

**ONDERZOEKSPROGRAMMA
TER VERBETERING VAN KARWIJ ALS AKKERBOUWGEWAS
EN
TER INTRODUCTIE VAN NIEUWE AFZETMOGELIJKHEDEN
EINDVERSLAG 1990-1994**

Deelnemende instellingen:

DLO-Centrum voor Plantenveredelings- en Reproductieonderzoek (CPRO-DLO)

DLO-Instituut voor Agrobiologisch en Bodemvruchtbaarheidsonderzoek (AB-DLO)

Proefstation voor de Akkerbouw en de Groenteteelt in de Vollegrond (PAGV)

DLO-Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek (IPO-DLO)

Prof. H.C. van Hall Instituut/Rijks Agrarische Hogeschool Groningen (RAHG)

DLO-Agrotechnologisch Onderzoeksinstituut (ATO-DLO)

Rijksuniversiteit Groningen (RUG), Laboratorium voor Microbiologie

Landbouw Universiteit Wageningen LUW, Laboratorium voor Organische Chemie

Rijks Universiteit Groningen (RUG), Groningen Biotechnology Centre

isn 557154

Onderzoeksprogramma ter verbetering van karwij als akkerbouw gewas en ter introductie van nieuwe afzetmogelijkheden

EINDVERSLAG 1990-1994

Inhoud

Inleiding

1. Doel en structuur van het onderzoek
2. Samenvatting van de resultaten
3. Evaluatie van het onderzoek
4. Conclusies en aanbevelingen
5. Eindverslagen van de projecten en haalbaarheidsstudies
 - 5.1 Veredelingsonderzoek naar opbrengst, oogstzekerheid en kwaliteit van karwij (*Carum carvi* L.)
 - 5.2 De invloed van gewasopbouw en omgevingsfactoren op de produktie en kwaliteit van karwijzaad
 - 5.3 Onderzoek naar de beperking van het optreden van en de schade door verbruiningsziekte in karwij
 - 5.4 Ecologie en biologische bestrijding van *Sclerotinia sclerotiorum* in karwij
 - 5.5 Biologie en bestrijding van de wollige karwijluis
 - 5.6 Vegetatieve instandhouding en vermeerdering van karwij
 - 5.7 De biologische activiteit van carvon
 - 5.8 Invloed van S-carvon op de spruitgroei van aardappelen en op de functionele en structurele eigenschappen van biologische membranen
 - 5.9 Onderzoek naar de toepassingsmogelijkheden van S(+)-carvon als chirale uitgangsstof in de synthese van enantiomeer zuivere geurstoffen, gewasbeschermingsmiddelen en tussenprodukten in de organische synthese
 - 5.10 Bioconversie van (+)-carvon, een haalbaarheidsonderzoek
6. Overzicht van de personele en materiële bestedingen
7. Samenstelling Karwijplatform, College van Deskundigen en Projectenlijst

W. Meijer, AB-DLO

Programmacoördinator

Inleiding

Het agrificatieonderzoek is oorspronkelijk opgestart en gestimuleerd als deeloplossing voor EG-problemen met overschotten en Nederlandse problemen met nauwe rotaties. Ondertussen is duidelijk dat er op lange termijn veel mogelijkheden zijn om landbouwproducten in de non-food industrie af te zetten. De argumenten daarvoor liggen in het vlak van duurzame productie en milieubeheer, in de interesse van de industrie voor produktvernieuwing en specialties, de belangstelling van de consument voor groene producten en de verwachting dat op lange termijn minerale grondstofprijzen aanmerkelijk stijgen. Echter op korte termijn is de afzetruimte beperkt tot enkele producten en toepassingen waarin de technische en/of de milieuvoordelen van de landbouwgrondstoffen opwegen tegen de vaak hogere prijs. Carvon uit karwij- of dillezaad is een van de producten gebleken waarvoor nu toepassingen haalbaar zijn.

Aan het begin van het karwijonderzoek was duidelijk dat carvon interessante biologische activiteit bezit, in het bijzonder als kiemremmer voor aardappelen. Onduidelijk was onder andere of de balans van hoofd- en bijeffecten, milieuaspecten en kostprijzen tot een economisch haalbare toepassing zou leiden. Onduidelijk was ook of andere natuurlijke terpenen, of andere herkomsten van carvon de productie door de akkerbouw zou kunnen verdringen. Belangrijk was dat in de literatuur relatief veel gegevens beschikbaar waren van de specifieke S(+)-carvon uit karwij of dille, waardoor de investeringen in benodigde informatie voor toelating van gewasbeschermingsmiddelen beperkt worden. Belangrijk was ook de belangstelling van de toekomstige gebruikers voor dit biologische kiemremmiddel. Belangrijk was tenslotte dat, parallel aan het Karwijprogramma, door Luxan b.v. het initiatief genomen is om in samenwerking met ATO-DLO de toepassing van carvon als kiemremmer te ontwikkelen, waardoor de commerciële fase aansluit op het onderzoek.

Dit eindverslag is de formele afronding van vier jaar onderzoek in het Karwijprogramma. In dit verslag zijn uitgebreide deelverslagen per project opgenomen, een korte evaluatie van de projecten door het platform en een overzicht van de personele en materiële inzet. Naast dit verslag is, onder verantwoordelijkheid van het Karwijplatform, door DLO een samenvattend rapport uitgegeven bij de eindpresentatie van het programma (Karwij, carvon en biologische kiemremming van aardappelen - Resultaten en conclusies van 4 jaar agrificatieonderzoek - DLO Wageningen - 2 juni 1994). In dat, voor brede verspreiding bestemde rapport is niet alleen het Karwijprogramma weergegeven maar ook het door Luxan b.v. en ATO-DLO uitgevoerde toepassingsonderzoek. De beschrijving van doel en structuur van het Karwijprogramma, de samenvatting van de resultaten en ook de conclusies en aanbevelingen in dit verslag zijn gelijk aan de overeenkomstige paragrafen in dat DLO-rapport. Dit eindverslag dient als overzicht, verantwoording en documentatie en wordt uitsluitend verspreid naar opdrachtgevers, financiers en betrokken onderzoekers.

1. Doel en structuur van het onderzoek

Op basis van initiatieven van Groninger karwijtelers en oriënterend onderzoek van ATO-DLO zijn in 1989 voorstellen voor dit agrificatie-onderzoek geformuleerd. De doelstellingen waren om toepassingen te ontwikkelen voor de etherische olie van karwij en om in het plantaardige productieproces een hogere en stabiele carvon-productie te bevorderen. Van meet af aan is de toepassing van carvon als kiemremmer voor aardappelen de belangrijkste optie geweest. De realisatie-kansen daarvan werden door BV Luxan hoog ingeschat en om redenen van bedrijfsbescherming is de ontwikkeling van die toepassing in een apart programma ondergebracht en uitgevoerd in samenwerking met ATO-DLO. Het doel van het onderzoek was de toepassing van carvon, en eventuele andere monoterpenen, als kiemremmer te optimaliseren en formuleringen en toepassingstechnieken te ontwikkelen, de effecten op de produkt-kwaliteit en het milieu vast te stellen en de toepassing op praktijkschaal te toetsen.

De voorstellen voor onderzoek van de overige deelgebieden van de produktiekolom zijn op elkaar afgestemd en gebundeld in een tweede programma, de afgelopen jaren kortweg aangeduid als het Karwijprogramma. Dat omvatte verschillende disciplines, varieerde van fundamenteel tot toegepast en is uitgevoerd door het Professor van Hall Instituut, de vakgroepen Microbiologie en Biotechnologie van de RU Groningen, de LU Wageningen, het PAGV en vier DLO instituten (AB, ATO, CPRO en IPO). Het werkgebied en de doelstellingen worden hierna in drie kaders samengevat: - het mechanisme van de biologische activiteiten -het plantaardige productieproces - nieuwe toepassingen. Een lijst van de projecten en haalbaarheidsstudies in het Karwijprogramma is in paragraaf 7 opgenomen.

Het Karwijprogramma is begeleid door het Karwijplatform welke de taak had de minister van LNV te adviseren over eventuele bijsturing in het onderzoek en in de financiering. Voor specialistische kennis kon het Platform steunen op een College van Deskundigen. Het programma is gecoördineerd door AB-DLO. De personele samenstelling van Platform en College van Deskundigen is in paragraaf 7 vermeld.

Het mechanisme van de biologische activiteit van carvon

Om de kiemremmende en fungicide werking van carvon te kunnen optimaliseren en om het onderzoek naar andere toepassingen beter te kunnen richten, is het wenselijk het mechanisme van de biologische activiteiten van carvon op te helderen. Het onderzoek met die doelstelling kon aansluiten bij publikaties over de effecten van monoterpenen op dierlijk weefsel, waarin remming aangetoond is van enzymsystemen die een rol spelen bij celgroei en celdeling of die een functie hebben in celmembranen. Aansluitend op de mogelijke toepassingsgebieden van carvon als kiemremmer en als

fungicide zijn twee studies uitgevoerd: een vierjarig onderzoek naar effecten op enzymatisch en celniveau in aardappelkiemen en een éénjarig onderzoek naar de effecten op microbiële membranen.

Het plantaardige productieproces

Wanneer naast de traditionele karwijteelt een teelt voor de carvonproductie op gang komt, dan worden nieuwe eisen gesteld aan het productieproces. Industriële grondstofvoorziening vereist een regelmatige aanvoer en een hoog carvongehalte. Karwij is in vele tientallen jaren een van de kleine handelsgewassen geweest waaraan zowel in Nederland als daarbuiten slechts zeer beperkt landbouwkundig onderzoek is besteed. Voor de toepassing als zaad was een etherisch oliegehalte van 3 à 4 % ruim voldoende waardoor ook aan dat kwaliteitsaspect weinig aandacht gegeven is. Dat betekent dat op het terrein van de genotypen en gewas- en teeltkennis nauwelijks of geen vooruitgang geboekt is. Dat weerspiegelt zich in een zeer geringe stijging van de zaad-opbrengsten gedurende deze eeuw en een gelijkgebleven etherisch oliegehalte (Fig. 3). In dezelfde figuur zijn de grote variaties zichtbaar van zowel zaadopbrengsten als etherisch oliegehalte per jaar tussen percelen en over de jaren heen. Die feitelijke achterstands- situatie ten opzichte van de ontwikkelingen bij de grote akkerbouwgewassen heeft ook een positieve kant. Ze doet verwachten dat bij geconcentreerde en samenhangende onderzoekinspanningen relatief snelle vooruitgang te bereiken is. In het Karwijprogramma waren de projecten op het terrein van de plantaardige productie allereerst gericht op twee doelen:

- de stabiliteit van de zaad- en carvonproductie verbeteren;
- het carvongehalte verhogen.

