



WAGENINGENUR

For quality of life

Effecten van stikstofoxiden en etheen op paprika

C.J. van Dijk, E. Meinen & Th. A. Dueck





Effecten van stikstofoxiden en etheen op paprika

C.J. van Dijk, E. Meinen & Th. A. Dueck

© 2010 Wageningen, Wageningen UR Glastuinbouw

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Wageningen UR Glastuinbouw



PT-nummer: 13387

Wageningen UR Glastuinbouw

Adres : Droevendaalsesteeg 1, 6708 PB Wageningen
: Postbus 16, 6700 AA Wageningen
Tel. : 0317 - 48 60 01
Fax : 0317 - 41 80 94
E-mail : glastuinbouw@wur.nl
Internet : www.glastuinbouw.wur.nl

Inhoudsopgave

	pagina
Voorwoord	1
Samenvatting	3
1 Inleiding	5
2 Proefopzet	7
2.1 Begassingsfaciliteit	7
2.2 Klimaatinstellingen	8
2.3 Plantverzorging	8
2.4 NO _x en etheen behandelingen	9
2.5 Nitraatreductase activiteit	10
3 Resultaten	11
3.1 Concentraties en klimaatomstandigheden	11
3.2 NO _x experiment	11
Plantontwikkeling	11
Nitraatreductase activiteit	13
3.3 Etheen experiment	14
4 Discussie	19
4.1 Gevoeligheid van paprika	19
4.2 Stikstofoxiden	20
4.3 Etheen	21
5 Conclusies	25
6 Referenties	27
Bijlage I. Voedingsoplossing paprika	1 p.
Bijlage II. Verwerking van gegevens	2 pp.
Bijlage III. Gerealiseerde NO _x en etheen concentraties, en klimaatomstandigheden	1 p.

Voorwoord

Op verzoek van de Landelijke Paprika commissie en gefinancierd door het Productschap Tuinbouw (project nr. 13387) is door Wageningen UR Glastuinbouw voorliggend onderzoek uitgevoerd naar de effecten van NO_x en etheen op paprika. Binnen de paprika sector bestond de behoefte meer inzicht te hebben in de gevoeligheid van paprika voor NO_x en etheen en hoe die gevoeligheid zich verhoudt tot de bestaande effectgrenswaarden ter bescherming van planten in het algemeen zoals die eerder in door het ministerie van LNV en PT gefinancierd onderzoek zijn vastgesteld (Dieleman *et al.*, 2007).

Het project is begeleid door paprikatelers Aad van Dijk en Jaap Vink. Hun adviezen met betrekking tot de groei en ontwikkeling van de paprikaplanten, klimaatinstellingen etc. zijn als zeer waardevol ervaren en hebben bijgedragen aan de succesvolle uitvoering van het onderzoek.

C.J. van Dijk, E. Meinen en Th. A. Dueck.
Wageningen UR Glastuinbouw
Januari 2010

Kennisoverdracht:

Effectgrenswaarden voor NO_x en etheen in paprika. Vakblad *Gewasnieuws Paprika*. Jaargang 11, nr. 5 (september 2008).

Effecten van NO_x en etheen op paprika. Vakblad *Onder Glas*, (in druk)

Samenvatting

Toepassing van (gereinigde) rookgassen uit ketels en installaties voor warmtekrachtkoppeling (WKK) is gemeengoed in de Nederlandse Glastuinbouw. Er zijn echter aanwijzingen dat er ook negatieve effecten op groei en product-kwaliteit kunnen optreden vooral bij gebruik van rookgassen uit WKK installaties. De belangrijkste componenten die hierbij een rol spelen zijn, voor zover nu bekend, stikstofoxiden (NO_x) en etheen (C_2H_4). Binnen de paprika sector bestond de behoefte meer inzicht te hebben in de gevoeligheid van paprika voor NO_x en etheen en hoe die gevoeligheid zich verhoudt tot de bestaande effectgrenswaarden voor beide componenten ter bescherming van planten in het algemeen.

Voor dit onderzoek zijn paprikaplanten langdurend blootgesteld aan verschillende NO_x en etheen concentraties en de eventuele effecten op groei, bloem- en vruchtontwikkeling vastgesteld. De begassingsproeven met NO_x en etheen zijn na elkaar uitgevoerd. Er is gekozen voor een reeks behandelingen met verschillende concentraties. Een dergelijke opzet maakt het mogelijk dosis-respons-relaties te bepalen en aansluitend *No Observable Effect Concentrations* (NOEC) te berekenen.

Paprikaplanten blijken relatief ongevoelig te zijn voor NO_x ten opzichte van veel andere plantensoorten. Negatieve effecten zijn pas te verwachten bij chronische blootstelling aan concentraties boven 600 ppb. Bij welke concentratie daadwerkelijk effecten gaan optreden kon in dit onderzoek niet worden vastgesteld. Door het ontbreken van eenduidige verschillen tussen behandelingen (NO_x effecten) was het niet mogelijk NOEC's te berekenen.

Paprikaplanten zijn gevoelig voor etheen. Etheen heeft het grootste effect op de bloem- en vruchtontwikkeling. Bij concentraties hoger dan 40 ppb vindt volledige knopabortie plaats waardoor geen vruchten meer tot ontwikkeling komen. De NOEC waarde voor de totale biomassaproductie is berekend op 9.5 ppb. Met andere woorden, bij chronische blootstellingen van paprikaplanten aan concentraties van 9.5 ppb of hoger gaat de biomassaproductie significant afwijken van de controle als gevolg van totale knopabortie. Significante reductie van het bladoppervlak treedt op bij concentraties van ca. 21 ppb, de NOEC's met betrekking op de bladmassareductie en afname van het aantal bladeren liggen respectievelijk op 48 en 61 ppb.

Dergelijke etheen concentraties zijn niet veel hoger dan concentraties in het buitenlucht, en kunnen voorkomen bij onregelmatigheden bij de verbranding van aardgas in de ketel of WKK. Daarom zal de trend om met hogere CO_2 concentraties te doseren, de luchtkwaliteit in de kassen niet ten goede komen. Om deze redenen en omdat het niveau van zowel etheen als NO_x in de kas niet direct gerelateerd is aan die van CO_2 , wordt het aangeraden om de kaslucht te meten om de kwaliteit ervan te bewaken.

Samenvatting conclusies:

1. Er zijn geen negatieve NO_x effecten bij paprika te verwachten bij langdurende blootstelling aan concentraties tot ca. 600 ppb;
2. Met de NO_x effectgrenswaarde ter bescherming van plantensoorten in het algemeen wordt het risico voor paprika overschat;
3. Paprika is gevoelig voor etheen, bij blootstelling aan concentraties vanaf 10 ppb zijn negatieve effecten op de groei en vruchtontwikkeling te verwachten;
4. Er is geen reden om de etheen effectgrenswaarde ter bescherming van plantensoorten in het algemeen specifiek voor paprika aan te passen;
5. Gezien het geringe verschil tussen etheen concentraties in de buitenlucht en de effectgrenswaarde is het aan te bevelen de etheenconcentratie op plantniveau te bewaken. Dit is het beste te doen met een gevoelige etheen monitor (tot <4 ppb) waarvan de signaal direct gekoppeld wordt aan de klimaatcomputer.

1 Inleiding

CO₂ dosering in kassen is al meer dan 25 jaar gemeengoed in de glastuinbouw. Gangbare praktijk in de Nederlandse Glastuinbouw is dat CO₂ wordt gedoseerd d.m.v. (gereinigde) rookgassen van ketels en installaties voor warmtekrachtkoppeling (WKK). De positieve effecten van het doseren van CO₂ met behulp van rookgassen zijn algemeen bekend: hogere productie en/of betere kwaliteit. Er zijn echter aanwijzingen dat er ook negatieve effecten op groei en productkwaliteit kunnen optreden. Deze worden vooral toegeschreven aan de effecten van rookgassen uit WKK installaties. De belangrijkste componenten die hierbij een rol spelen zijn, voor zover nu bekend, stikstofoxiden (NO_x) en etheen (C₂H₄). Het is echter niet uitgesloten dat er nog andere componenten een rol spelen waarvan het risico voor het gewas nog onvoldoende onderkend is.

