

Het weglaten van O₂ (100% N₂) heeft een minder uitgesproken effect bij een lage linaloolconcentratie op de werking van linalool dan bij hogere concentraties. Bij 0,1 µl linalool is de sterfte gestegen van 9,0% onder normale atmosferische omstandigheden tot 19,0% bij 100% N₂, terwijl bij een hoeveelheid van 1 µl linalool de sterfte in dit geval toeneemt van 24,1% naar 80,0%. Wel moet aangemerkt worden dat de concentratie van O₂ in de 100% N₂-behandeling hoger lag (1,37%) dan in de andere behandelingen (0,0297-0,28%). In het vorige experiment (6 juni) werd een lager O₂-gehalte gemeten (0,3%) in de 100% N₂, maar waren de resultaten vergelijkbaar met de huidige.

Vergeleken met wat bekend is uit de literatuur is de sterfte hoog bij alle CA's met een hoog CO₂-gehalte en zonder toepassing van linalool. Dit trad ook op in het vorige experiment en werd toen geweten aan de hoge experimentele temperatuur, die ongeveer 28 °C bedroeg. In het huidige experiment was de temperatuur 20 °C en treedt opnieuw een hoge sterfte op. Tijdens het flushen van de flessen werd de lucht niet bevochtigd, wat een effect zou kunnen hebben. Daarom zal in toekomstige experimenten de lucht wel bevochtigd worden. Bovendien zou een hoge sterfte te wijten kunnen zijn aan het feit dat tijdens de experimenten de tripsen geïncubeerd worden zonder voedselplant, waardoor uitdroging sneller plaatsvindt dan wanneer hetzelfde experiment zou plaatsvinden op de waardplant. Bij hogere CO₂-concentraties neemt de ademhaling toe en wordt het gevaar van uitdrogen groot, vooral wanneer de luchtvochtigheid laag is, of geen schuilplaatsen of mogelijkheden tot voedselopname aanwezig zijn.

De mortaliteit werd opnieuw gecontroleerd 24 uur na aanvang van het experiment. In de behandeling met een hoog CO₂-gehalte werden op dit tijdstip één trips gevonden die bijgekomen was uit de verdoving. Bij de rest van de behandelingen zijn geen tripsen gevonden die 24 uur later bijgekomen zijn. Bij toekomstige experimenten wordt daarom deze controle achterwege gelaten.

Dit experiment is een herhaling van experiment 1. In dit geval werden de gewenste gassenstellingen goed bereikt, en werden de flessen met tripsen geïncubeerd gedurende een periode van twee uur bij 20 °C. Bij het opbrengen van linalool op de ponsjes is uitgegaan van de LD₅₀-waarde voor tripsadulten. Uit het vorige experiment bleek dat 0,5 µl linalool niet voldoende verschillend was van de hoge linalool hoeveelheid van 1 µl; in beide gevallen was de gemeten linaloolconcentratie bijna maximaal. Daarom is in dit experiment voor het toedienen van 0,1 en 1 µl linalool gekozen. Omdat het toedienen van 0,1 µl praktisch slecht reproduceerbaar is, is er een verdunning gemaakt van 1:10 in ethanol, zodat 0,1 µl etherische olie + 0,9 µl ethanol wordt opgebracht. Om het eventuele effect van ethanol op te heffen bij de andere behandelingen, werd ook hier ethanol toegevoegd; bij de hoogste concentratie wordt in dat geval 1 µl olie + 0,9 µl ethanol opgebracht. De controle bestaat uit het aanbrenge van 0,9 µl ethanol op het ponsje in één fles, aan de tweede fles werd geen ethanol toegevoegd. Er waren geen verschillen zichtbaar in mortaliteit tussen flessen met of zonder toediening van ethanol. In de flessen met CA zijn bij de lage en hoge hoeveelheid linalool concentraties gemeten van respectievelijk 41 (± 3) en 154 (± 33) µg/l linalool. In de controleflessen (bij 77,7% N₂ en 22,0% O₂), die niet geflushed zijn werden afwijkende concentratie gemeten van respectievelijk 62 en 115 µg/l.