Aansluitend op die hoofdlijnen zijn op de verschillende deelgebieden specifieke doelstellingen geformuleerd. Het veredelingsonderzoek had als eerste opgave om de benodigde technieken te ontwikkelen: snelle, bij voorkeur niet-destructieve meetmethoden voor het carvongehalte en vegetatieve vermeerdering om hoogwaardige genotypen efficiënt te benutten in het veredelingsproces. Van karwij (figuur 4 toont het gewas in volle bloei) bestaan één- en tweejarige typen, di- en tetraploïden.

Evaluatie van de eigenschappen en potenties van de verschillende populaties diende de basis te vormen voor de selectie en kruisingsprogramma's. In verband met het doel de opbrengststabiliteit te verhogen, waren in de plannen ook toetsen op ziekteresistentie opgenomen, waarvoor de methodiek ontwikkeld zou worden in één der projecten op het gebied van ziekten en plagen.

Ter ondersteuning van het veredelings- en teeltonderzoek is plant- en gewasfysiologisch onderzoek in het programma opgenomen. Dat onderzoek diende de limiterende stappen en processen in de zaadvorming te bepalen en de effecten daarop van klimaat- en teeltfactoren. Dit onderzoek stelde zich verder ten doel om zichtbaar

te maken welke factoren invloed hebben op het etherisch olie- en carvongehalte en hoe die gehalten in de plant gereguleerd worden.

De beschikbare teeltoervaring gaf aan dat ziekten en plagen een grote invloed hebben op de opbrengststabiliteit. In het programma is daarom relatief veel capaciteit ingeruimd voor dit terrein. Waarschijnlijk de grootste schade wordt veroorzaakt door de verbruiningsziekte, (*Mycocentrospora acerina*). Biologie en ecologie van deze schimmel waren nagenoeg onbekend evenals een bestrijdingsmethode. Het onderzoek heeft zich ten doel gesteld voldoende kennis te verzamelen om maatregelen te kunnen formuleren die de schade beperkt. Van een tweede belangrijke schimmelleziekte, sclerotiënrot, was vanuit andere gewassen meer bekend. In het kader van het programma is de ecologie van de schimmel in karwij onderzocht om vanuit die kennis specifieke maatregelen aan te geven om schade te voorkomen. Binnen het terrein van ziekten en plagen is tenslotte bestudeerd hoe schade door wortelluis (*Pemphigus passeki*) te voorkomen of te beperken is. Het onderzoek had ten doel om aangrijpingspunten te vinden voor geïntegreerde bestrijding van deze plaag op basis van te verzamelen kennis van de levenswijze van het insect en van de factoren die de schade beïnvloeden.

Nieuwe toepassingen

Op basis van de literatuur op het gebied van de biologische activiteit van monoterpenen en carvon werden aan het begin van het programma toepassingen als natuurlijk fungicide, insecticide, als kiemremmingsmiddel en als grondstof voor farmaceutica en geur- en smaakstoffen kansrijk geacht. Het Nederlandse belang bij aardappelen en de maatschappelijke en toelatingstechnische ontwikkelingen rond de chemische kiemremmers rechtvaardigden concentratie op de kiemremmende eigenschappen van carvon. De overige opties hebben echter ook aandacht gekregen in het programma.

In organisch-chemisch onderzoek was de doelstelling om de bruikbaarheid van carvon als chirale uitgangstof aan te tonen door enantiomeer zuivere verbindingen te synthetiseren van bekende stoffen die nu als mengsels van isomeren toegepast worden. Daarnaast richtte dit onderzoek zich op de synthese van nieuwe chirale verbindingen en op omzetting in verbindingen die van belang zijn voor de farmaceutische en de geurstoffenindustrie. Naast de organisch-chemische synthese-route is de haalbaarheid onderzocht van microbiële conversie van carvon en limoneen. Op die wijze verkregen geur- en smaakstoffen en farmaca kunnen als natuurlijk aangemerkt worden. Dat is een belangrijk voordeel bij vele toepassingen.

Relatief beperkte capaciteit is ingezet om de fungicide en insecticide activiteit van carvon te toetsen. Dat onderzoek betrof vooral screening in het laboratorium en oriëntatie op de haalbaarheid.

2. Samenvatting van de resultaten

Het geheel van onderzoekactiviteiten rond karwij en carvon in de afgelopen vier jaar omvatte een groot aantal disciplines, bestudeerde vragen op subcellulair tot gewas-niveau en richtte zich op fundamentele kennis en op praktische toepassingen. Om bij die diversiteit het overzicht te bevorderen worden in deze paragraaf de grote lijnen van de resultaten weergegeven. In paragraaf 5 zijn uitgebreider samenvattingen per project opgenomen. De resultaten in de projecten worden in dezelfde drie clusters samengevat die in de vorige paragraaf zijn gehanteerd.

Het mechanisme van de biologische activiteit van carvon

Op enzymatisch niveau bleek de onverzadigde ketongroep in het carvonmolecuul een essentiële rol te spelen bij de remming van de kieming. De groeiremming van de kiemen blijkt samen te hangen met activiteitsverlies van een sleutelenzym in de synthese-route van hormonen en sterolen en van componenten van de ademhalingsketen. Aangetoond is dat het verlies van die enzymactiviteit veroorzaakt wordt door blokkering van de synthese van het enzym; echter de regulatie van die blokkering is nog onduidelijk.

De toepassing van carvon veroorzaakt enige vertraging van de wondhelingsprocessen, maar dit blijkt in de praktijksituatie nauwelijks een probleem te zijn omdat de wondheling zich al in gang heeft gezet voor carvon wordt toegediend. Het aardappelweefsel blijkt zich na enige tijd aan te passen aan de aanwezigheid van carvon. Aangetoond is ook dat carvon in de kiemen omgezet kan worden. Bij de toepassing moet dat verlies gecompenseerd worden.

De invloed van carvon op micro-organismen is onderzocht in modelsystemen van microbiële membranen en in experimenten met intacte bacteriën. Carvon bleek zich bij langdurige blootstelling op te hopen in de cytoplasma-membranen waardoor de membraanintegriteit verstoord en de ionenpermeabiliteit vergroot wordt. Door deze "lekke" membraan wordt de energiehuishouding van de micro-organismen ontregeld.

Het plantaardige produktieproces

In het fysiologische onderzoek is aangetoond dat de zaadaanleg de limiterende stap is in het zaadvormingsproces. Hoewel een deel van de bloempjes in de latere schermen niet fertiel is, is het aantal volledige bloempjes altijd veel groter dan benut kan worden. De bestuiving is niet beperkend onder veldomstandigheden en na de kritische fase van de zaadaanleg bleek de vulling van het zaad weinig beïnvloed te worden door ongunstige klimaat- en teelt-omstandigheden. De zaadaanleg bleek nauw samen te hangen met de hoeveelheid straling die het gewas opvangt en de zaadaanleg

wordt dus vooral bepaald door de assimilatenbeschikbaarheid in die fase. De meeste etherische olie wordt in de eerste stadia van de zaadvorming gesynthetiseerd en het gehalte bleek hoger bij een hoger lichtniveau of bij een hoog aanbod van koolhydraten. Uit deze resultaten zijn een aantal mogelijkheden geformuleerd om via veredeling of via teeltmaatregelen de carvonopbrengsten te verhogen.

In het veredelingsonderzoek is een snelle, niet-destructieve meetmethode voor het carvon- en limoneengehalte ontwikkeld op basis van NIR spectrometrie. Via massaselectie zijn uit een traditioneel tweejarige karwijras populaties verkregen met een ongeveer 15 % hoger carvongehalte. Dergelijke populaties zijn ook in ontwikkeling voor vastzadige en tetraploïde karwij. Uit éénjarige typen is een éénjarig ras ontwikkeld dat extra mogelijkheden biedt in de rotaties.

Om na selectie van genotypen met een hoog carvongehalte de volgende stappen in de veredeling snel en efficiënt te kunnen zetten zijn voor karwij vegetatieve vermeerderingstechnieken ontwikkeld. Weefsel van jonge bloeiwijzen bleek het meest geschikt voor volledige plantregeneratie. De methodieken om scheutvorming en beworteling te bevorderen zijn beschreven en een protocol voor verdere vermeerdering is opgesteld. Met een hoge slagingskans zijn genotypen met een hoog carvongehalte uit het veredelingsprogramma in stand gehouden en vermeerderd. Via dit materiaal zijn in het veredelingsonderzoek verdere verhogingen van het carvongehalte onderweg.

Op het terrein van de ziekten en plagen zijn aanzienlijke vorderingen gemaakt in kennis en zijn strategieën geformuleerd om de aantastingen te beperken. Voor de verbruiningsziekte bleek de grond de belangrijkste infectiebron, maar is ook besmetting via het zaad mogelijk. Toetsmethoden om die besmettingen aan te tonen zijn ontwikkeld. De overdracht van inoculum van het dekvruchtjaar naar het oogstjaar en over de jaren heen is in kaart gebracht. Bij de uitbreiding van de ziekte in het gewas is het micro-klimaat en de gewasstructuur bepalend. Op grond van deze kennis is een teeltstrategie geformuleerd waarmee de risico's beperkt worden.

Voor de tweede belangrijke schimmelziekte, sclerotiënrot zijn de mogelijke infectiewegen bepaald en de relaties gelegd met de teeltwijze. Aansluitend daarop zijn methoden om de besmetting te voorkomen getoetst. Toepassing van kalkstikstof beperkt de vorming van de vruchtlichamen en daarmee de mate van aantasting van het gewas. Dat middel is echter duur en niet altijd afdoende. Aangetoond is dat biologische bestrijding goed werkt. Toepassing van een sporensuspensie van een antagonistische schimmel kan de infectie sterk reduceren.

De karwijluis geeft de schade vooral in het dekvruchtjaar. Aangetoond is dat het type dekvrucht invloed heeft op de kolonisatie. Sommige dekvruchten maskeren het karwijgewas.

De vochtigheid van de grond bleek bepalend voor de vermenigvuldiging van de luizen. Vastgesteld is dat op grond van de ecologie van het insect nu nog geen afdoende maatregelen te formuleren zijn om de plaag te voorkomen of te beperken.

Nieuwe toepassingen

In het organisch-chemische onderzoek zijn de mogelijkheden van carvon als grondstof voor interessante, hoogwaardige verbindingen aangetoond door de synthese uit carvon van enantiomeer zuivere verbindingen van een aantal bekende stoffen: α -cyperon, polygodial, decalol en AmbroxR. Ook zijn chirale tussenproducten gesynthetiseerd die bruikbaar zijn in organische syntheses. Via publikatie van de resultaten worden de mogelijkheden van carvon in brede kring bekend.

In een studie naar de haalbaarheid van bio-conversies van carvon naar hoogwaardige verbindingen zijn de activiteiten getoetst van een vijftal bacteriën en een schimmelsoort.