Planten kunnen NO_x via de huidmondjes opnemen vanuit de lucht. Omgevingscondities die van invloed zijn op de openingstoestand van de huidmondjes zijn dan ook bepalend voor de reactie van planten. Er zijn ook indicaties dat de opname van NO_x ook via de cuticula plaats kan vinden (Wellburn, 1990). Uit de door de plant opgenomen NO_x ontstaan nitraat en nitriet die vervolgens enzymatisch worden omgezet in aminozuren en proteïnen. De gevoeligheid van een plant wordt bepaald door de effectiviteit van deze omzettingen (detoxificatie). Als NO of NO₂ onvoldoende snel worden omgezet kan dat leiden tot schade aan de plant.

Met betrekking tot effecten van NO_x kan onderscheid worden gemaakt tussen acute, vaak zichtbare bladbeschadiging, als gevolg van een korte blootstelling aan hoge concentraties en chronische schade na een langdurende blootstelling aan relatief lage concentraties. De omvang van chronische schade is meestal onbekend omdat deze vaak niet direct zichtbaar is. Op langere termijn kan het echter leiden tot productieverlies en mindere kwaliteit.

Etheen kan beschouwd worden als een voor planten 'ongewone' luchtverontreinigingscomponent aangezien het een planteigen groeiregulator is. Etheen wordt door planten ook in versterkte mate gevormd onder invloed van een groot scala van stressfactoren inclusief blootstellingen aan etheen zelf. Etheen wordt continu in zeer kleine hoeveelheden gevormd door alle plantorganen en weefsels en heeft voornamelijk invloed op de eindfase van de plantontwikkeling zoals het afrijpen van fruit, veroudering en bladval. Daarnaast kan weefselbeschadiging aanleiding geven tot een versnelde productie van etheen (stress etheen) door planten.

Van etheen zijn in de literatuur een groot aantal negatieve effecten beschreven voor verschillende plantensoorten na zowel kort- als langdurende blootstellingen aan verschillende concentraties. De reacties van planten op blootstellingen aan etheen blijken zeer divers te zijn. Effecten kunnen hierbij variëren van het afsterven van plantendelen tot zeer subtiele veranderingen op fysiologisch en biochemisch niveau en betreffen onder meer veranderingen van de fotosynthese, epinastie (schuin neerwaarts buigen van de bladsteel, omkeerbaar), afwijkingen en reductie van de groei, bloemafwijkingen, veroudering en abortie van blad, bloemen of vruchten.

Uit de tuinbouw zijn vele incidenten bekend waarbij het plotseling afvallen van bloemknoppen en/of vruchten en groei-afwijkingen bij paprika vaak is toegeschreven aan een kortdurende blootstelling aan een relatief hoge concentratie etheen. Van dergelijke schadegevallen is echter niet bekend wat de concentratie en blootstellingsduur is geweest. Kwantitatieve (experimentele) gegevens over effecten van etheen op paprika zijn slechts beperkt beschikbaar.

In het licht van bovenstaande problematiek is in 2007 alle relevante informatie over effecten van NO_x en etheen op planten geëvalueerd (Dieleman *et al.*, 2007). Zij stelden effectgrenswaarden voor die afgeleid zijn uit gegevens van begassingsexperimenten onder laboratoriumcondities aan veel verschillende plantensoorten. Specifieke informatie over negatieve effecten van NO_x en etheen op paprika is echter zeer beperkt voorhanden. Binnen de paprika sector bestaat de behoefte meer inzicht te hebben in de gevoeligheid van paprika voor NO_x en etheen en hoe die gevoeligheid zich verhoudt tot de bestaande effectgrenswaarden ter bescherming van planten in het algemeen. Op grond van die informatie kunnen eisen worden geformuleerd waaraan de luchtkwaliteit in kassen waar paprika's worden

geteeld minimaal moet voldoen. Telers kunnen dan de risico's van NO_x en etheen beter inschatten en eventuele schade aan het gewas voorkomen.

Doel van het onderzoek dat in dit rapport wordt gepresenteerd is het vaststellen van de gevoeligheid van paprika voor NO_x en etheen. Specifiek voor het gewas paprika worden *No Observable Effect Concentrations* (NOEC) voor NO_x en etheen bepaald. Hiervoor worden paprikaplanten langdurend blootgesteld aan verschillende NO_x of etheen concentraties en de eventuele effecten op groei, bloem- en vruchtontwikkeling vastgesteld. De begassingsproeven met NO_x en etheen worden na elkaar uitgevoerd. Op grond van de resultaten wordt aangegeven hoe de NOEC's voor paprika zich verhouden tot de bestaande effectgrenswaarden voor planten in het algemeen en of bijstelling specifiek voor paprika noodzakelijk is.

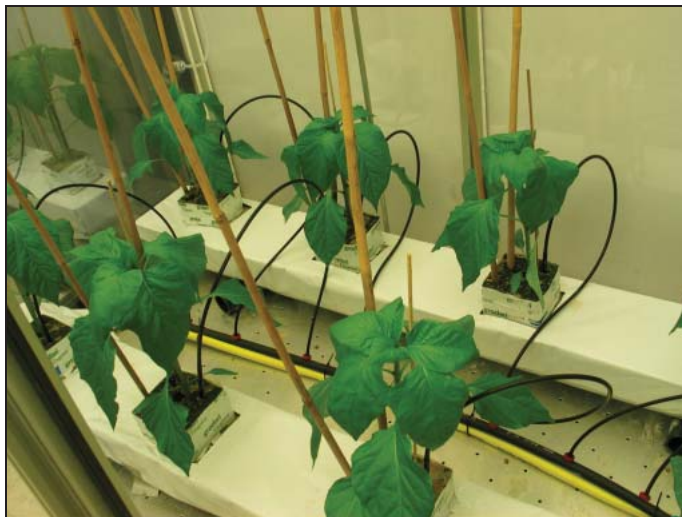
2.2 Klimaatinstellingen

Tijdens het experiment werd een daglengte aangehouden van 12 uur (5.00-17.00 uur). De lichtintensiteit op planthoogte werd ingesteld op ca. $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Philips TL 54 W, kleur 840). Aan het begin van de lichtperiode werd de lichtintensiteit gedurende 30 minuten geleidelijk opgebouwd en aan het einde van de lichtperiode ook gedurende 30 minuten weer geleidelijk afgebouwd. Vijftien minuten voor en na de lichtperiode werd additioneel verroodlicht toegediend door middel van gloeilampen (Philips, Superlux Agro 150 W, negen stuks).

Bij aanvang van het NO_x experiment werd de temperatuur in de begassingskasjes gedurende de lichtperiode ingesteld op 23°C en gedurende de donkerperiode op 21°C . Opbouw en afbouw van de temperatuur vond geleidelijk plaats; twee uur na begin van de lichtperiode werd 23°C bereikt en twee uur na het begin van de donkerperiode was de temperatuur weer gedaald tot 21°C . De relatieve luchtvochtigheid in de kasjes werd ingesteld op circa 70%. Op grond van de plantontwikkeling is na vier weken de temperatuur in de kasjes verhoogd naar 25°C gedurende de lichtperiode en 23°C gedurende de donkerperiode. Bij het experiment met etheen zijn deze condities direct vanaf de start van het experiment ingesteld en niet aangepast tijdens het experiment.

2.3 Plantverzorging

Voor beide experimenten werden jonge paprikaplanten van het ras 'Derby' geleverd door plantenkwekerij 'Van der Lugt' uit Bleiswijk. 'Derby' is een gangbaar ras en daarmee redelijk representatief voor de paprika sector. Per behandeling (kasje) werden acht planten ingezet. Op het moment van inzetten was de eerste bloemknop net zichtbaar. Planten waren gemiddeld 22 cm hoog, hadden negen bladeren onder de spliting, en acht onvolgroeide blaadjes boven de splitsing. De op steenwolklokjes opgekweekte planten werden op steenwolmatten in plastic goten (libra) met drain geplaatst en door middel van een automatisch doseersysteem naar behoefte voorzien van standaard voedingsoplossing (Bijlage I).



Paprikaplanten 'Derby' op het moment van inzetten.

Twee weken na de start van het experiment werden de planten gesnoeid waarbij twee stengels per plant werden aangehouden. Planten werden vervolgens wekelijks gesnoeid op twee stengels, waarbij per stengel steeds één knop en één blad werd aangehouden. Dieven werden verwijderd en de planten werden opgebonden aan stokken. De hartvrucht van elke plant werd verwijderd.

Tijdens de begassing werden de planten dagelijks gecontroleerd op zichtbare symptomen (chlorose, bladbeschadiging, blad/bloem of vrucht abortie, etc.). Na afloop van elke begassingsperiode werden de belangrijkste

groeiparameters bepaald (biomassa, bladoppervlak, aantal vruchten etc.). Gedurende de begassing met etheen werd ook dagelijks gecontroleerd op epinastie. Epinastie is een specifiek en relatief snel optredend, reversibel, effect van etheen van het schuin naar beneden gaan staan van bladeren.