Tabel 4.3 Gecombineerd effect van linalool en CA op adulte Californische trips, *F. occidentalis*

atmosfeer werkelijke waarden			% mortaliteit ^{&} hoeveelheid toegediend linalool [%]		
% CO ₂	% N ₂	% O ₂	geen	0,1 µl	1 µl
0.186	98.4	1.37	15.4	19.0	80.0
20.2	79.7	0.100	100	100	100
49.6	50.3	0.0297	84.0	89.7	100
99.6	0.105	0.280	94.3	97.1	100
0.218	77.7	22.0	1.3	9.0	24.1

[&] gemiddelde waarde van twee waarnemingen

[%] één van de twee controle flessen bestond uit het opbrengen van 0,9 µl ethanol (gebruikt als oplosmiddel voor verdunning van linalool). Toediening van 0,1 µl linalool vond plaats als een mengsel van 0,1 µl en 0,9 µl ethanol, en 1 µl linalool werd opgebracht met 0,9 µl ethanol.

4.3.3 Experiment C: Gecombineerd effect van cymeen en CA op adulten van de Californische trips *F. occidentalis*.

De resultaten van experiment C staan vermeld in Tabel 4.3. De maximum mortaliteit van 92,8% wordt verkregen met een hoge cymeenconcentratie in combinatie met 100% CO₂, gevolgd door een CO₂/N₂-concentratie van 35%/65% waar de mortaliteit iets lager ligt (78,8%). Combinaties van cymeen met CO₂, behalve bij de behandeling met de 11% CO₂-concentratie, zijn effectiever dan een toepassing van enkel cymeen. Dit geldt vooral bij hoge cymeenconcentraties. Een hogere concentratie van cymeen werkt in alle gevallen, behalve in een N₂-atmosfeer, beter dan de lage cymeenconcentratie. Bovendien is er weinig verschil tussen de mortaliteit bij een lage cymeenconcentratie en wanneer geen cymeen is toegediend. De resultaten bij een N₂-atmosfeer zijn afwijkend van de rest. In een N₂-atmosfeer ligt de mortaliteit bij de twee behandelingen met cymeen wat hoger dan de controle zonder cymeen, maar er lijkt geen effect te zijn van de hoogte van de cymeenconcentratie.

Er is een grote verschil (spreiding) in percentages mortaliteit tussen de twee flessen van een behandeling. Als voorbeeld kan genoemd worden de behandeling van een hoog cymeengehalte bij 100% N₂. In deze behandeling trad in fles 1 70,2% sterfte op, terwijl in fles 2 9,1% van de tripsen dood was. Het gemiddelde is 39,7%. Het is niet duidelijk waardoor dit is opgetreden.

Vergeleken met de vorige twee experimenten is de sterfte bij alle CA's zonder toediening van cymeen laag; de sterfte varieert van 3,3 to 30,5%). In het huidige experiment is tijdens het flushen de lucht bevochtigd, wat een gunstig effect lijkt te hebben op het omlaagbrengen van de mortaliteit in de controlegroepen met CA en zonder cymeen. De experimentele temperatuur tijdens de incubatie van twee uur was 20°C.

In een aantal behandelingen is de gewenste instelling niet bereikt doordat de stroomsnelheid van de gassen niet goed is ingesteld.

Tabel 4.4 Gecombineerd effect van cymeen en CA op adulte Californische trips, *F. occidentalis*

atmosfeer werkelijke waarden			% mortaliteit ^a hoeveelheid toegediend cymeen ^b		
% CO ₂	% N ₂	% O ₂	geen	0,1 µl	1 µl
0.0328	99.9	0.0563	24.8	55.1	39.7 ^c
11.2	88.8	0.0540	5.1	11.6	28.8 ^c
32.2	65.9	1.96	30.5	23.9	78.8
99.3	0.469	0.146	3.3	3.0	92.8
0.306	79.2	20.5	5.0	8.5	53.3

^a gemiddelde waarde van twee waarnemingen

^b één van de twee controle flessen bestond uit het opbrengen van 0,9 µl ethanol (gebruikt als oplosmiddel voor verdunning van linalool). Toediening van 0,1 µl linalool vond plaats als een mengsel van 0,1 µl en 0,9 µl ethanol, en 1 µl linalool werd opgebracht met 0,9 µl ethanol.