Carvon werd via uitsluitend reducties omgezet in dihydrocarvon-isomeren en enkele andere verbindingen. Voor enkele stoffen bestaat belangstelling vanuit de geur- en smaakstoffenindustrie. Geconcludeerd is echter dat de efficiëntie van de omzettingen te laag is en de kosten van bio-conversie te hoog.

Het onderzoek naar de fungicide en insecticide werking van carvon is een verkenning van de mogelijkheden geweest. Vastgesteld is dat langdurig contact van de organismen met carvon nodig is om remmingen en bestrijdingen te kunnen verwachten. Die conclusie is ook afgeleid uit het onderzoek naar het effect van carvon op biologische membranen. Carvon lijkt dan ook specifiek geschikt voor toepassing bij bewaring en tijdens langdurig transport. Carvon bleek minder geschikt voor ontsmetting van enkele soorten bloembollen en zaaizaden. Bij die toepassingen zijn fytotoxische effecten geconstateerd.

3. Evaluatie van het onderzoek

Het welslagen van het Karwijprogramma is onder andere af te meten aan de productie van wetenschappelijke publikaties. Die productie ijlt uiteraard nog enige tijd na, maar verwacht worden drie proefschriften en ruim dertig publikaties in wetenschappelijke tijdschriften. Daarnaast verschenen of verschijnen enkele tientallen artikelen in meer populaire vorm. Die oogst mag zeer goed genoemd worden, zeker gezien het gedeeltelijk toegepaste karakter van het werk en het lage kennisniveau waarop vaak gestart moest worden, waardoor methoden en technieken aangepast of ontwikkeld moesten worden. Naast deze reflectie heeft het Karwijplatform het tot haar taak gerekend om aan het eind van het programma de projecten en haalbaarheidsstudies te evalueren. Die evaluatie wordt hierna kort weergegeven waarbij de indeling in drie clusters wordt gebruikt, zoals in de voorgaande paragrafen.

Het mechanisme van de biologische activiteit

Het onderzoek naar het mechanisme van de kiemremming van aardappelen is voortvarend aangevat en er is een duidelijk spoor uitgezet. Maar, zoals te verwachten bij dergelijke complexe systemen, is het beeld nog niet af. De verworven kennis van het proces is voldoende als basis voor de toepassingen als kiemremmer. Voor verbreding van het toepassingsgebied is het zinvol om het mechanisme verder te doorgronden. In een korte studie naar de effecten van carvon bij micro-organismen is een globaal beeld geschetst van het mechanisme van de verstoringen in het functioneren van membranen. Daaruit volgen de grenzen voor de toepassingen op dat gebied en dat is belangrijke informatie bij het zoeken naar verdere toepassingen voor carvon.

Het plantaardige productieproces

Het plant- en gewasfysiologische onderzoek is terecht toegespitst op de plantfasen vanaf de bloei en van daaruit is een systematische zoektocht opgezet naar de factoren en processen die de carvonproductie bepalen. In grote lijnen zijn de gevoelige en minder gevoelige processen zichtbaar gemaakt. Een belangrijke taak is nu om die kennis te vertalen in toepasbare doelstellingen en in criteria voor de teeltpraktijk en met name voor het veredelingsonderzoek.

Het veredelingsonderzoek heeft zich met goed resultaat geconcentreerd op de ontwikkeling van genotypen met een hoger carvongehalte. Daarbij heeft de methodiekontwikkeling ruime capaciteit geleverd. Op een belangrijk onderdeel daarvan, de vegetatieve vermeerdering, zijn succesvolle methoden ontwikkeld en vastgelegd in protocollen. Deze techniek zal zeer bruikbaar zijn in het vervolg van het verdelingswerk. Op basis van een inventarisatie van de behoeften van de teeltpraktijk,

praktijk, de beschikbare genotypen en de onderzoekscapaciteit, is beperking van het aantal gewastypen in het onderzoek wenselijk. Om in Nederland een voorsprong te realiseren is het nodig de potenties van het nu ontwikkelde plantenmateriaal te benutten. Dat vergt nog meerdere jaren veredelingsonderzoek, waarin versterkte aandacht gewenst is voor de eigenschappen die de zaadproductie bepalen en voor het inweven van de fysiologische achtergrondskennis.

Bij de start van het onderzoek was nauwelijks iets bekend van de belangrijkste schimmelziekte, verbruiningsziekte (*Mycocentrospora acerina*). Op dat terrein is een sterke inhaalactie uitgevoerd waardoor in grote lijnen de ecologie van de schimmel, de verspreiding, infectiewegen en omstandigheden bekend zijn. De toepassing van die kennis voor de praktijkteelt en voor het verdelingswerk moet nog verder uitgewerkt en gebruiksklaar gemaakt worden in toetsen van de bodembesmetting en genotypische resistentie.

Het onderzoek naar sklerotiënrot heeft de infectiewegen en de rol van de dekvrucht daarbij geschetst. Er zijn twee alternatieve bestrijdingswegen aangegeven. De meest aantrekkelijke, biologische methode behoeft nog praktijkontwikkeling, waarbij karwij waarschijnlijk mee kan liften met de ontwikkeling bij andere gewassen.

De ecologie van het meest schadelijke insect, de karwijluis, is aangescherpt en er is een methode ontwikkeld om de aantasting te kwantificeren. Experimentele uitvoering van dit onderzoek bleek niet eenvoudig en er zijn geen directe aanknopingspunten gevonden voor een biologische of ecologische bestrijdingswijze.

Nieuwe toepassingen

Het organisch-chemische onderzoek naar de mogelijkheden van carvon als chirale grondstof is een gedegen en systematische zoektocht geweest, welke de belangstelling voor carvon in deze sector zeker verhoogd zal hebben. Er zijn interessante starts voor diverse syntheses gemaakt. Op korte termijn zijn geen toepassingen zichtbaar geworden en het onderzoek is eerder een lange-termijn investering. Een haalbaarheidsstudie naar de perspectieven van bio-conversie van carvon heeft duidelijke antwoorden op de gestelde vragen opgeleverd en afweging van de prioriteiten heeft geleid tot overeenstemming over beëindiging van deze studie na de geplande looptijd van een jaar.

Het onderzoek naar de toepassingsmogelijkheden van carvon bij de gewas- en voorraadbescherming is enigszins oriënterend gestart omdat het terrein breed is en nog geen achtergrondskennis beschikbaar was. De in te zetten capaciteit is op verzoek van het platform gedeeltelijk verschoven naar de ontwikkeling van vegetatieve vermeerderingsmethoden. Ondanks de beperkte capaciteit is, gebruikmakend van de kennis-toename over het werkingsmechanisme, zichtbaar gemaakt onder welke condities carvon wel en niet toepasbaar is voor deze sectoren.

4. Conclusies en aanbevelingen

- a. Op laboratorium- en op praktijkschaal zijn uitstekende resultaten bereikt met de toepassing van carvon als kiemremmer voor aardappelen. De toepassing heeft tevens een groeiremmend effect op een aantal belangrijke bewaarschimmels. De kosten liggen tussen de goedkoopste bewaarmethode (buitenluchtkoeling met chemische middelen) en de duurste methode (mechanische koeling). Er is een groeiende markt voor aardappelen en verwerkte producten die niet behandeld zijn met de chemische middelen. Deze agrificatie-activiteit mondt nog dit jaar uit in een commerciële toepassing.
- b. Voor het aardappelbedrijfsleven is het belangrijk via deze carvontoeppassing een voorsprong te nemen en te behouden in een groeiende markt. Waarschijnlijk is het eindpunt in de toepassingsontwikkeling nog niet bereikt en daarom verdient het aanbeveling om het optimaliseringsonderzoek voort te zetten.
- c. Voor pootaardappelen is de toepassing veelbelovend en biedt ze nieuwe mogelijkheden. Het lopende onderzoek op dit terrein is van belang voor de internationale concurrentiepositie van deze sector en verdient daarom hoge prioriteit.
- d. Het onderzoek naar organisch-chemische syntheses heeft laten zien dat carvon een hoogst interessante uitgangsstof voor hoogwaardige verbindingen kan zijn. Op termijn zal blijken welke mogelijkheden door het bedrijfsleven worden opgepakt, maar dit onderzoek is vooral een investering in de toekomst.
- e. Conversies van carvon naar hoogwaardige verbindingen of tussenproducten via micro-organismen bleek geen perspectief te bieden, omdat de omzettingsefficiënties laag zijn en de kosten van deze systemen hoog.
- f. Het onderzoek naar de mechanismen van de kiemremming bij aardappelen en van de groeiremming bij micro-organismen heeft belangrijke lijnen uitgezet. Dit kennisniveau is ruim voldoende voor de toepassing van carvon als kiemremmer. Voor verbreding van het toepassingsgebied is het zinvol om het onderzoek naar de werkingsmechanismen voort te zetten en af te ronden.
- g. De fungicide nevenwerking van carvon is een belangrijk voordeel bij de aardappelbewaring. Die nevenwerking en oriënterend onderzoek tonen goede toepassingsmogelijkheden voor carvon bij de bestrijding van schimmels en insecten bij bewaring of langdurig transport van velerlei producten. De ontwikkeling van die toepassingen vergt gericht onderzoek.
- h. In het veredelingsonderzoek zijn de eerste stappen gezet naar een hoger carvon-gehalte. De ontwikkeling van vegetatieve vermeerderingstechnieken zal deze ontwikkeling aanmerkelijk versnellen. Een carvon-gehalte van 3 % lijkt haalbaar over 5-10 jaar. Omdat verbreding van het onderzoekgebied naar hogere en stabiele zaadopbrengsten en naar ziekteresistenties aanzienlijke capaciteit vergt, is bundeling van alle kennis en inspanning gewenst. Daarom is ook beperking van het aantal karwij-typen in het onderzoek gewenst, op basis van inventarisatie van

teeltkansen en perspectieven in de veredeling. De ontwikkeling van hybride-rassen is belangrijk voor de ontwikkeling en versterking van een karwijcarvonketen in Nederland.