2.4 NO_x en etheen behandelingen

NO_x bestaat uit een mengsel van stikstofoxide (NO) en stikstofdioxide (NO₂). Rookgassen van WKK's bestaan hoofdzakelijk uit NO. De verhouding tussen NO en NO₂ is voor dit experiment bepaald op basis van eerdere metingen op verschillende bedrijven met een WKK installatie (Dueck *et al*, 2008). Op grond van de metingen is gekozen voor een vaste verhouding tussen NO en NO₂ van 80:20. De paprikaplanten werden continu blootgesteld aan zes verschillende NO_x concentraties. De behandelingen van 0 (controle), 68, 119, 204, 357 en 612 ppb werden random toegewezen aan de verschillende kasjes.



Opstelling begassingskasjes.

In het etheen (C₂H₄) experiment werden paprikaplanten continu blootgesteld aan zes verschillende concentraties, inclusief een controle behandeling. De behandelingen van 0 (controle), 15, 40, 70, 120 en 200 ppb etheen werden random toegewezen aan de verschillende kasjes.

Er is gekozen voor een concentratiereeks omdat een dergelijke opzet het mogelijk maakt dosis-respons-relaties vast te stellen en daaruit NOECs te berekenen (zie ook 2.5). De concentratieniveaus zijn op basis van *expert judgement* gekozen met als uitgangspunt dat in de controle behandeling geen effecten waarneembaar mogen zijn en in de behandeling met de hoogste concentratie juist duidelijke effecten waarneembaar moeten zijn. De tussenliggende concentratieniveaus zijn volgens een vaste verhouding vastgesteld.

2.5 Nitraatreductase activiteit

Gedurende het begassingsexperiment met NO_x werd wekelijks de activiteit van het enzym nitraatreductase (NR) bepaald. De enzymactiviteit is bepalend voor de mate waarin opgenomen NO_x kan worden omgezet in planteigen aminozuren (detoxificatie). De actuele en de potentiële NR activiteit werd bepaald. De potentiële NR activiteit geeft informatie over de aanwezigheid van NR en het maximale vermogen van de plant om nitraat in nitriet om te zetten. De omstandigheden bij de bepaling zijn zodanig dat de hoeveelheid nitraat niet beperkend is. Bij de bepaling van de actuele NR activiteit wordt de hoeveelheid nitraat bepaald die daadwerkelijk in het blad wordt omgezet in nitriet. Bladmonsters voor de NR bepaling werden wekelijks op een vast tijdstip genomen, namelijk vier uur na aanvang van de lichtperiode (9:00 uur). Per behandeling werd uit de kop van elke plant circa 5 tot 10 gram blad geplukt net voordat er gedieft moest worden. Op deze manier bleef de structuur van de plant intact. De bladmonsters werden gekoeld en direct verwerkt. Het blad werd fijngeknipt en in bufferoplossing gebracht. De actuele en potentiële (door toevoegen van nitraat) NR activiteit werd gemeten door een kleurreactie waarbij nitriet in de oplossing spectrofotometrisch werd gemeten bij 540 nm. Additioneel werd op vier momenten tijdens de begassingsperiode de actuele en potentiële NR activiteit bepaald in oudere bladeren van onder de splitsing. De analyses zijn uitgevoerd door het Centraal Laboratorium van Wageningen UR.

3 Resultaten

3.1 Concentraties en klimaatomstandigheden

De gerealiseerde NO_x en etheen concentraties, gemiddelde etmaaltemperatuur en relatieve luchtvochtigheid tijdens de experimenten is weergegeven in Bijlage III. In de controle behandeling was de gemiddelde NO_x concentratie circa 15 ppb en voor etheen was dat circa 4 ppb. Deze concentraties komen overeen met de gebruikelijke achtergrondwaarden zoals die in de buitenlucht voorkomen. De gerealiseerde concentraties kwamen redelijk overeen met de gewenste concentraties.

3.2 NO_x experiment

Plantontwikkeling

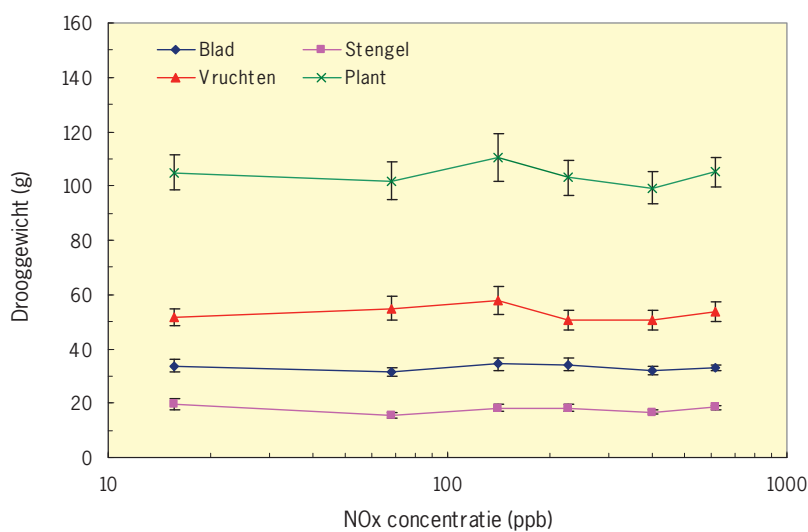
Paprikaplanten zijn gedurende 12 weken continu blootgesteld aan verschillende NO_x concentraties variërend van 15 ppb (achtergrondconcentratie) tot circa 600 ppb. De planten ontwikkelden zich goed maar na enkele weken bleek dat bij de ingestelde lichtintensiteit en temperatuurregime de planten in alle behandelingen zich meer generatief ontwikkelden dan gewenst. De planten waren vrij compact en het blad donker van kleur. De vruchtzetting verliep goed maar aan alle planten zaten teveel vruchten en open bloemen in vergelijking met een praktijkgewas. Op advies van de tuinders uit de begeleidingscommissie is toen besloten om het dag/nacht temperatuurregime te verhogen naar 25/23 °C om meer vegetatieve groei te krijgen. Veertien dagen na aanpassing van het temperatuurregime is er vruchtdunning uitgevoerd. Per stengel werden twee gezette vruchten met een lengtedoorsnede van ca. 5 cm aangehouden, de overige vruchten en gezette bloemen zijn verwijderd.

Tijdens de begassingsperiode zijn de planten dagelijks beoordeeld op eventuele zichtbare symptomen als gevolg van de blootstelling aan NO_x . Drie weken na de start van de begassing leken de planten in de behandeling met de hoogste NO_x concentratie wat achter te blijven in ontwikkeling. Zonder te weten om welke behandeling het ging werden deze planten een week later ook door de tuinders uit de begeleidingscommissie aangewezen als minst goed ontwikkelde planten. De planten hadden volgens de tuinders 'kreukelig', minder glad blad ten opzichte van de overige behandelingen en de controle. Dit effect verdween tijdens de verdere looptijd van het experiment en verschillen tussen behandelingen waren nauwelijks meer te zien. Na acht weken was bij de hoogste NO_x concentratie sprake van wat meer strekking in de kop van de plant. Dit is alleen visueel vastgesteld.

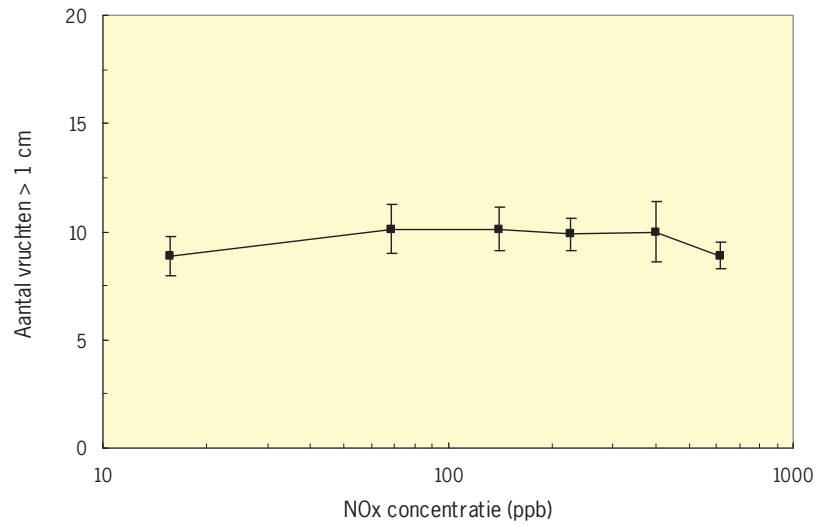


Paprikagewas na 12 weken begassing met ca. 600 ppb NO_x.