^c grote verschil in mortaliteit bij de twee flessen binnen 1 behandeling

4.4 CONCLUSIE

Uit de drie experimenten die reeds zijn uitgevoerd, wordt geconcludeerd dat een combinatie van CA en etherische olie een grotere insecticide-werking heeft dan een behandeling met enkel etherische olie of CA. In enkele combinaties van CA en olie wordt een maximale sterfte van 100% bereikt en in het algemeen wordt in combinaties een hogere mortaliteit gevonden dan in enkele behandelingen met CA of etherische olie. Bovendien is tijdens de experimenten voor een lagere dosis van etherische olie gekozen, die in voorgaande experimenten met toepassing van enkel cymeen of linalool geen maximale sterfte gaf. Hierdoor is het mogelijk het versterkende effect van CA beter te evalueren. Als etherische olie is gekozen voor linalool en cymeen omdat deze twee stoffen een goede doding geven van de toetsinsecten en bovendien niet tot weinig fytotoxisch zijn voor roos, chrysaal en lelie. Tijdens het uitvoeren van de drie experimenten zijn enkele praktische problemen aan het licht gekomen, waarvoor in alle gevallen een oplossing gevonden kon worden. Hierdoor kan een verdere uitvoering van experimenten zonder problemen verlopen.

4.5 LITERATUUR

Alle in dit hoofdstuk genoemde literatuur is te vinden in de lijst in paragraaf 2.7.

5. AANBEVELING VOOR TWEDE FASE

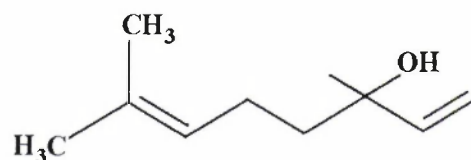
In het eerste jaar van het project '*Ontwikkeling van een effectieve methode om glastuinbouwproducten insectenvrij en met verbeterde milieu- en productkwaliteit te kunnen exporteren*' is aangetoond dat er alternatieven voor methylbromide mogelijk zijn. De etherische oliën linalool en *p*-cymeen hebben een insecticide-werking, zonder ernstige fytotoxische effecten. Toepassing van CA-condities verhoogt de effectiviteit hiervan. Op basis van de resultaten verkregen in de eerste fase, ligt voor de tweede fase een keuze voor een scenario waarin etherische oliën gecombineerd worden met CA-omstandigheden voor de hand.

APPENDIX A. Toxicologisch dossier *linalool*

Chemical formula: C₁₀H₁₈O

Linalool is an optically active molecule and both forms (d- and l-) occur naturally, in varying proportions, in oils (Opdyke, 1975).

Preferred name: 1,6-octadien-3-ol, 3,7-di-methyl



Synonyms: allo-ocimanol; linalyl alcohol; 2,6-dimethyl-2,7-octadien-6-ol; 3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol

Chemical abstracts registry number: 78-70-6

Official classification:

- C.E.: List A (CE, 1992).
- JEFCA. ADI: a group ADI of 0-0.5 mg/kg bw was allocated for citral, geranyl acetate, citronellol and linalyl acetate; however, it has been recommended that at least one member of this group of compounds should be studied for effects of long-term exposure (JECFA, 1980).

METABOLISM

The metabolism of radioactively-labelled linalool has been investigated in the rat. Following a dose of 500 mg/kg bw by stomach tube 93% was excreted within 72 hr, in the urine (55%), faeces (23%) and expired air (15%). The remaining radioactivity was located mainly in the liver (0.5%), gut (0.6%), skin (0.8%) and skeletal muscle (1.2%) (Parke *et al.*, 1974a).