- i. Het inzicht in de processen van zaadvorming en etherische oliesyntese in karwijgewassen is aanzienlijk verbeterd en die kennis is geformuleerd in streefrichtingen en strategieën voor veredeling en teeltonderzoek. De benutting van die kennis zal de komende jaren gerealiseerd moeten worden door de ideeën uit te werken en in te weven in het veredelingsonderzoek.
- j. Voor de belangrijkste schimmelziekten van karwijgewassen zijn strategieën geformuleerd hoe de aantastingen en de schade beperkt kunnen worden. Deze inzichten en de ontwikkelde toets-methodieken moeten de komende jaren benut worden bij de veredeling en via praktijkonderzoek en voorlichting overgebracht worden naar de teeltpraktijk.
- k. Carvon heeft concrete toepassingsperspectieven. Dit vertaalt zich niet automatisch in uitbreiding van de karwijteelt in Nederland. Om een aanzienlijk deel van de potentiële markt te bereiken is het nodig om de kostprijs van carvon te verlagen. Een belangrijke bedreiging is goedkope zaadproductie in Oost-Europa en/of ruiltransacties met karwij waarbij de prijs niet doorslaggevend is. Dat betekent dat de sterke kanten van de Nederlandse grondstoffenproductie uitgebuit moeten worden. In de ontwikkeling van rassen met hoog carvongehalte ligt Nederland vóór en het is belangrijk die voorsprong in stand te houden en uit te breiden door de ontwikkeling van hybriden. De variaties in carvonopbrengsten over de jaren zijn groot maar in Nederland aanzienlijk kleiner dan in het buitenland. De grondstofvoorziening kan daardoor in Nederland beter gereguleerd worden. De gunstige infrastructuur in Nederland maken het mogelijk om een efficiënte, geïntegreerde keten op te zetten voor de karwij-carvonproductie.

De komende jaren moet gewerkt worden aan de ontwikkeling van die nieuwe keten. In de primaire sector moet de teelt toegespitst worden op carvonproductie en op regelmatige grondstofvoorziening aan de verwerkende industrie. In het Karwijprogramma is slechts zijdelings onderzoek uitgevoerd naar de technologie van de carvonwinning uit het zaad. Ook aan de benutting van de overblijvende producten, limoneen en het zaad, is slechts oriënterend gewerkt. Deze belangrijke punten vergen de komende periode bijzondere aandacht. De geïntegreerde ontwikkeling van de verschillende activiteiten vergt nauwe samenwerking van de betrokken partijen. Aanbevolen wordt om een intermediaire fase in te lassen waarin teeltorganisatie, verwerkingstechnologie en samenwerking grootschalig beproefd en uitgewerkt kunnen worden.

**5.1 Veredelingsonderzoek naar opbrengst, oogstzekerheid en kwaliteit van
karwij (*Carum carvi* L.)**

5.1 Samenvatting/Conclusies

- Het onderzoek heeft geresulteerd in de ontwikkeling van een snelle, betrouwbare en niet destructieve bepalingmethode van de gehalten carvon, limoneen en etherische olie aan kleine monsters karwijzaad, op basis van nabij-infrarood spectrometrie (NIR). De sectie Potentiele Gewassen heeft de beschikking over een degelijke kwaliteits spectrometer met bijbehorende PC en software.
 - Uitgaande van traditionele loszadige winterkarwij werden in drie generaties massaselectie, met de NIR bepalingmethode, populaties ontwikkeld met een carvongehalte van 2.4%, dat is significant hoger dan de 2.1% van de uitgangspopulatie. In de opbrengstvergelijkende veldproeven bleken de selecties een even hoge zaadopbrengst te geven als de gebruikte standaardrassen. De hooggehaltige populaties staan aan de basis van een proefras van traditionele, loszadige winterkarwij met verhoogd carvongehalte
 - Gezien het verlopen van de kwekersbescherming van het vastzadige ras Bleija (op de rassenlijst sinds 1972) is een begin gemaakt met het ontwikkelen van een opvolger met hoge gehalten in het zaad.
 - De recente vooruitgang in fertiliteit van het in de jaren '70 gecreëerde tetraploide materiaal (uit Bleija) geeft aan dat het binnenkort mogelijk moet zijn dit grootzadige en hooggehaltige type voor de teelt klaar te hebben. Interessant is het verschijnsel van loze vruchtjes waarin het zaad (embryo/endosperm) is mislukt. Deze vruchtjes bestaan slechts uit vruchtwanden met daarin met etherische olie gevulde kanaaltjes. Als gevolg van het geringe totaalgewicht van dit loze zaad kan het carvongehalte oplopen tot 10%.
 - Bij het beoordelen van een aantal buitenlandse rassen van winterkarwij bleek weinig of geen meerwaarde te bestaan ten opzichte van de Nederlandse rassen. Ook verschillen in uiterlijke verschijning van het gewas bleken minimaal; het gaat hier waarschijnlijk om nateelt, al of niet na selectie, van het Nederlandse materiaal.
 - Het verzamelde genetische materiaal bevatte éénjarige accessies (zomerkarwij) waaruit een ras werd ontwikkeld: Karzo, dat naar verwachting in 1995 in de rassenlijst zal worden opgenomen. Een manco van dit ras is, dat de gehalten etherische olie en carvon laag zijn. In het materiaal waar Karzo uit voortkomt werd onvoldoende genetische variatie voor olie-, en carvongehalten gevonden.
 - Kruising van zomerkarwij met het winterkarwijras Bleija (vastzadig) heeft éénjarig materiaal opgeleverd van waaruit een zomerkarwijproefras is ontwikkeld (SEVroeg) dat de landbouwkundige waarde van Karzo combineert met aanzienlijk hogere gehalten.
- Voorts wordt uit ditzelfde uitgangsmateriaal een nieuw wintertype ontwikkeld dat medio augustus kan worden gezaaid (zonder dekvrucht) en einde juli het volgende jaar geoogst kan worden: het 'wintertype voor herfstzaai'.
- De op het IPO-DLO ontwikkelde methode voor het toetsen op resistentie tegen de verbruiningsziekte wordt momenteel op effectiviteit onderzocht.
 - Gebleken is dat met de nieuwe in-vitro weefselkweek methode van het Van Hall Instituut, planten in het veld bij het begin van de bloei met succes op 'de buis' kunnen worden gekloneerd. De resulterende stekken blijken per kloon uniform en groeikrachtig te zijn. Dit opent het perspectief van het maken van rassen op basis van hooggehaltige klonen in zg. polycross. Verwacht wordt dat dergelijke rassen een carvongehalte van ca. 3% zullen hebben, in combinatie met minstens het huidige zaadopbrengstvermogen van 2-3 t/ha.
 - Het ontwikkelen van superieure polycrossen in de verschillende gewas-typen zal zwaartepunt van het voortgaande onderzoek in het nieuwe project

worden, naast het nieuwe onderzoek ter ontwikkeling van een methode voor genetische transformatie van karwij.

5.2 Inleiding

In 1985 begon de toenmalige Stichting voor Plantenveredeling (SVP) met veredelingsonderzoek aan kleine gewassen met een 'non-food' produkt, onderzoek dus dat tegenwoordig milieu-vriendelijke agrificatie heet. Eén van de projecten betrof het gewas karwij. Dit projekt anticipeerde op het succes van het ATO-DLO onderzoek naar de mogelijkheden carvon te gebruiken als natuurlijke kiemremmer van aardappels. Het veredelingsonderzoek had als doel het ontwikkelen van raswaardig materiaal met een hoge opbrengst van carvon, het waardevolle bestanddeel van karwij-etherische olie. Het werd belangrijk geacht op tijd met het veredelingsonderzoek te beginnen, zodat bij het begin van de nieuwe markt een produktiebasis zou zijn gelegd met aan de nieuwe vraag naar carvon aangepaste rassen.

Het onderzoek werd aangepakt vanuit de verworvenheden uit de periode 1960-1984, nl.:

- het vastzadige ras Bleija (wintertype) en de 12 basisfamilies,
- een tetraploid materiaal van Bleija, de zg. 4X,
- kennis van de morfologie en vererving van de eigenschap vastzadigheid,
- kennis van verdelingstechnieken, en
- ervaring met destillatie methode volgens Stahl.

Per 1.6.1990 werd dit onderzoek versterkt voortgezet in het hier gerapporteerde nationale onderzoekprogramma dat wat het veredelingsonderzoek betreft tot 31.8.1994 doorloopt.

Het onderzoek heeft/had de volgende aandachtspunten:

- Ontwikkeling van een snelle en accurate, niet destructieve methode van gehaltebepaling aan kleine monsters zaad.
- Uitvoering van een zg. recurrent divergent massaselectie programma op gehalten, uitgaande van traditionele loszadige winterkarwij, gebruik makend van de best beschikbare bepaling methode.
- Verdere ontwikkeling van het tetraploide materiaal.
- Verzamelen en evalueren van genetische variatie. De eerste evaluatie in 1986, onthulde het bestaan van een aantal éénjarige accessies, hetgeen leidde tot twee nieuwe aandachtspunten:
- Ontwikkeling van het eenjarige, zomertype, materiaal, en:
- Kruisingen tussen het eenjarige en het gewone tweejarige wintertype, en studie en ontwikkeling van de kruisingsproducten.

5.3 Methoden

In 1985 werd de zg. mini-destillatie methode (stoomdestillatie volgens Stahl) weer operationeel gemaakt. Deze bestond uit een geïntegreerde serie van acht 1/4 l destilleertoestellen, gecalibreerd voor de destillatie van monsters van minimaal 4.5 g. zaad.

Van 1988 - 1992 was een zg. 'Compscan 3000' nabij-infrarood (NIR) spectrometer met toebehoren ter beschikking. Dit betrekkelijk eenvoudige toestel was geijkt met een reeks van 60 gehaltebepalingen door mini-destillatie (zie publikatie nr 3).

- Bepalingmethoden: Sinds 1992 worden gehalten van monsters ter grootte van 3-5 g snel, accuraat en non-destructief indirect bepaald met een nieuwe, nabij-infrarood (NIR) spectrometer met bijbehorende PC en programma's, een 'Infra-alyser 500' van de firma Bran en Luebbe. Voor wat betreft karwij is een ijklijn aangebracht van gaschromatografisch bepaalde gehalten van carvon, limoneen en etherische olie van reeksen geselecteerde monsters uit

de jaren 1990, t/m 1993. Jaarlijks worden 30-50 nieuwe monsters aan de ijklijn toegevoegd. Voorts zijn beschikbaar, drie destillatie apparaten met een inhoud van 2 l., waarin de etherische olie uit monsters van 30 - 100 g (met stoom) kunnen worden uitgedestilleerd. Met een refractometer wordt de brekingsindex van de etherische olie bepaald, hetgeen via een tabel het gehalte carvon in de olie oplevert.

- Massaselectie en ruimtelijke isolatie: winterkarwij planten uit geselecteerde families worden opgekweekt en gevernaliseerd in een platte bak van mei tot november. Begin december of begin maart worden de volgroeide planten gerooid en per selectie (100-500 planten) in 'ruimtelijke isolaties' in het veld gepoot om gezamenlijk af te bloeien en af te rijpen.