Na 12 weken werd de begassing beëindigd en de biomassa productie van de planten bepaald (Figuur 2). Er zijn met betrekking tot de biomassa van blad, stengel, vruchten en de totale bovengrondse productie geen verschillen tussen behandelingen geconstateerd. Het gemiddelde aantal vruchten per behandeling varieerde van 8 tot ca. 10 stuks. Eenduidige verschillen in aantallen vruchten in de NO_x behandelingen ten opzichte van de controle behandeling zijn niet gevonden (Figuur 3). Ook met betrekking tot de lengte van de planten, het aantal internodiën, bladoppervlakte en bladdikte zijn geen verschillen tussen behandelingen geconstateerd (data niet gepresenteerd).



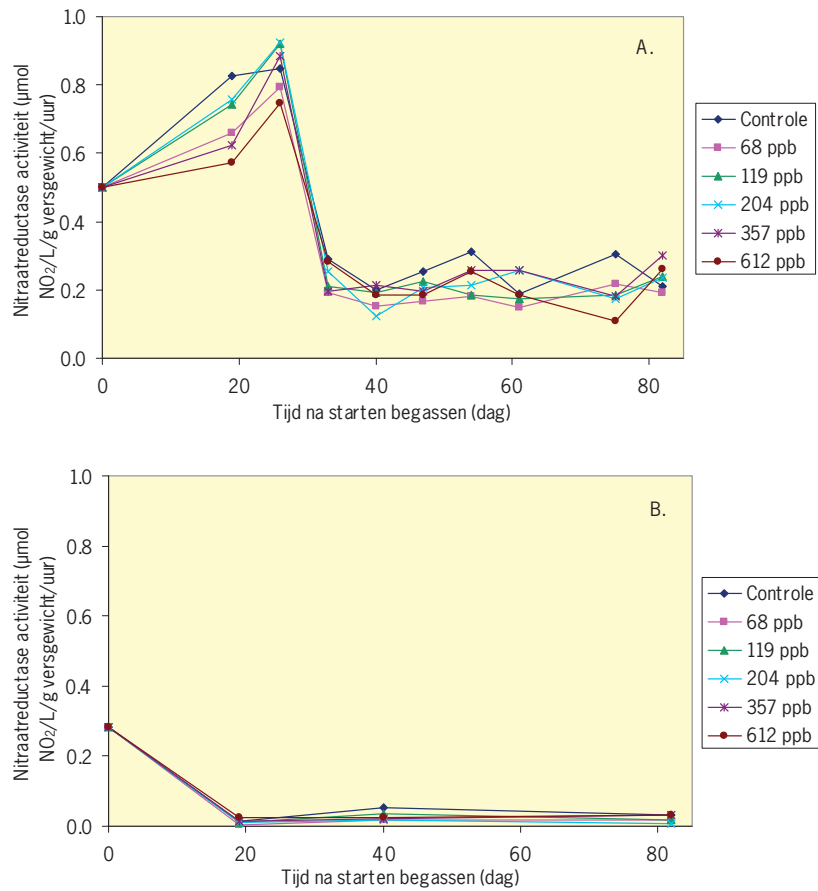
Figuur 2. Gemiddelde biomassa productie (g) van (delen van) paprikaplanten na 12 weken blootstelling aan verschillende NO_x concentraties (NB. x-as op log-schaal).



Figuur 3. Gemiddeld aantal vruchten (>1 cm) na 12 weken blootstelling aan verschillende NO_x concentraties. (NB. x-as op log-schaal).

Nitratoreductase activiteit

De actuele nitratoreductase activiteit is in jong blad (Figuur 4, A) aanzienlijk hoger dan in oud blad (Figuur 4, B).



Figuur 4. Actuele nitratoreductase activiteit in jong (A) en oud (B) paprikabladd na begassing met verschillende concentraties NO_x.

Twintig dagen na starten van begassing was de nitraatreductase activiteit in jong blad planten in de controle behandeling hoger vergeleken met de twee behandelingen met de hoogste NO_x concentraties. De weken daarna waren de verschillen in nitraatreductase activiteit echter weer kleiner waarbij in de NO_x behandelingen zowel hogere als lagere nitraatreductase activiteit werd gevonden ten opzichte van de planten in de controle behandeling. Er is geen verband gevonden tussen de NO_x concentratie en de nitraatreductase in jong blad of oud blad van paprika. Wat opvalt is dat na vier weken de actuele nitraatreductase activiteit in jonge bladeren sterk daalt en gedurende de rest van de teelt op dat niveau blijft. Een mogelijke oorzaak zou de wijziging van het temperatuurregime kunnen zijn, de temperatuur is toen met 2°C verhoogd. De potentiële nitraatreductase activiteit vertoonde hetzelfde patroon als de actuele nitraatreductase activiteit waarbij eveneens geen verschillen tussen behandelingen zijn gevonden.

3.3 Etheen experiment

Circa twee dagen na begin van het experiment trad er een verandering op in de bladstand van de aan etheen blootgestelde planten. De bladranden kromden naar beneden waardoor enigszins bolstaande bladeren te zien waren, niet te verwarren met epinastie. De mate van kromming van de bladranden was min of meer gelijk in alle etheen behandelingen. Ongeveer een week na de start van de begassing begonnen nieuwe okselscheuten uit te lopen bij alle aan etheen blootgestelde planten (data niet beschikbaar omdat deze werden in de loop van het experiment werden gedieft). Na twee weken waren in de controle en de behandeling met de laagste etheen concentratie (15 ppb) de eerste open bloemen zichtbaar. De planten in de overige etheenbehandelingen (40 ppb en hoger) vormden wel knoppen maar deze kwamen niet tot bloei. De knoppen werden vanaf de basis geel en vielen vervolgens af (knopabortie) met als gevolg dat aan deze paprikaplanten geen vruchten tot ontwikkeling kwamen.



Begin van knopabortie na twee weken 40 ppb etheen.

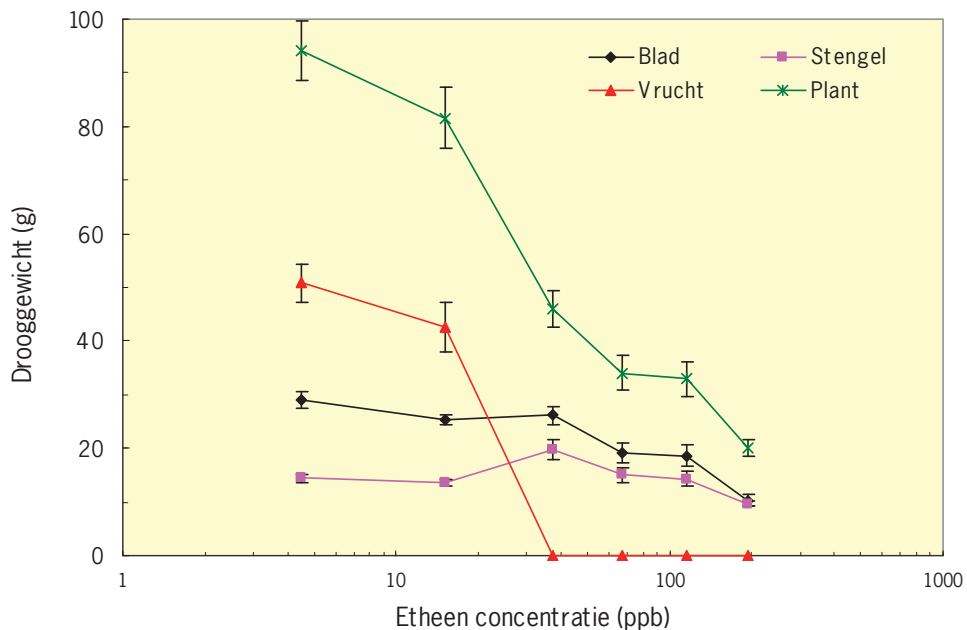


Paprikaplanten twee weken na start van de etheen begassing (17 juni). Links onbehandelde planten, rechts met etheen (15 ppb). Bij de met etheen behandelde planten is de kromming van de bladranden duidelijk te zien.