TOXICOLOGICAL DATA

LOCAL EFFECTS

Skin irritation

Human

Mild irritation resulted from the 48-hr covered application of a 32% solution in acetone (Motoyoshi *et al.*, 1979). Up to 30% in petrolatum has been recommended in patch tests [generally involving 24/48-hr covered contact] to test individuals for sensitization to linalool, and this concentration would thus be expected to be non-irritant to most healthy individuals (Nater en De Groot, 1985). Linalool was non-irritant to the skin of an unspecified number of volunteers when tested at 20% in petrolatum in a 48-hr covered patch test - (Kligman, 1970), and when applied in covered patch tests [duration unspecified] to 28 volunteers at 20% in vaseline or ointment (Fujii *et al.*, 1972). No irritation was reported in several other patch test studies using levels up to 8% (Fujii *et al.*, 1972; Kligman, 1972).

Non-human

The neat material applied to intact or abraded rabbit skin for 24 hr under cover caused mild to moderate irritation (Fogleman, 1970; Levenstein, 1973). A regime in which the neat material was applied to the uncovered skin of rabbits, followed 24 hr later by a second application and then a third 24 hr after that, was described as severely irritating (Motoyoshi *et al.*, 1979). Similar regimes in the rat and guinea-pig produced moderate irritation (Motoyoshi *et al.*, 1979). In three separate experiments, the neat material applied under a semi-occluded patch to the intact skin of groups of three or four rabbits for 4 hr produced, at worst, only slight reddening and swelling (ECETOC, 1995). A 48-hr covered patch was not irritant to the skin of six miniature swine (Motoyoshi *et al.*, 1979).

Other local effects

Non-human

Daily application of a 20% solution in ethanol to guinea-pig skin for 8-10 days caused some thickening of the epidermis (Schaaf, 1961).

SENSITIZATION AND INTOLERANCE

Human

Linalool was identified using patch tests [generally 24/48-hr covered contact] as a causative allergen in three of 75 patients with allergic contact dermatitis to cosmetics (De Groot, 1987). In another series of 119 patients with contact dermatitis caused by cosmetics, one reacted to 10% linalool in petrolatum when it was applied as a covered patch for 48 hr (De Groot *et al.*, 1988). [There may have been some overlap between the two groups of patients.] A man developed allergic contact dermatitis and responded to a patch test [probably involving 24/48-hr covered contact] with 30% linalool in petrolatum (De Groot en Liem, 1983).

In an unsuccessful attempt to induce sensitization (following the maximization procedure), 25 volunteers were given five consecutive 48-hr covered patch tests with 8% [presumably in petrolatum], alternated with treatment with a mild irritant, over a 15-day period, followed 10 days later by a 1-hr covered challenge patch with 10% and then a 48-hr covered patch with 8%. None of the volunteers developed a reaction indicative of sensitization (Grief, 1967). Other attempts to sensitize groups of 25 individuals in maximization tests were also unsuccessful in regimes involving concentrations of up to 20% (where specified, in petrolatum) (Ishihara *et al.*, 1986; Kligman, 1970; Kligman, 1972).

Non-human

Sensitization was not induced in a guinea-pig maximization test in which 10% [presumably in petrolatum] was used as the induction and challenge concentrations (Ishihara *et al.*, 1986). The maximization test generally involves several intradermal injections of the test substance and adjuvant to increase the immune response, followed 1 week later, by a single 48-hr covered skin application of the test substance. Three weeks after the start of the induction phase, a challenge 24-hr covered skin application is made.

GENERAL SYSTEMIC EFFECTS

Acute data

Non-human

Oral:

LD₅₀ rat: 2.8-4.2 g/kg bw (Jenner *et al.*, 1964; Levenstein, 1973). Rats given lethal doses developed muscle incoordination and died within 4-18 hr (Jenner *et al.*, 1964).

Inhalation:

Decreased movement was observed in mice inhaling linalool vapour for 30-60 minutes. The concentration of linalool was estimated as 3.2 mg/l in one study (Buchbauer *et al.*, 1991; Buchbauer *et al.*, 1993).

Dermal:

LD₅₀ rabbit: > 5 g/kg bw (Fogleman, 1970; Levenstein, 1973) [exposure conditions unspecified].