Karwij is een kruisbevruchter en het stuifmeel van bloeiende karwijplanten wordt met insecten en met de wind verspreid. Teneinde de groepen geselecteerde planten verre te houden van het ongewenste stuifmeel van andere selecties, of karwijpercelen, worden de verschillende isolaties op een flinke afstand van elkaar in de ruimte gezet. Deze 'ruimte' bestaat meestal uit een groot perceel wintertarwe, waarin de isolaties zijn uitgespaard en 50 - 100m van elkaar verwijderd zijn. Het gezamenlijke zaad van de planten in een isolatie, ontstaan uit natuurlijke kruisbevruchting, vormt een populatie of een selectie. Per populatie worden de planten individueel afgeogst. Elke 'plant' heeft dan de vorm van een zakje zaad gekregen, en dit is in aanleg de nieuwe generatie waarin weer verder geselecteerd kan worden. Als de selectie bijv. gericht is op verhoging van het carvongehalte, dan worden de ca. 30 zakjes zaad met het hoogste gehalte aan carvon geselecteerd, en uitgezaaid: de volgende ronde selectie.

Door deze kost-effektieve methode worden die genen 'aangepakt' die invloed hebben op de eigenschap waarvoor geselecteerd wordt. Inteeltdressie wordt voorkomen door het aantal moederplanten dat een generatie voortbrengt niet veel minder dan 30 te doen zijn.

Binnen een populatie gebeurt de selectie op eigenschappen van het zaad na bloei en bevruchting met stuifmeel van alle planten van de families in de populatie. Het effect van massaselectie na de bloei is gewoonlijk beperkt, selectie voor de bloei is effectiever. Met behulp van gekloneerde planten kan in feite voor de bloei geselecteerd worden: zaad van een paar stekken van een kloon wordt op gehalten beoordeeld terwijl andere stekken van dezelfde kloon vegetatief gehouden worden. Blijkt de kloon een hoog gehalte te hebben dan kan met de vegetatieve planten verder gewerkt worden. Klonen kunnen gemaakt worden met het in-vitro weefselkweek proces van het Van Hall Instituut (RAH Groningen), dat elders is beschreven.

- Standaard opbrengstvergelijkende veldproeven bestaan, tenzij anders vermeld, uit tien of meer rassen of populaties/selecties, in minstens drie herhalingen van veldjes ter grootte van 9x5 m². De proeven worden gezaaid in 'open-land', d.w.z. zonder dekvrucht, en eind mei/begin juni, wordt een volvelds deel van elk veldje (3,5x7 m) mechanisch geoogst met een proefveld oogstmachine. Deze machine maait de planten laag af, waarna ze op een doek in een grote jute zak worden getransporteerd, die dan te drogen wordt gelegd, waarna dorsen en schonen volgt. De techniek van het uitvoeren van opbrengstproeven zijn in detail beschreven in publikaties nrs 4 en 7.

5.4 Resultaten

5.4.1. Vier opbrengstvergelijkende veldproeven werden gezamenlijk uitgevoerd met de fa. Groenbroek. Duidelijk bleek het belang van zaadvastheid voor de opbrengststabiliteit: in een loszadig gewas kan de helft van de opbrengst verloren gaan door een week te laat oogsten. Voorts blijkt vroeg oogsten gunstig voor het carvongehalte te zijn. Zaadgewicht en

carvongehalte zijn aanzienlijk lager bij teelt op zandgrond. Gemiddeld genomen blijken de verschillen in carvonopbrengsten/ha tussen de huidige rassen gering (publikaties nrs 4 en 7).

5.4.2. Het recurrente divergente massaselectie onderzoek in het 'Oldambtster' landras (RDMO) had als doel na te gaan in hoeverre traditionele winterkarwij met herhaalde (recurrente) massaselectie te selekteren is in populaties met hoge en met lage gehalten (divergent).

In mei 1985 werden 1000 planten in een praktijkperceel met winterkarwij van het 'Oldambtster' landras, op de boerderij van teler K.C. Hamster te Nieuwolda, op éénen gezet. In juli werden 800 goede gezonde planten apart afgeogst. In de winter werden van 262 planten met 5 g. of meer zaad de gehalten bepaald met mini-destillatie. Op basis van de gehalten werd het restzaad van planten met een hoog gehalte olie en/of carvon, en ook van degenen met een laag gehalte olie of carvon, in mei 1986 in de platte bak gezaaid. Dit was het begin van een massaselectie programma op verhoogde en verlaagde gehalten van carvon en etherische olie, en de ontwikkeling van een proefras. De divergente massaselectie werd driemaal herhaald en de laatste generatie werd in juli 1991 geogst. Voor een goede bepaling van het eindresultaat werd een opbrengstvergelijkende veldproef opgezet met de selecties als gewas. In de winter van 1992 werden de populaties samengesteld door uit het reservezaad van elke plant van elke populatie (ruimtelijke isolatie) naar verhouding zaad bijelkaar te voegen. Dit leverde 200-400 g zaad op van elk van acht populaties (Tabel 1). De hoeveelheid restzaad van oogst 1987, de eerste generatie, was helaas onvoldoende.

In de opbrengstvergelijkende veldproeven van 1992 liepen ook een aantal rassen en buitenlandse aanwinsten mee, in het totaal 18 objecten. Er waren twee proeven: een op de Betuwse klei van het proefbedrijf 'De Santacker' bij Elst, de ander op de lichte zavel van de 'Prof. Broekemahoeve' in Flevoland bij Lelystad. De inhoudsgehaltebepalingen zijn gedaan op de nieuwe NIR. Het resultaat van de RDMO populaties en standaardrassen in de proef op de Broekemahoeve staat in Tabel 1. Publikatie nr 8 is een eerste verslag van de volledige proefgegevens.

De tabel laat zien, dat de selectie op hogere gehalten inderdaad effect lijkt te hebben gehad nl. van 2.1% carvon van de uitgangspopulatie (Oldambtster) naar ca. 2.4% van de hooggehaltige selecties: een significante verhoging van 10-15%. De selectie op verlaagde gehalten had geen effect. Dit zou kunnen betekenen dat de huidige rassen qua gehalten al op de laagst mogelijke waarde zitten. Wat de carvon/ha opbrengst betreft blijken de 'H' populaties goed te scoren omdat de zaadopbrengst vergelijkbaar is met die van de standaardrassen. Een interessante bijkomstigheid is dat Bleija een significant lager gehalte aan limoneen blijkt te hebben en, gezien het normale carvongehalte, daarmee ook een lager gehalte EO. Overigens moet de werkelijkheidswaarde van de (NIR) bepalingen nog bevestigd worden d.m.v. directe, gaschromatografische bepalingen, dit onderzoek is gaande.

5.4.3. Proefras: winterkarwij loszadig met verhoogd carvongehalte van ca. 2.5%. Uit de populaties CARV H 91, en EO&CARV H 91 werden de families met de hoogste carvongehalten geselecteerd en bijeengevoegd tot een proefras. Vervolgens werd er nog een generatie massaselectie uitgevoerd. In mei '93 was er voldoende zaad voor een object in de opbrengst proef 1993, en een vermeerdering die in het veld werd gezaaid.

Met behulp van de in-vitro weefselkweekmethode zijn uit deze populatie 21 klonen gemaakt van planten met een hoog gehalte in het zaad: in het totaal 475 stekken zijn in 'polycross' in ruimtelijke isolatie geplant.

Tabel 1 Opbrengst en gehalten van RDMO selecties en standaardrassen in de opbrengstproef op CPRO-DLO's proefboerderij de Broekemahoeve, O-Flevoland.

EO = gehalte etherische olie; CARV = gehalte carvon; EO&CARV = beiden; LIM = gehalte limoneen; H = hoog, L = laag; 89 = 1989 het jaar van de oogst van de 2e generatie massaselektie, 91 = 1991 de oogst van de 3e generatie.

| Objekten | Gehalten | | Opbrengst | |
|------------------|----------|-----|--------------|-----------------|
| | CARV | LIM | zaad t/ha | carvon kg/ha |
| selekties | | | | |
| EO H 89 | 2.4 | 2.5 | 2.10 | 50 |
| EO H 91 | 2.5 | 2.6 | 2.13 | 53 |
| EO L 91 | 2.0 | 1.9 | 2.70 | 54 |
| | | | | |
| CARV H 89 | 2.2 | 2.2 | 2.60 | 57 |
| CARV H 91 | 2.3 | 2.4 | 2.32 | 53 |
| CARV L 91 | 2.0 | 2.0 | 2.32 | 46 |
| | | | | |
| EO&CARV H 89 | 2.4 | 2.2 | 2.06 | 49 |
| EO&CARV H 91 | 2.4 | 2.5 | 2.41 | 58 |
| | | | | |
| Oldambtster | 2.1 | 2.1 | 1.87 | 39 |
| | | | | |
| standaardrassen: | | | | |
| Volhouden | 2.1 | 2.1 | 2.22 | 47 |
| Bleija | 2.1 | 1.8 | 2.29 | 48 |
| | | | | |
| LSD | 0.2 | 0.3 | 0.42 | 11 |
| CV | 6% | 7% | 11% | 14% |
| Significantie | S | S | S | S |

5.4.4. De 4X. Het in 1986 ontvangen tetraploide materiaal, de 6e generatie na colchicineren (4X.r6), werd gedurende drie generaties in ruimtelijke isolatie geselecteerd op verdere verbetering van de zaadzetting en op verhoogde gehalten, en op het veld als gewas beoordeeld. Het probleem van het materiaal is een onvoldoende zaadzetting.

In 1992 stond de 4X.r7 als gewas, kort en stevig op 8 are veld, het produceerde, naast het karakteristieke zeer grote, vastzadige vruchtje een grote fractie loze vruchtjes, die niet van de plant afvielen, a.g.v. de vastzadigheid. Het verschijnsel van loze vruchtjes is waarschijnlijk het gevolg van chromosomale afwijkingen, waardoor het embryo faalt. Het veld produceerde, omgerekend, 750 kg/ha ongeschoond zaad, en kaf dat voornamelijk uit loze zaadjes bestond. Het resultaat van een oogstanalyse is samengevat in Tabel 2. Eén kg van de oogst werd voorgedroogd tot een vochtgehalte van 8% (was ca. 12%), zodat 964 g over bleef. Het monster moest grondig uitgewreven worden om twee redenen: A. vanwege de vastzadigheid hadden veel vruchtjes nog steeltjes die alsnog losgemaakt moesten worden, B. veel dubbelvruchtjes met een loos vruchtje waren niet uiteen gevallen, het loswrijven hiervan vergde enige kracht. Deze activiteit bracht een geur van etherische olie met zich mee, hetgeen op verlies wees. Het aldus 'gehomogeniseerde' monster werd over een serie standaardzeven gehaald zodat vijf fracties ontstonden (Tabel 2). De fracties aangeduid met a, b en c zijn binnen de betreffende zeeffractie aangebracht door m.b.v. luchtstroom. Etherisch olie gehalte werd met stoomdestillatie bepaald.