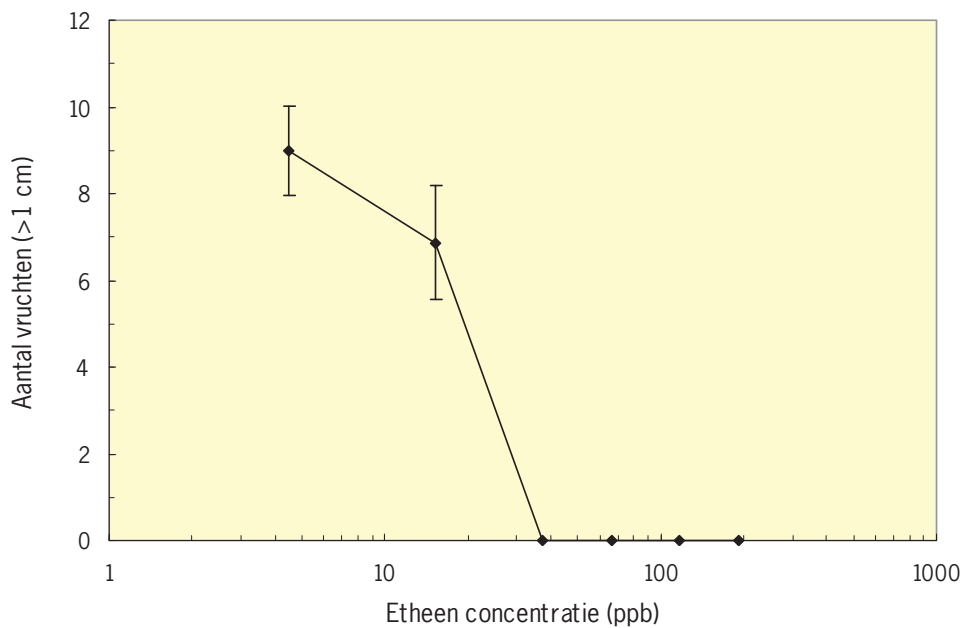
Na 10 weken werd de begassing beëindigd en werd de biomassa productie van de planten bepaald (Figuur 5). De bladbiomassa nam af bij toenemende etheenconcentraties. In lichte mate werd dit ook geconstateerd bij de stengelbiomassa. Aangezien bij de hogere etheen concentraties geen vruchten tot ontwikkeling kwamen (Figuur 6) kwam de totale biomassa productie voor deze behandelingen aanzienlijk lager uit ten opzichte van de controle. De reductie in biomassa was bij de laagste etheenconcentratie (15 ppb) circa 12% ten opzichte van de controle en circa 65% bij de hoogste etheenconcentratie (200 ppb). Het bladoppervlak was duidelijk kleiner bij aan etheen blootgestelde planten, waarschijnlijk door het minder strekken van het blad (Figuur 7). Het aantal internodiën (Figuur 8) en aantal bladeren (bladafsplittingsnelheid) nam echter toe bij hogere etheen concentraties.



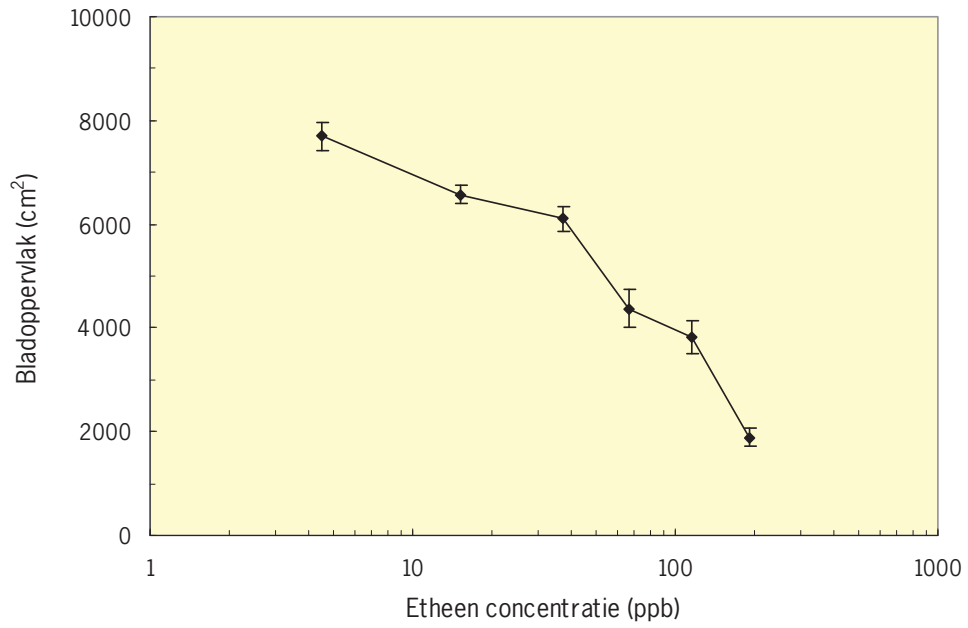
Paprikaplanten 10 weken na start van de etheen begassing (11 augustus). Links onbehandelde planten, rechts met etheen (200 ppb). Bij de met etheen behandelde planten is afwijkende groei duidelijk te zien.



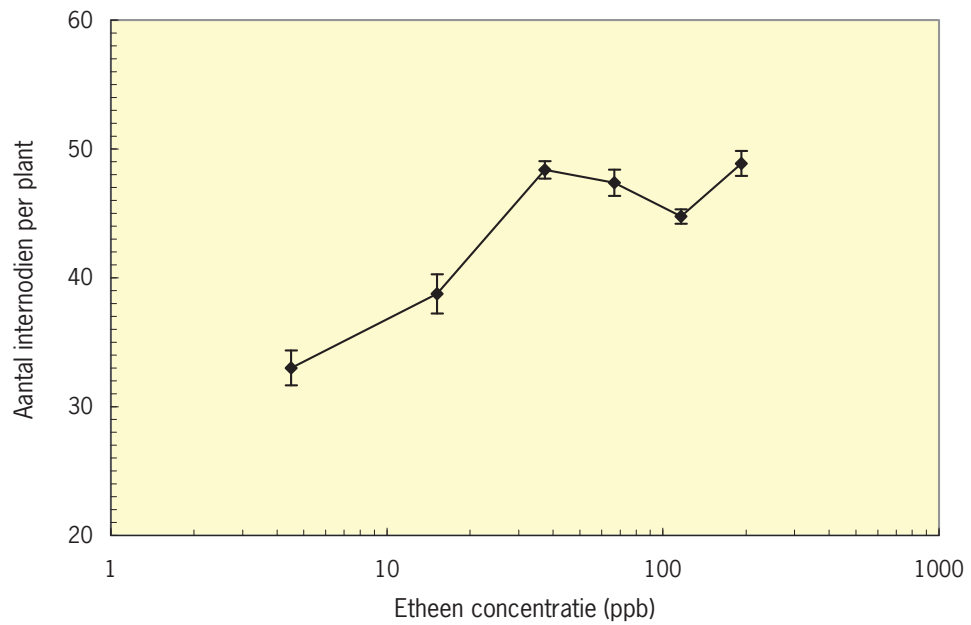
Figuur 5. Gemiddelde biomassa productie (g) van (delen van) paprikaplanten na 12 weken blootstelling aan verschillende etheen concentraties (NB. x-as op log-schaal).



Figuur 6. Gemiddeld aantal vruchten (>1 cm) per plant na 12 weken blootstelling aan verschillende etheen concentraties (NB. x-as op log-schaal).



Figuur 7. Gemiddeld bladoppervlak (cm²) per plant na 12 weken blootstelling aan verschillende etheen concentraties (NB. x-as op log-schaal).



Figuur 8. Gemiddeld aantal internodiën per plant na 12 weken blootstelling aan verschillende etheen concentraties (NB. x-as op log-schaal).

4 Discussie

4.1 Gevoeligheid van paprika

In de studie van Dieleman *et al.* (2007) zijn ter bescherming van planten in het algemeen op basis van de meest recente informatie effectgrenswaarden voor NO_x en etheen afgeleid (Tabel 1). Hierbij werd onderscheid gemaakt tussen lange- en korte-termijn blootstellingen.