Subacute data

Non-human

Rat: Increased liver weight and an induction of liver peroxisomal enzymes was observed in rats given 1.5 g/kg bw/day for 5 days, by stomach tube (Roffey *et al.*, 1990).

An increase in the level of cytochrome P450 within liver microsomes was observed in rats given 0.6 g/kg bw/day for 3 days by stomach tube, although the level had returned to normal after 6 days' treatment (Chadha en Madyastha, 1984).

Decreased liver weight and changes in the activity of certain liver enzymes (including cytochrome P450) occurred in rats given 0.5 g/kg bw/day for up to 64 days (Parke *et al.*, 1974b).

Mouse: There were no effects on body weight or spleen and thymus weight, and no overt signs of toxicity when 30 mice were given up to 375 mg/kg bw/day for 5 days by stomach tube. Immune function appeared normal; there was no increase in mortality in a host-resistance assay in which a group of twenty of the treated mice were challenged with *Listeria monocytogenes* bacteria, and there were no change in the antibody plaque-forming cell response to sheep red blood cells in the remaining ten treated mice (Ga worski *et al.*, 1994).

Subchronic data

Human

Over a 3-month period, linalool was not associated with any increased symptoms among 200 unexposed controls and 496 workers occupationally exposed to flea control products, including linalool (Ames *et al.*, 1989). [No further details were given.]

REPRODUCTIVE TOXICITY

No relevant data identified.

CARCINOGENICITY

Non-human

Rat: A group of 50 rats was fed a diet containing 1% linalool [approximately 0.5 g/kg bw/day] for 2 wk, treated with a carcinogen known to induce mammary tumours, and maintained on the linalool diet for further 18 wk. There was no change in the latency period to tumour development or in the number of tumours induced by the carcinogen (Russin *et al.*, 1989).

Mouse: No increase in the number of lung tumours was observed when groups of 15 male and 15 female mice, of a strain susceptible to tumours at this site, were given 125 or 25 mg/kg bw, three times/wk for 8 wk by intraperitoneal injection and observed for a further 16 wk. Only a limited range of tissues were examined (Stoner *et al.*, 1973).

Linalool was described as eliciting a weak tumour-promoting response on the skin when it was applied as a 20% solution in acetone to mice. Details of the study are unclear, but probably involved an initial single application of a known skin carcinogen followed three weeks later by a weekly application of 0.25 ml [approximately 1.5 g/kg bw] for 33 wk (Roe en Field, 1965). [No further details were given].

Modern regulatory guidelines recommend that groups of 50 rodents of each sex are exposed for a minimum of 2 yr (rats) or 1 yr (mice) to one of several doses and that a comprehensive range of tissues is examined microscopically.

OTHER GENOTOXICITY

Bacteria

Linalool was not mutagenic in Ames tests using *Salmonella typhimurium* bacteria both in the presence (Eder *et al.*, 1980; Heck *et al.*, 1989; Rockwell en Raw, 1978; Ishidate M. *et al.*, 1984) and absence (Eder *et al.*, 1980; Heck *et al.*, 1989) of a liver metabolic activation system.

It was not mutagenic to *Escherichia coli*, but has given both positive (Yoo, 1986) and negative (Oda *et al.*, 1978) results in rec-type assays, which provide indirect evidence of DNA damage, with *Bacillus subtilis*.

Mammalian cells in culture

Mutations were induced in mouse lymphoma cells treated in the presence but not absence of a liver metabolic activation system (Heck *et al.*, 1989).

Chromosomal aberrations were not observed in a chinese hamster fibroblast cell line in the absence of a liver metabolic activation system (Ishidate *et al.*, 1984).