Tabel 2 laat zien, dat de grotere frakties loze vruchtjes zeer hoge oliegehalten hebben, maar de absolute hoeveelheden per 1000-k (de laatste kolom) zijn veel minder dan die van de gevulde vruchtjes. Loze vruchtjes, zonder embryo en endosperm en zeer licht in gewicht, bestaan voornamelijk uit vruchtwandjes met de oliekanaaltjes waarin toch olie is afgezet. Het jaar erop stond de 4X.r8 ook weer robuust op het veld, echter in de opbrengst kwam slechts een geringe fractie loze zaden voor, zo klein, dat een analyse als de voorgaande geen zin had. Afgewacht moet worden of dit het resultaat is van de voortgaande plantselectie op fertiliteit, of een jaar effect. De opbrengst was, omgerekend, bijna 1000 kg/ha, met ca. 3% carvon. Dit geeft een berekende carvon opbrengst van 30 kg/ha, hetgeen vergelijkbaar is met de gemiddelde opbrengst van winterkarwij. Met behulp van de in-vitro weefselkweekmethode zijn 20 klonen gemaakt, in het totaal 485 stekken zijn in een ruimtelijke isolatie geplant.

Zomerkarwij.

5.4.5 Karzo. Vier monstertjes karwijhandelszaad uit verschillende Oost-Europese landen en Egypte bleken eenjarig te zijn, dwz na zaai in het voorjaar gingen de planten in juni bloeien en in begin september rijpte het zaad af. De vier werden in 1987 en 1988 in ruimtelijke isolatie vermeerderd en geevalueerd voor veldbeproeving. Het materiaal bleek makkelijk te telen, en de kieming en bodembedekking verliepen relatief snel. Het zaad bleek vastzadig te zijn, en in begin september waren de planten gereed voor maaidorsen. Verschillen bleken er eigenlijk niet te zijn, ook niet wat betreft gewas en opbrengsteigenschappen zoals bleek uit opbrengst vergelijkende proeven in 1988 en 1989. De gezamenlijke opbrengst van de laatste proef werd de basis van een populatie genaamd 'Zomerkarwij SVP' voor nader onderzoek. In januari 1991 werd het materiaal voor registratie als ras onder de naam 'Karzo' aangemeld bij de Raad voor het Kwekersrecht. Het registratie onderzoek werd kortgeleden met succes afgerond, en kwekersrecht werd verleend. Opname in de Nederlandse Beschrijvende Rassenlijst voor Akkerbouwgewassen is aangevraagd, en zal naar verwachting in 1995 worden gerealiseerd. De cooperatieve 'Zaazaad en pootgoed combinatie Anna Paulowna', de ZAP, te Anna Paulowna brengt zaazaad van dit ras in het verkeer.

Zomerkarwij als zodanig, en als dekvrucht van winterkarwij zal een aanwinst blijken te zijn voor de diversificatie van de akkerbouw. De landbouwkundige waarde van het ras Karzo is goed: het heeft laten zien in uiteenlopende jaren een betrouwbaar, oogstzeker ras te zijn, en tussen de 1 en 1.5 t/ha zaad op te brengen. Het manco is het betrekkelijke lage carvongehalte van het zaad en daarmee een lage carvonopbrengst (Tabel 3).

5.4.6. De 'Selectie Eenjarig' (SE). Dit materiaal is voortgekomen uit kruisingen van de vier basis populaties van Karzo met 'Bleija' (vastzadige winterkarwij). In de eerste generatie bleken er al een- en twee-jarige planten uit te splitsen. Eind 1990 werd van de SE de 4e generatie op éénjarige planten, de SE.r4, geoogst. Deze had aanzienlijk hogere gehalten dan Karzo, was wat later, had goede gewaseigenschappen, echter, in het veld bleef ca. de helft van de planten vegetatief waardoor de zaadopbrengst wat achter bleef. Uit de SE zijn twee produkten geselecteerd, de zg. SEvroeg, en een nieuw wintertype dat nog relatief laat kan worden gezaaid, die hieronder worden besproken.

Tabel 2 Vruchtanalyse van de tetraploïde winterkarwij 4X.r7 oogst 1992.

Na loswrijven werd het zaad met behulp van standaardzeven en scheiding op luchtstroom verdeeld in fracties. Etherische olie werd bepaald d.m.v. destillatie in 2 l kolven.

| Fracties: | 1000-k. gewicht | gewicht fractie g. | % | aantal vruchtjes | ←----- etherische olie -----→ | |
|------------------------|--------------------|--------------------------|----|---------------------|-------------------------------|---------------------------|
| | | | | | gehalte | gewicht in 1000k. (mg) |
| Gevulde vruchtjes | | | | | | |
| > 1.4 | 7.49 | 418 | 43 | 55.800 | 3.2 | 13.5 |
| <1.4 >1.0 | 5.80 | 276 | 29 | 47.600 | 3.5 | 9.7 |
| Kaf: loze vruchtjes | | | | | | |
| <1.0 >0.8 | 1.40 | 62 | 6 | 44.300 | 9.0 | 5.6 |
| a | | | | | | |
| b | 0.93 | 10 | 1 | 10.800 | 6.0 | 0.6 |
| c | 0.74 | 18 | 2 | 24.300 | 2.7 | 0.5 |
| * <0.8 >0.5 | * | 28 | 3 | * | 3.0 | 0.8 |
| subtotaal fracties | | 812 | 84 | 182.800 | | 30.7 |
| Kaf: stof en steeltjes | | 141 | 15 | nvt | nihil | 0.0 |
| | | | | | | nvt |

* niet te bepalen nvt: niet van toepassing.

5.4.7. De SEvroeg. Geteeld in een vollegrondskas (daglengte 14 uur), in de winter van 1990/'91, lieten SE planten grote verschillen in bloeitijdstip zien, en 5% van de planten bleef vegetatief, zij waren tweejarig. Van elk van de 20 vroegst bloeiende planten werd zelfbevrucht zaad gewonnen. Deze lijntjes werden in het voorjaar van 1991 op een selectieveld gezet met een groot aantal vrij bestoven families van zaad van SE gewasplanten oogst 1990. Enkel de vroeg bloeiende planten mochten meedoen in de bestuiving, en dezen werden ook afgeogst. In 1992 werd de procedure herhaald; uit het geogste zaad werd de SEvroeg samengesteld. Er was voldoende zaad om het in 1993 in de opbrengstproeven te kunnen opnemen (Tabel 3), en het werd in een perceel van ca. 500 m² vermeerderd.

De zomerkarwijproeven hadden zes objecten: Karzo, de SE, 2 populaties SEvroeg, en 2 rassen uit Hongarije. Er waren twee proeven elk in drie herhalingen met een veldjes grootte van 45 m²: één op de lichte zavel van de Broekemahoeve, de ander op het lichte zand van de Bornsesteeg. Gezaaid werd op 19 en 24 maart en de oogst viel op 6 en 7 september ondanks het aanhoudend natte en koele weer in de maanden juli en augustus (eerste rapportage van de resultaten in publikatie nr 9). Tabel 3 laat het resultaat zien van de SEvroeg in vergelijking met Karzo.

Tabel 3 Opbrengst en gehalte van zomerkarwij selecties SEvroeg en Karzo.

| Objekten | Locaties | | | | | |
|----------|---------------------|------|--------|-------------------|------|--------|
| | O-Flevoland (zavel) | | | Wageningen (zand) | | |
| | zaad | CARV | carvon | zaad | CARV | carvon |
| | opbr. | | opbr. | opbr. | | opbr. |
| | t/ha | %-ge | kg/ha | t/ha | %-ge | kg/ha |
| SEvroeg | 1.2 | 1.6 | 19 | 1.2 | 1.4 | 16 |
| SE | 1.2 | 1.7 | 20 | 1.2 | 1.4 | 18 |
| Karzo | 1.1 | 1.4 | 15 | 1.6 | 1.1 | 16 |

Het carvongehalte van de SE en SEvroeg blijkt aanzienlijk hoger te liggen dan dat van Karzo, met als gevolg een hogere carvonopbrengst in de polder. Echter, op het Wageningse zand blijkt Karzo een onverwacht hoge zaadopbrengst te hebben, zodat het lagere carvongehalte gecompenseerd wordt. Met behulp van de in-vitro weefselkweekmethode werden van 11 veelbelovende planten klonen gemaakt 150 stekken in 't totaal. Ondanks de voorzorg de stekken bij korte dag in de kas in de winter op te kweken raakten ze toch in bloei. Er is een ruimtelijke isolatie in het kassencomplex ingericht waar met hulp van penseel met de hand zaad wordt gemaakt.

5.4.8. Winterkarwij voor herfstzaai. In een veldje SE gezaaid op 15.8.'92 in een zaaitijden proef, groeiden en bloeiden in de zomer van 1993 een paar honderd planten. De planten hadden niet alleen de winter overleefd, ze waren blijkbaar goed gevernaliseerd geraakt, ondanks dat ze daarvoor veel te klein de winter in waren gegaan. Bleija planten uit dezelfde zaaitijd bleven allemaal vegetatief. Ca. 100 SE planten die in begin augustus '93 rijp zaad hadden werden afgeogst, en het zaad dun uitgezaaid op 19 augustus, op een perceeltje op Betuwse klei van het proefbedrijf 'de Santacker'. De opkomst was goed, in de winter werd de stand flink uitgedund, en de overgebleven planten ontwikkelen zich voorspoedig. Zo wordt een nieuw wintertype ontwikkeld, dat in de tweede helft van augustus gezaaid, binnen het jaar en zonder dekvruucht, per einde juli het jaar erop kan worden geogst.

6. Publikaties

(in chronologische volgorde)

1. H.Toxopeus en J.H.Lubberts, 1991. Breeding caraway, *Carum carvi* L. for higher yield of carvone. Poster. Symposium on Industrial Crops and Products, Maastricht.
2. H.Toxopeus, 1991. Teelt en onderzoek aan karwij (*Carum carvi* L.) in Hongarije. CPRO-DLO Intern verslag, 5 pag..
3. H.Toxopeus and H.J.Bouwmeester 1993. Improvement of caraway essential oil and carvone production in the Netherlands. Industrial Crops and Products 1, p 295-301.
4. H.Toxopeus en J.H.Lubberts, en J.Groenbroek sr. 1993. Vergelijkende opbrengstproeven met winterkarwij; de serie HT9101: 1991-1992. Verslag van de zaadopbrengst, de gehalten en de carvonopbrengst. CPRO-DLO Intern verslag, 7 pag..
5. R.Dijkhuizen, 1993. Zeven maanden in het karwij- en dille veredelingsonderzoek van de sectie Potentiele Gewassen van CPRO-DLO te Wageningen. CPRO-DLO Intern verslag, 35 pag..
6. H.Toxopeus en J.H.Lubberts, 1994. Eerste ras zomerkarwij krijgt kwekersrecht. Prophyta 1, p 18 - 19.
7. H.Toxopeus and J.H.Lubberts, 1994. The effect of genotype and environment on carvone yield and yield components of winter-caraway in the Netherlands. Industrial Crops and Products 7 pp.. (Ter perse).
8. H.Toxopeus en J.H.Lubberts, 1994. Vergelijkende opbrengstproeven met winterkarwij; de serie HL9201: 1992 - 1993. Voorlopig verslag van de zaadopbrengst, 1000-korrelgewicht, de gehalten en de carvonopbrengst. CPRO-DLO Intern verslag, 5 pag..
9. H.Toxopeus en J.H.Lubberts, 1994. Vergelijkende opbrengstproeven met zomerkarwij: 1993. Voorlopig verslag van opbrengst en gehalten. CPRO-DLO Intern verslag, 2 pag..
10. H.Toxopeus, J.H.Lubberts, en W.Neervoort, W.Folkerts en G.Huisjes, 1994. Breeding research and in-vitro propagation to improve carvone production of caraway (*Carum carvi* L.). Voor: Industrial Crops and Products. (In voorbereiding).
11. H.Toxopeus en J.H.Lubberts, 1994. Karwijveredelingsonderzoek. Poster. Afsluiting van het nationale karwijprogramma op 2 juni 1994.