Tabel 1. *Effectgrenswaarden (ppb) ter voorkoming van negatieve effecten op planten als gevolg van blootstelling aan NO_x en etheen (Dieleman et al., 2007).*

Gas	Concentratie (ppb)	Tijdsduur
Stikstofoxiden (NO _x)	40	24-uur
	16	Jaar
Etheen (C ₂ H ₄)	11	8 uur
	5	4 weken

Een effectgrenswaarde is de concentratie van een gas waarbij een risico voor het gewas bestaat. Een verhoogd risico wil niet zeggen dat er per definitie negatieve effecten aan het gewas zullen optreden. Dit hangt namelijk niet alleen af van het concentratieniveau maar ook van factoren zoals de gevoeligheid van de plantensoort voor de betreffende component, de klimaatsomstandigheden in de kas en eventuele andere stressoren (andere luchtverontreinigingscomponenten, ziekten en plagen).

Tabel 2. *Overzicht van effecten van NO en etheen op paprika met bijbehorende blootstellingsgegevens (Uit: Anon., 2001 en Beaudry & Kays, 1988).*

Component	Effect-parameter	Concentratie (ppb)	Expositie-duur (uren)	Effect
Stikstofmonoxide (NO)	Nitrietreductase	1524	18	remming
Etheen (C ₂ H ₄)	Abortie bloemknoppen	10	120	54%
		100	120	81%
		1000	120	100%
	Abortie vruchten (<10mm)	10	120	90%
		100	120	90%
		1000	120	100%
	Abortie bladeren	10	120	geen
		100	120	geen
		1000	120	22%

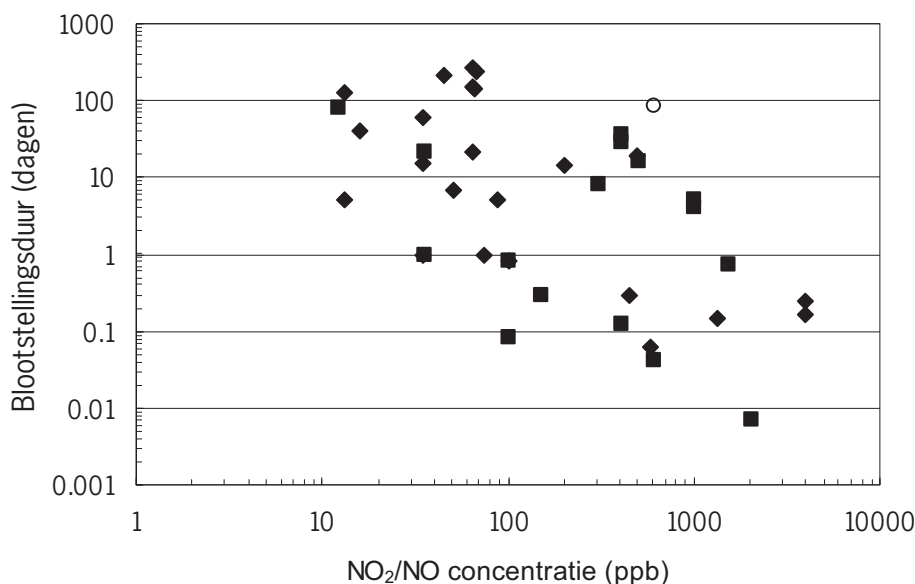
De experimentele gegevens waarop de effectgrenswaarden zijn gebaseerd hebben betrekking op verschillende plantensoorten. In de onderliggende onderzoeken zijn algemene fysiologische en biochemische effecten geconstateerd zoals reductie van groei en opbrengst, remming van de fotosynthese, remming enzymatische

processen, verwelking, chlorose en afwijkende groei. Voor het feitelijk vaststellen van effectgrenswaarden is gebruik gemaakt van de zogenaamde envelopbenadering. Alle effectieve blootstellingen uit de verschillende onderzoeken zijn grafisch weergegeven waarna de effectgrenslijn is getrokken net onder de laagste effectieve blootstellingen. De effectgrenslijn kan worden beschouwd als een verzameling van blootstellingen, gedefinieerd naar concentratie en tijd, waarboven planten wel en waaronder planten geen risico lopen beschadigd te worden. Deze benadering is de tot nu toe meest gebruikte methode bij de afleiding van effectgrenswaarden voor de effecten van luchtverontreinigingscomponenten op planten (McCune, 1969; Jacobson, 1977; Posthumus *et al.*, 1989; Tonneijck, 1989; Van der Eerden & Van Dijk, 1993). De effectgrenswaarden worden bepaald door de gevoeligste plantensoorten en zijn bedoeld voor bescherming van planten in het algemeen.

De algemene grenswaarden bieden ook voldoende bescherming voor de paprikateelt als het gaat om blootstelling aan NO_x en/of etheen. Echter specifieke gegevens over effecten van NO_x en etheen op paprika zijn maar zeer beperkt voorhanden en beperken zich tot twee onderzoeken (Anon., 2001 en Beaudry & Kays, 1988) waarin een remming van de enzymatische reactie na blootstelling aan NO werd geconstateerd en het afvallen van bloemen en vruchten na blootstelling aan verschillende concentraties etheen (Tabel 2).

4.2 Stikstofoxiden

Bij de evaluatie van effectgrenswaarden werd door (Dieleman *et al.*, 2007) voorgesteld de effectgrenswaarde voor NO_x met ongeveer een factor 10 te verlagen tot 40 ppb als 24-uursgemiddelde. Recentere metingen van NO_x en etheen concentraties op plantniveau in verschillende kassen en verschillende gewassen hebben aangetoond dat CO_2 dosering via rookgassen uit WKK-installaties een risico vormt voor het gewas (Dueck *et al.*, 2008). Met name de NO_x concentraties kunnen dermate hoog oplopen dat de effectgrenswaarde van 40 ppb wordt overschreden met mogelijk nadelige gevolgen voor het gewas.



Figuur 9. Effectieve blootstellingsniveaus van NO_2 (◆) en NO (■) op biochemische processen, fysiologie of groei van verschillende plantensoorten (Anon., 2001). Het open symbool geeft het niet effectieve blootstellingsniveau weer voor paprika van 614 ppb NO_x gedurende 84 dagen (dit rapport). NB. verticale en horizontale as zijn op log-schaal.

De resultaten van dit onderzoek tonen aan dat chronische blootstelling van paprikaplanten aan NO_x concentraties tot ca. 600 ppb niet leidt tot negatieve effecten op de biomassa productie en de bloem- en vruchtontwikkeling. Het enzym nitraatreductase speelt een rol in het beschermingsmechanisme van de plant voor NO_x en is bepalend voor de mate waarin opgenomen NO_x kan worden omgezet in planteigen aminozuren. De verwachting was dat een lage blootstelling aan NO_x zou leiden tot een hogere enzymactiviteit (zie Tabel 6.1 uit Dieleman *et al.*, 2007), terwijl bij hogere NO_x concentraties de activiteit beperkend zou worden met als gevolg negatieve effecten op de plantontwikkeling. Deze veronderstelling kon niet worden aangetoond, er zijn geen verschillen in enzymactiviteit geconstateerd tussen behandelingen. Overigens is de orde grootte van de NR activiteit in paprikaplanten vergelijkbaar met die van verschillende genotypen van sla opgekweekt in klimaatkamers (Blom & Eenink, 1986). Door het ontbreken van eenduidige verschillen tussen behandelingen (NO_x effecten) was het niet mogelijk NOEC's te berekenen.

Uit het onderzoek blijkt dat paprikaplanten relatief ongevoelig zijn voor NO_x ten opzichte van veel andere plantensoorten (Figuur 9). Negatieve effecten bij paprika zijn pas te verwachten bij chronische blootstelling aan concentraties boven 600 ppb. Bij welke concentratie daadwerkelijk effecten gaan optreden kon in dit onderzoek niet worden vastgesteld. Eerdere concentratiemetingen op vijf tuinbouwbedrijven met verschillende WKK-reiniger combinaties lieten zien dat de NO_x concentratie in een kas kan oplopen tot ca. 300 ppb gedurende enkele uren als gevolg van CO_2 doseren met rookgassen (Dueck *et al.*, 2008). Uit de vergelijking van deze concentratiemetingen op plantniveau met de resultaten van dit onderzoek mag geconcludeerd worden dat het risico voor paprika van NO_x in rookgassen die gebruikt worden voor CO_2 dosering verwaarloosbaar is.

Het onderzoek zoals in dit rapport gepresenteerd toont aan dat paprika relatief ongevoelig is voor NO_x . Blootstelling aan NO_x concentraties tot ca. 600 ppb gedurende 12 weken leidde niet tot negatieve effecten op groei en opbrengst. Ook werd geen negatief effect op de enzymactiviteit waargenomen wat in lijn is met de resultaten uit het onderzoek van Anon. (2001) waarbij remming van de enzymactiviteit pas werd geconstateerd bij een NO concentratie van ca. 1500 ppb. Met de algemene effectgrenswaarde van 40 ppb als 24-uursgemiddelde wordt het risico van NO_x voor paprika overschat. Met andere woorden, hogere concentraties zijn toelaatbaar. Eventuele risico's voor het gewas treden pas op bij langdurende blootstelling aan concentraties hoger dan 600 ppb.