References

- Ames R.G. *et al.* (1989). *Am. Ind. Hyg. Ass. J.* **50**: 466.
- Buchbauer G. *et al.* (1991). *Z. Naturf.* **46C**: 1067.
- Buchbauer G. *et al.* (1993). *J. Pharm. Sci.* **86**: 660.
- CE (1992). *Flavouring substances and natural sources of flavourings, Part I.* (Blue Book) 4th Ed., Council of Europe, Maastricht, Strasbourg.
- Chadha A. en Madyastha *Xenobiotica* **14**: 365.
- De Groot A.C. en Liem D.H. (1983). *Contact Dermatitis* **9**: 230.
- De Groot A.C. (1987). *Contact Dermatitis* **17**: 26.
- De Groot A.C. *et al.* (1988). *Archs Derm.* **124**: 1525.
- ECETOC (1995). *Skin irritation and corrosion: Reference Chemicals Data Bank.* Tech. Rep. 66 European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Brussels.
- Eder E. *et al.* (1980). *Biochem. Pharmacol.* **29**: 993.
- Fogleman R.W. (1970). Report to RIFM, 14 September (cited in Opdyke, 1975).
- Fujii T. *et al.* (1972). *Yukagaku* **21**: 904 (cited in Opdyke, 1975).
- Gaworski C.L. *et al.* (1994). *Fd Chem. Toxic.* **32**: 409.
- Grief N. (1967). *Am. Perfumer Cosm.* **82**: 54.
- Heck J.D. *et al.* (1989). *Toxicologist* **9**: 257.
- Ishidate M. *et al.* (1984). *Fd Chem. Toxic.* **22**: 623.
- Ishihara M. *et al.* (1986). *Skin Res.* **28**: 230.
- JECFA (1980). 23rd Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Tech. Rep. Ser. Wld Hlth Org. No. 648.
- Jenner P.M. *et al.* (1964). *Fd Cosmet. Toxicol.* **2**: 327.
- Kligman A.M. (1970). Report to RIFM, 7 October (cited in Opdyke, 1975)
- Kligman A.M. (1972). Report to RIFM, 22 November (cited in Opdyke, 1976).
- Levenstein I. (1973). Report to RIFM, 2 February and 16 February (cited in Opdyke, 1976).
- Motoyoshi K. *et al.* (1979). *Cosmet. Toilet.* **94**: 41.
- Nater J.P. en De Groot A.C. (1985). *Unwanted Effects of Cosmetics and Drugs used in Dermatology.* 2nd Ed. Elsevier, Amsterdam.
- Oda Y. *et al.* (1978). *Osaka Furitsu KEKHSEM* **9**: 177.
- Opdyke D.L.J. (1975). *Fd Cosmet. Toxicol.* **13**: 827.
- Opdyke D.L.J. (1976). *Fd Cosmet. Toxicol.* **14**: 673.
- Parke D.V. *et al.* (1974a). *Biochem. Soc. Trans. London* **2**: 612. (cited in Opdyke, 1975).
- Parke D.V. *et al.* (1974b). *Biochem. Soc. Trans. London* **2**: 615. (cited in Opdyke, 1975).
- Rockwell P. en Raw I. (1978). *Nutr. Cancer* **1**: 10.
- Roe F.J.C. en Field W.E.H. (1965). *Fd Cosmet. Toxicol.* **3**: 311.
- Roffey S.J. *et al.* (1990). *Fd Chem. Toxic.* **28**: 403.
- Russin W.A. *et al.* (1989). *Carcinogenesis* **10**: 2161.
- Schaaf F. (1961). *Dermatologica* **123**: 362.
- Stoner G.D. *et al.* (1973). *Cancer Res.* **33**: 3069.
- Yoo Y.S. (1986). *J. Osaka Cy Med. Cent.* **34**: 267.

APPENDIX B. Fytotoxiciteit bij tomaten en paprika, pilot experiment

Behandeling van trostomaten en paprika's met linalool (350-400 $\mu\text{g/L}$). Effecten op een aantal kwaliteitskenmerken zijn aangegeven met (+ ; geen afwijking) en (- ; afwijkend). De vruchten zijn gedurende twee uur bij 20°C behandeld en vervolgens bij 10°C uitgesteld. Beoordeling heeft na zes dagen plaats gevonden.

Trostomaat (n=12)

kenmerk	controle	behandeld
uiterlijk	+	+
geur	+	+
smaak	+	+
stevigheid	+	+

Paprika (n=8)

kenmerk	controle	behandeld
uiterlijk	+	+
geur	+	+
smaak	nb*	nb*
stevigheid	+	+

*nb = niet behandeld