Bestedingen personele capaciteit en materieel 1993.

PERSONEEL

Noot: 1 manjaar (mj) = 200 mandagen (mnd)

| | Begroot mnd | Gerealiseerd mnd |
|--------------------------|----------------|---------------------|
| <u>Eigen aandeel</u> | | |
| Onderzoekleiding) | | |
| schaal 12) | | 28 |
|) 0,6 mj | 120 | 188 |
| Assistentie) | | |
| schaal 5-7) | | 160 |
| <u>Programma aandeel</u> | | |
| Onderzoekleiding | | |
| schaal 12 (1,0 mj) | 200 | 194.5 |
| Assistentie | | |
| schaal 9 (0,8 mj) | 160 | 130 |
| <u>Totaal Personeel</u> | 480 | 512.5 |

MATERIEEL

| | | | |
|--------------------------|-----------|-----------------------------------|-----------------|
| <u>Eigen aandeel</u> | f. 25.000 | kantoorkosten | f. 21.000 * |
| | | gehaltebepalingen | f. <u>9.000</u> |
| | | subtotaal | f. 30.000 |
| <u>Programma aandeel</u> | f. 35.000 | proefvelden en kasruimte | f. 10.150** |
| | | NIR apparatuur | f. 22.000 |
| | | stagiare, onkosten | f. 4.500 |
| | | conferentie Industrial Crops Pisa | f. 2.400 |
| | | kms verrezen in Nederland: | |
| | | -met dienstauto 7000 @ 44 ct | f. 3.080 |
| | | diversen | f. 900 |
| | | subtotaal | f. 43.030 |
| <u>Totaal Materieel</u> | f. 60.000 | | f. 73.030 |

* voor onderzoeker en medewerker f 10.500

** proefveldgrond: 50 are @ f 12 = f 600
 platte bak: 20 m @ f 35 = f 700
 verwarmde kas 150m @ f 118
 voor een 1\2 jaar = f 8.850
 f 10.150

Schatting van bestedingen personele capaciteit en materieel 1994.

Noot: het projekt begon voor alle posten op 1.6 1990, behalve voor de onderzoekleiding in het 'Programma aandeel', die op 1.9.'90 begon. Gezien de duur van het projekt van 4 jaar lopen alle posten door tot 31 mei '94 (5 maanden: 5/12e fte), behalve voor de onderzoekleiding, die tot 31.8 '94 geboekt staat (8 maanden: 8/12e fte).

PERSONEEL (1 manjaar (mj) = 200 mandagen (mnd))

| | Begroot mnd | Gerealiseerd mnd |
|--|----------------|---------------------|
|--|----------------|---------------------|

Eigen aandeel

| | | |
|--------------------------|----------------|----|
| Onderzoekleiding) | | |
| schaal 12) | | |
|) | 0,6(x5/12e mj) | 50 |
| Assistentie) | | |
| schaal 7) | | |

Programma aandeel

| | | |
|-------------------------|-------|-----|
| Onderzoekleiding | | |
| schaal 12 (8/12e mj) | 133.4 | 160 |
| Assistentie | | |
| schaal 9 (0,8x5/12e mj) | 40 | 40 |

| | | |
|-------------------------|-------|-----|
| <u>Totaal Personeel</u> | 223.4 | 250 |
|-------------------------|-------|-----|

MATERIEEL

| | | | |
|----------------------|----------|-------------------|------------|
| <u>Eigen aandeel</u> | f 10.000 | kantoorkosten | f 11.375 * |
| (f. 25.000 x 5/12) | | gehaltebepalingen | f 5.000 |
| | | subtotaal | f 16.375 |

| | | | |
|--------------------------|----------|----------------------------|---------------|
| <u>Programma aandeel</u> | f 15.000 | proefvelden en kasruimte | f 1.060 ** |
| | | bijdrage NIR apparatuur | f 5.000 |
| | | bepalingen RIKILT-DLO | f 6.000 |
| | | Reizen in NL en Duitsland, | ca. 6000 kms, |
| | | inclusief overnachtingen | f 6.000 |
| | | diversen | f 500 |
| | | subtotaal | f 18.560 |

| | | | |
|-------------------------|----------|--|----------|
| <u>Totaal Materieel</u> | f 25.000 | | f 34.935 |
|-------------------------|----------|--|----------|

* voor onderzoeker en medewerker resp. 8/12 x f 10.500 = f 7.000
 en 5/12 x f 10.500 = f 4.375
 subtotaal = f 11.375

** proefveldgrond: 30 are @ f 12 = f 360
 platte bak: 20 m @ f 35 = f 700
 subtotaal = f 1060

5.2 De invloed van gewasopbouw en omgevingsfactoren op de productie en kwaliteit van karwijzaad



ab-dlo

**DLO-Instituut voor Agrobiologisch en
Bodemvruchtbaarheidsonderzoek
(AB-DLO)**

Bornsesteeg 65, Postbus 14, 6700 AA Wageningen
Oosterweg 92, Postbus 129, 9750 AC Haren



ab-dlo

Projectverslag 1990-1994

DLO-Instituut voor Agrobiologisch en Bodemvruchtbaarheids- onderzoek

- | | |
|----------------------|--|
| 1. Projecttitel | De invloed van gewasopbouw en omgevingsfactoren op de productie en kwaliteit van karwijzaad |
| 2. Projectleiding | H.J. Bouwmeester, W.J.M. Meijer |
| Medewerkers | H. Smid, J. Davies, M. Wijlhuizen I.F. Kappers A-M. Kuijpers, M. Verberne, E. Loman, J. van Strien, A.S.A. Welten |
| 3. Samenwerking met | CPRO-DLO, PAGV, ATO-DLO, Van Hall Instituut, Vakgroep Plantenfysiologie LUW |
| 4. Doelstelling | Het verkrijgen van inzicht in de factoren die bij karwij de zaadproductie en gehalte en samenstelling van de etherische olie bepalen |
| 5. Onderzoeksverslag | 5.1 Samenvatting 5.2 Inleiding 5.3 Methoden 5.4 Resultaten 5.5 Conclusies |

5.1 Samenvatting

Om een rendabele karwijteelt in Nederland mogelijk te maken zijn, naast nieuwe toepassingen voor het karwijzaad en/of de etherische olie uit het zaad, een hoog en stabiel opbrengstniveau van belang. Bij de start van het Karwij Onderzoeksprogramma was er sprake van grote variaties in zaadopbrengst en etherische-oliegehalte en er leek zelfs een negatieve trend in het etherische-oliegehalte ten opzichte van het begin van deze eeuw te bestaan. Vergelijking van het, via stoomdestillatie bepaalde, gehalte van zaadmonsters van praktijkpercelen van boeren uit een aantal recente jaren met een gaschromatografische bepaling van dezelfde monsters op het AB liet zien dat de veronderstelde negatieve trend in het etherische-oliegehalte samenhangt met de minder volledige stoomdestillatiemethode die in de laatste jaren is gebruikt. Een analyse van literatuur- en praktijkgegevens liet zien dat de variaties in zaadopbrengst en etherische-oliegehalte zowel tussen bedrijven als tussen jaren optraden. Dit geeft aan dat respectievelijk teeltgebonden parameters en weersfactoren een rol spelen bij het ontstaan van de fluctuaties. Het AB-onderzoek heeft zich vooral op de rol en het mechanisme van de effecten van het weer gericht.

Dat onderzoek laat zien dat licht een belangrijke rol speelt bij het succes van de karwijteelt. Er blijkt een goede correlatie te bestaan tussen de hoeveelheid licht tijdens de bloei en de zaadzetting en daarmee de zaadopbrengst. Bestuiving is belangrijk, maar blijkt onder veldomstandigheden niet beperkend te zijn doordat zowel insecten als wind daarin bijdragen. De omstandigheden voor de bloei lijken - uiteraard binnen bepaalde grenzen - veel minder invloed te hebben op de zaadopbrengst. Onder optimale omstandigheden vindt de zaadvulling vooral plaats met ná de bloei gefixeerde koolstof. Toch leidt lichtreductie na de bloei niet tot een sterke opbrengstvermindering, waarschijnlijk doordat in dat geval reservekoolhydraten beter benut worden.

Het etherische-oliegehalte is de resultante van vorming van die olie en verliezen. Verliezen als gevolg van vervluchtiging van etherische olie lijken tijdens de teelt niet erg groot (<2%) te zijn, maar beschadigingen als gevolg van het dorsen kunnen leiden tot verliezen door vervluchtiging van circa 10-15%. Voor de vorming van etherische olie is de assimilatenbeschikbaarheid van belang. Lichtreductie leidde tot een verminderde olievorming en verwijderen van concurrerende schermen tot een stijging. Met behulp van *in vitro* experimenten werd de relatie tussen sucrose en carvon- en limoneenvorming aangetoond. Naast een effect op de totale hoeveelheid blijkt het assimilatenaanbod ook de verhouding tussen carvon en limoneen te beïnvloeden. Hoe hoger het assimilatenaanbod is hoe hoger de carvon/limoneen ratio. De resultaten geven aan dat vooral de bloeiperiode en de eerste weken van de zaadvulling van belang zijn voor de carvonopbrengst en dat lijkt dan ook de periode waarin met behulp van teeltmaatregelen en veredeling de meeste winst is te behalen. De plasticiteit van de carvon/limoneen verhouding suggereert dat ook daarin met behulp van veredeling en fysiologisch/biochemisch onderzoek verbetering is te verkrijgen.