4.3 Etheen

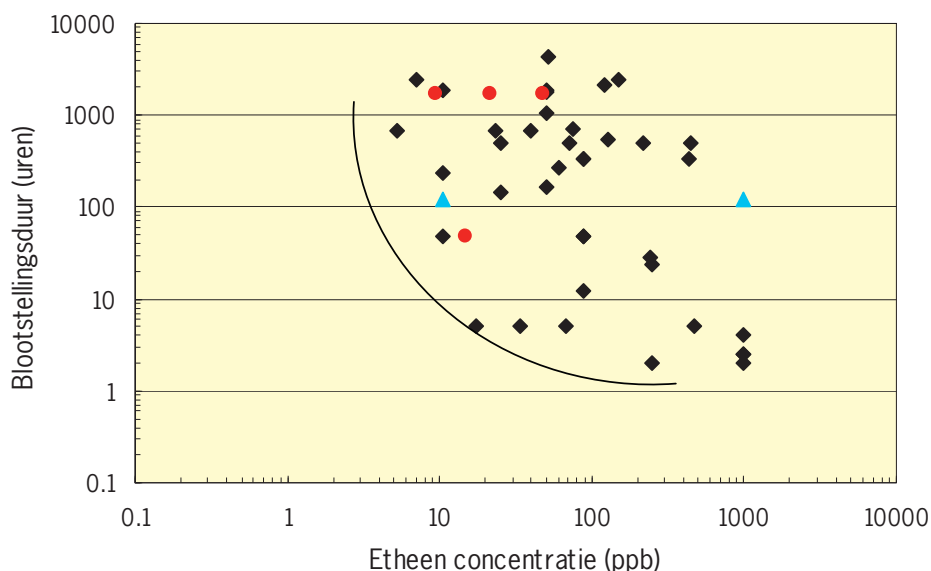
In hun evaluatie van effectgrenswaarden stelden Dieleman *et al.* (2007) vast dat de effectgrenswaarde voor etheen nagenoeg gelijk aan de oude effectgrenswaarde kan blijven, namelijk 11 ppb als 8-uursgemiddelde. De resultaten van dit onderzoek tonen aan dat blootstelling van paprikaplanten aan een etheenconcentratie van 15 ppb al na twee dagen tot zichtbare afwijkingen aan de bladstand kunnen leiden. Dit effect lijkt omkeerbaar, na verloop van tijd werd het effect weer minder. Bij langere blootstelling werden ook onomkeerbare effecten geconstateerd op de bloem- en vruchtontwikkeling en de biomassa productie. Op grond van verschillen tussen behandelingen zijn dosisrespons relaties berekend waaruit NOEC's zijn afgeleid (voor methodiek, zie Bijlage II), gedefinieerd als de concentratie waarbij het behandelingseffect significant afwijkt van de controle (Tabel 3). Voor sommige effectparameters bleek het niet mogelijk een NOEC waarde te berekenen maar kon wel een EC_{10} worden bepaald. EC_{10} is de concentratie waarbij het effect 10% afwijkt van de controle maar geeft geen uitsluitel of het om een significant effect gaat.

Etheen heeft het grootste effect op de bloem- en vruchtontwikkeling van paprika. Bij concentraties hoger dan 40 ppb vindt volledige knopabortie plaats waardoor geen vruchten meer tot ontwikkeling komen. De NOEC waarde voor de totale biomassaproduktie is berekend op 9.5 ppb (Tabel 3). Met andere woorden, bij blootstellingen van paprikaplanten aan concentraties van 9.5 ppb of hoger gaat de biomassaproduktie significant afwijken van de controle als gevolg van knopabortie waardoor geen vruchtontwikkeling meer plaatsvindt. Etheen heeft een sterker negatief effect op het bladoppervlak dan op de biomassa of het aantal bladeren. Significante reductie van het bladoppervlak treedt op bij concentraties van ca. 21 ppb, de NOEC's met betrekking op de biomassa-reductie en afname van het aantal bladeren liggen respectievelijk op 48 en 61 ppb. De indicatieve grens waarbij door knopabortie ca. 10% minder vruchten tot ontwikkeling komen ten opzichte van de controle behandeling ligt rond de 7.5 ppb (EC_{10}).

Tabel 3. NOECs and EC₁₀ (ppb) voor verschillende effecten van etheen op paprikaplanten. Voor NOEC waarden is tevens het 95% betrouwbaarheidsinterval gegeven.

	NOEC (ppb)	EC ₁₀ (ppb)
Biomassa blad	48.2	-
Biomassa stengel	192.2*	-
Biomassa vruchten	-	10.1
Totale Biomassa	9.5	-
Bladoppervlak	21.5	-
Aantal vruchten	-	7.5
Aantal bladeren	-	61.6
Planthoogte	-	148.4

* geen significant effect waargenomen, als worst case benadering is de hoogste blootstellingsconcentratie weergegeven.



Figuur 10. Effectieve blootstellingsniveaus van etheen met de effectgrenslijn voor het 100% beschermingsniveau. Ruitvormige symbolen (zwart): diverse plantensoorten (Tonneijck & Van Dijk, 2000). Driehoekige symbolen (blauw): knop en vruchtabortie bij paprika (Beaudry & Kays, 1988). Ronde symbolen (rood): effecten op paprika (dit onderzoek).

Etheen concentraties van ca. 15 ppb gedurende enkele dagen kunnen al leiden tot negatieve effecten op de bladontwikkeling bij paprika. De biomassaproductie nam sterk af bij hogere etheen blootstellingen als gevolg van het afvallen van bloemknoppen waardoor geen of minder vruchten tot ontwikkeling kwamen. Op basis van de dosisrespons relaties is voor de biomassaproductie een effectgrenswaarde (NOEC) afgeleid van ca. 10 ppb voor een langdurende blootstelling. Dat is in lijn met het onderzoek van Beaudry & Kays (1988) waarbij abortie van knoppen en vruchten werd waargenomen na blootstelling aan 10 ppb etheen gedurende vijf dagen. Het gaat hierbij wel om een *worst case* situatie omdat in de praktijk blootstelling van planten aan rookgassen als gevolg van CO₂ dosering over het algemeen een discontinu karakter heeft. Het is aannemelijk dat planten minder sterk reageren op

een dergelijke discontinue blootstelling dan op een continue o.a. als gevolg van het optreden van herstelmechanismen (Tonneijck *et al.*, 2000).

De effectieve blootstellingsniveaus die betrekking hebben op paprika (berekende NOEC waarden uit dit onderzoek en de effectieve blootstellingsniveaus uit Beaudry & Kays , 1988) zijn weergegeven in combinatie met de effectieve blootstellingsniveaus voor andere plantensoorten en de algemene effectgrenslijn (Figuur 10). Op grond hiervan is er geen aanleiding de algemene effectgrenswaarde te herzien specifiek voor paprika. Om negatieve effecten bij paprika te voorkomen mogen de etheen concentraties in de kas de effectgrenswaarde niet overschrijden. Aangezien de natuurlijke achtergrondconcentratie ca. 2-3 ppb bedraagt kan een geringe bijdrage vanuit de rookgassen al leiden tot overschrijding van de effectgrenswaarde met negatieve effecten tot gevolg.

5 Conclusies

Op grond van het onderzoek worden de volgende conclusies getrokken:

1. Er zijn geen negatieve NO_x effecten bij paprika te verwachten bij langdurende blootstelling aan concentraties tot ca. 600 ppb;
2. Met de NO_x effectgrenswaarde ter bescherming van plantensoorten in het algemeen wordt het risico voor paprika overschat;
3. Paprika is gevoelig voor etheen, bij blootstelling aan concentraties vanaf 10 ppb zijn negatieve effecten op de groei en vruchtontwikkeling te verwachten;
4. Er is geen reden om de etheen effectgrenswaarde ter bescherming van plantensoorten in het algemeen specifiek voor paprika aan te passen;
5. Gezien het geringe verschil tussen etheen concentraties in de buitenlucht en de effectgrenswaarde is het aan te bevelen de etheenconcentratie op plantniveau te bewaken. Dit is het beste te doen met een gevoelige etheen monitor (tot < 4 ppb) waarvan de signaal direct gekoppeld wordt aan de klimaatcomputer.

6 Referenties

- Anon., 2001.
Air Quality Guidelines for Europe 2000, second edition. World Health Organization, Regional Publications, European Series No. 91. Regional Office for Europe, Copenhagen.
- Beaudry, R.M. & Kays, S.J. 1988.
Effect of ethylene source on abscission of pepper plant organs. *HortScience* 23:743-744.
- Blom, M., A.H. Eenink, 1986.
Nitrate concentration and reduction in different genotypes of Lettuce. *J. Amer. Hort. Sci* 111 (6): 908-911.
- Dieleman, Anja, Jeroen Zwinkels, Arie de Gelder, Ingrid Kuiper, Feije de Zwart, Chris van Dijk & Tom Dueck (2007)
CO₂ bij parika: meerwaarde en beperkingen. Wageningen UR Glastuinbouw, Nota 494. 80 pp.
- Dueck, Th., C.J. van Dijk, F. Kemkes & T. van der Zalm, 2008.
Emissies uit WKK installaties in de glastuinbouw. Wageningen UR, Nota 505, 46 pp.
- Dueck, Th.A., C.J. van Dijk, F. David, N. Scholz & F. Vanwalleghem, 2003.
Chronic effects of di-n-butyl phthalate (DBP) on six plant species. *Chemosphere* 53: 911-920.
- Jacobson, J.S. 1977.
The effects of photochemical oxidants on vegetation. *Verein Deutscher Ingenieure - Berichte* 270: 163-173.
- McCune, D.C. 1969.
On the establishment of air quality criteria, with reference to the effects of atmospheric fluorine on vegetation. *Air Quality Monograph* 69-3, American Petroleum Institute, New York, 33pp.
- Posthumus, A.C., Tonneijck A.E.G. & Van der Eerden, L.J. 1989.
Exposure-effect relationships for plants in relation to several air pollutants. In: L. Brasser & W. Mulder (Eds.), *Proceedings of the 8th World Clean Air Congress*, The Hague. Elsevier, Amsterdam, 13-18.
- Tonneijck, A.E.G. 1989.
Evaluation of ozone effects on vegetation in The Netherlands. In: T Schneider, S.D. Lee, G.J.R. Wolters & L.D. Grant (Eds.), *Atmospheric ozone research and its policy implications*. *Studies in Environmental Science* 35. Elsevier, Amsterdam, 251-260.
- Tonneijck, A.E.G. & Van Dijk, C.J. 2000.
Effecten van etheen op planten rond lokale bronnen. Een risico-evaluatie. *Plant Research International Nota* 42, Wageningen, 22 pp.
- Van der Eerden, L.J. & Van Dijk, C.J. 1993.
Effecten van atmosferische fluoriden op planten. *Evaluatie van de wetenschappelijke basis voor normstelling*. CABO-DLO rapport 185, CABO-DLO, Wageningen, 45 pp.
- Wellburn A.R. 1990.
Why are atmospheric oxides of nitrogen usually phytotoxic and not alternative fertilizers? *Tansley Review* 24. *New Phytologist* 115:395-429.

Bijlage I.

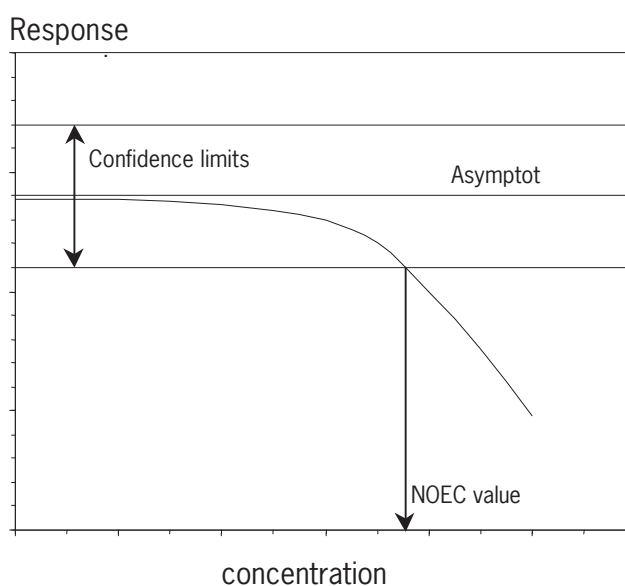
Voedingsoplossing paprika

Hoofdelementen	mmol/liter	Spoorelementen	μmol/liter
NH ⁴⁺	0.5	Fe ²⁺	25
K ⁺	9.1	Mn ²⁺	10
Ca ²⁺	6.7	Zn ²⁺	5
Mg ²⁺	2.0	B ³⁺	30
NO ₃ ⁻	20.6	Cu ²⁺	0.75
SO ₄ ²⁻	2.3	Mo ⁴⁺	0.50
P ³⁻	1.7		
EC 2.8			
pH 6.2			

Bijlage II.

Verwerking van gegevens

Voor de proefopzet is gekozen voor een reeks verschillende behandelingen zonder herhaling. Een dergelijke opzet maakt het mogelijk dosis-response-relaties te bepalen en aansluitend *No Observable Effect Concentrations* (NOEC) te berekenen (Dueck *et al.*, 2003). Dit impliceert het gebruik van regressie analyse voor het analyseren van de gegevens in plaats van variantie analyse om te toetsen op verschillen tussen behandelingen.



Formule 1:

$$y = \frac{C}{1 + e^{-B(\ln(x) - \ln(M))}}$$

Formule 2:

$$NOEC = M - \frac{\ln(C / y_c - 1)}{B}$$

Figuur A. Grafische weergave voor het afleiden van NOECs. Na berekening van de dosis-response relatie (formule 1) en bepaling van het 95% betrouwbaarheidsinterval van de asymptoot (representant van geen effect), werd de concentratie bepaald overeenkomend met de ondergrens van het betrouwbaarheidsinterval (formule 2). Uit: Dueck *et al.*, 2003.

Voorafgaande aan de regressie analyse werd voor elke effectparameter het gemiddelde per behandeling (begassingskasje) bepaald. Per effectparameter werd op basis van de gemiddelde waarde per behandeling de dosis-response-relatie bepaald door middel van regressie analyse met een logistisch model (Genstat, 1993). De beste *fit* van de non-lineaire regressie is gebruikt voor het berekenen van regressie-vergelijkingen met de formule:

$$y = C / \{1 + \exp[-B(\ln(x) - \ln(M))]\} \quad (\text{Formule 1, Figuur A})$$

waarin C is de berekende response als $x=0$, waarbij x is de gemiddelde concentratie (ppb) van de betreffende luchtverontreinigingscomponent gedurende de gehele expositieperiode. Na schatting van parameter M (de

concentratie die overeenkomt met het 50% effect ten opzichte van de controle) en B (schaal parameter), kan de Effectieve Concentratie worden berekend (EC10) die overeenkomt met een 10% lager effect ten opzichte van de controle (onder C). Vervolgens kan de NOEC worden berekend met behulp van de formule:

$$\text{NOEC} = M - \{\ln(C/y_c - 1)\}/B \quad (\text{Formule 2, Figuur A})$$

Waarin y_c de ondergrens is van het 95% betrouwbaarheidsinterval van de asymptoot (C). De NOECs en EC10 werden berekend met de module *Fitnonlinear* van het statistisch software pakket Genstat.

Bijlage III.

Gerealiseerde NO_x en etheen concentraties, en klimaatomstandigheden

Parameter	Behandeling					
	1	2	3	4	5	6
<i>NO_x experiment</i>						
<i>(februari – mei 2009)</i>						
Etmaaltemp. (°C)	23.1	23.5	23.2	23.3	23.7	22.1
RV (%)	68.2	67.3	71.6	69.2	65.7	73.2
NO _x setpoint (ppb)	0	68	119	204	357	612
NO _x gerealiseerd (ppb)	15.6	68.4	140.3	226.5	399.8	614.3
st.afw.	13.5	16.6	32.9	37.5	55.9	128.6
<i>Etheen experiment</i>						
<i>(juni – augustus 2009)</i>						
Etmaaltemp. (°C)	23.1	24.1	23.9	23.6	23.2	24.1
RV (%)	72.2	65.3	68.0	68.8	66.2	65.3
Etheen setpoint (ppb)	0	15	40	70	120	200
Etheen gerealiseerd (ppb)	4.5	15.2	37.3	66.7	116.1	192.2
st.afw.	1.5	3.8	7.5	10.5	16.1	26.1