5.2 Inleiding

Om een rendabele teelt van karwij in Nederland mogelijk te maken is het, naast het vinden van nieuwe toepassingen voor het produkt, nodig te komen tot een hoog en stabiel opbrengstniveau. Als de nieuwe toepassingen met name carvon betreffen geldt dat natuurlijk vooral voor de carvonopbrengst. Bij de start van het AB-project waren de grootste problemen dat de zaadopbrengsten sterk fluctueerden en dat het etherische-oliegehalte naast eveneens sterke fluctuaties, een dalende trend leek te vertonen, dat wil zeggen vroeger (eerste helft van

deze eeuw) hoger was dan nu. De variërende zaadopbrengsten en oliegehaltes zorgden samen voor zeer wisselende etherische-olieopbrengsten en daarmee voor fluctuerende carvonopbrengsten.

Het project beoogde dan ook te bepalen welke factoren verantwoordelijk zijn voor de sterke fluctuaties in zaadopbrengst en etherische-oliegehalte en de dalende trend in dat gehalte. Verder zou het van belang zijn om naast begrip van de regulatie van het totale etherische-oliegehalte ook inzicht te hebben in de sturing van de kwaliteit van de etherische olie, met andere woorden het carvongehalte.

5.3 Methodes

Om vast te stellen hoe groot de fluctuaties in opbrengstbepalende factoren waren en of er inderdaad een negatieve trend in het etherische-oliegehalte bestond werden gegevens uit de literatuur en de praktijk geanalyseerd. Een betrouwbare en snelle meetmethode voor limoneen en carvon werd ontwikkeld in samenwerking met het RIKILT-DLO (Bouwmeester & Kuijpers, 1993). Daarnaast is op het AB een methode ontwikkeld om ook de enantiomeren van carvon en limoneen [de (+)- en de (-)-vorm] te scheiden en te kwantificeren (Bouwmeester *et al.*, in prep).

Het eigenlijke onderzoek is op drie niveaus uitgevoerd, te weten gewas (veldproeven), plant (kasproeven) en orgaan (*in vitro* cultuur van de bloemschermen). De zaadopbrengst bepalende factoren zijn vooral in gewas- en plantexperimenten onderzocht, de sturing van het etherische-oliegehalte in alle drie de types experimenten. De veldproeven zijn uitgevoerd met eenjarige karwij, ras 'Karzo' en voorgangers van dat ras, geleverd door het CPRO-DLO en met het tweejarige ras 'Bleija'. De proeven zijn uitgevoerd op zowel zandgrond (proefboerderij Droevendaal) als kleigrond (proefboerderij De Bouwing). Bestrijding, bemesting en irrigatie werden uitgevoerd indien nodig, zodanig dat geen water- en mineralentekort optraden en ziektes en plagen werden onderdrukt (voor meer details zie Bouwmeester & Smid en Bouwmeester *et al.*, in prep). De kasproeven zijn uitgevoerd met dezelfde rassen. In het geval van kasexperimenten met 'Bleija' werden wortels van het veld gehaald en opgepot. Dergelijke proeven konden daarom alleen in de periode januari-april worden ingezet. De opgepotte wortels moesten met een fungicide worden behandeld om schade door *Mycocentrospora* te voorkomen. Na oppotten stonden de planten eerst gedurende circa 2 weken bij circa 12°C om het aanslaan te vergemakkelijken. De opgroeicondities waren 18/14°C (14h/10h) met van circa september-april bijbelichting gedurende de 18°C-periode. Het *in vitro* werk is gedaan met schermen van eenjarige karwij, die in de kas werd opgekweekt. Tweede orde schermen werden met de hand bestoven en enkele dagen later op een *in vitro* medium met een reeks sucroseconcentraties geplaatst. De schermen werden in een klimaatcel geplaatst bij 20°C. Bij inzetten van de schermen en na 7 dagen op medium werden carvon- en limoneengehalte bepaald (voor details zie Kappers & Bouwmeester, in prep.).

Het produkt van karwij wordt meestal 'zaad' genoemd hoewel het een vrucht is. In dit verslag wordt met 'zaad' het landbouwkundig produkt bedoeld, dat wil zeggen de helft van de dubbele dopvrucht. Wanneer over 'vrucht(je)' wordt gesproken wordt de hele vrucht bedoeld, die dus twee zaden bevat.

5.4 Resultaten

5.4.1. Literatuur en praktijkgegevens

De praktijkgegevens in Tabel 1 vormen een goede illustratie van de grote variaties in zowel zaadopbrengst als etherische-oliegehalte. De verschillen tussen bedrijven kunnen erg groot zijn. In een gemiddeld jaar als 1988 was het gemiddelde van de drie hoogste zaadopbrengsten circa 25% hoger en van de drie laagste opbrengsten circa 22% lager dan de gemiddelde opbrengst. Deze verschillen moeten veroorzaakt zijn door verschillen in bijvoorbeeld de stand van het gewas, aantasting door pathogenen en oogstverliezen en moeten voorkomen kunnen worden door teeltonderzoek en intensieve voorlichting. Iets dergelijks geldt voor het etherische-oliegehalte hoewel de variatie daarin kleiner is dan in de zaadopbrengst: gemiddeld +10 en -11% over de vermelde 6 jaar. Mogelijk zijn voor deze variatie tussen bedrijven factoren als bemesting, standdichtheid en oogstwijze van belang (zie voor literatuur Bouwmeester 1991b). Ook wat betreft het etherische-oliegehalte zouden teeltonderzoek en voorlichting moeten kunnen leiden tot een stabilisering.

Tabel 1. Opbrengsten en etherische oliegehaltes van karwijtelers uit Groningen (varierend van 7 tot 18 per jaar). Zowel het gemiddelde van alle bedrijven als het gemiddelde van de drie hoogste en de drie laagste is berekend. De afwijking van deze laatste twee ten opzichte van het totaal gemiddelde is ook als percentage berekend.

| Jaar | Zaadopbrengst, kg/ha | | | | | Etherische-oliegehalte, % | | | | |
|------|----------------------|------|------|--------------------|-----|---------------------------|------|------|--------------------|-----|
| | Gem | Hoog | Laag | Afwijking van gem. | | Gem | Hoog | Laag | Afwijking van gem. | |
| | | | | | % | | | | | % |
| 1985 | 1581 | 2146 | 988 | 35 | -38 | | | | | |
| 1986 | 2431 | 2828 | 1936 | 16 | -20 | 3.45 | 3.70 | 3.07 | 7 | -11 |
| 1987 | 772 | 923 | 634 | 19 | -18 | 2.79 | 3.10 | 2.57 | 11 | -8 |
| 1988 | 1638 | 2051 | 1279 | 25 | -22 | 3.02 | 3.43 | 2.60 | 14 | -14 |
| 1989 | 1994 | 2438 | 1487 | 22 | -25 | 3.88 | 4.20 | 3.43 | 8 | -12 |
| 1990 | 1360 | 1633 | 1146 | 20 | -16 | 3.59 | 4.03 | 3.10 | 12 | -14 |
| 1991 | 872 | 938 | 807 | 8 | -8 | 2.73 | 2.97 | 2.50 | 9 | -8 |
| Gem | 1521 | 1851 | 1183 | 21 | -21 | 3.24 | 3.57 | 2.88 | 10 | -11 |

Bestuiving. Het verschijnsel van de onvolledige, mannelijke bloemetjes is ook bij karwij geanalyseerd. Het percentage onvolledige bloemetjes neemt toe met de schermorde, is hoger in de centrale scherpjes van een scherm en is hoger bij een hoge plantdichtheid. Voor een groot deel kan dit verklaren waarom er bijvoorbeeld in de hogere orde schermen of bij een hogere plantdichtheid per scherm minder zaden worden gevormd.

Ook tussen de jaren is er echter grote variatie. In 1986 was de gemiddelde zaadopbrengst meer dan drie keer zo hoog dan in 1987. Deze verschillen worden waarschijnlijk voor het grootste deel door het weer veroorzaakt, mogelijk zowel in het eerste als in het tweede teeltjaar. Ook voor het etherische-oliegehalte geldt een jaareffect: het hoogste gemiddelde gehalte (1989) is circa 40% hoger dan het laagste (1991). Deze verschillen worden - net als bij de zaadopbrengst - waarschijnlijk door weersinvloeden bepaald. Aannemelijk is dat dit effect vooral in de periode

van de zaadzetting tot de oogst optreedt wanneer de etherische olie wordt gevormd. Een verdere indicatie dat het weer inderdaad een rol speelt bij zowel de bepaling van de zaadopbrengst als het etherische-oliegehalte kwam uit de correlaties die werden gevonden tussen enkele weersfactoren en praktijkgegevens (Toxoepus & Bouwmeester, 1993).

De in de inleiding genoemde negatieve trend in het etherische-oliegehalte vanaf het begin van de eeuw is waarschijnlijk te wijten aan een veranderde bepalingsmethode. Analyses door middel van stoomdestillatie werden vergeleken met gehalten door Zijlstra (1915, 1940) met een aangepaste methode Beckmann bepaald (Zijlstra, 1915). Opnieuw met de gaschromatograaf meten van monsters uit 1990 en 1991 die met stoomdestillatie waren geanalyseerd leverde gemiddeld een circa 30% hoger gehalte op. Het ongewoon hoge carvongehalte van de stoomdestillaten is daar mede een aanwijzing voor: het geeft aan dat niet alle limoneen, maar wel alle carvon is afgedestilleerd (Koedam, 1982). Correctie naar een meer gebruikelijk carvongehalte leverde over de jaren 1986-1992 een gemiddeld etherische-oliegehalte van 4.1%, vrijwel exact gelijk aan het gemiddelde van 4.0% over een reeks jaren vóór 1940.

Omdat de variatie tussen bedrijven grotendeels door middel van teeltmaatregelen moet kunnen worden opgelost, is het AB-onderzoek vooral gericht op de effecten van weersomstandigheden.

5.4.2 Regulatie van de zaadopbrengst

De uitgangspunten van dit deel van het onderzoek waren dat de zaadopbrengst in principe op drie manieren zou kunnen worden beperkt:

- (1) door de hoeveelheid bloemen/vruchtbeginsels
- (2) door de bestuiving/bevruchting
- (3) door de vulling

Uit literatuurgegevens over experimenten met karwij bleek dat de zaadvulling slechts in beperkte mate varieert. Van 1933 tot 1938 was het gemiddelde 1000-kg 3,3 g (SD 12%) (Zijlstra, 1940). Die spreiding van 12% zou een gevolg van weersinvloeden op de vulling kunnen zijn, maar in 1968 werd op zeven lokaties een gemiddeld 1000-kg van 3,2 g (SD 13%) gevonden (Bernelot Moens et al., 1973), wat een aanwijzing zou kunnen zijn dat de variatie door teeltgebonden factoren wordt veroorzaakt. Uit de gegevens in beide genoemde artikelen valt te berekenen dat het aantal zaden/m² sterker varieerde: in 1968 45.000/m² (SD 21%) en van 1933-38 37.000/m² (SD 58%!)). Deze laatste standaard afwijking geeft aan dat er grote jaarverschillen zijn in het aantal bloemetjes of in de bevruchting/abortie van die bloemetjes.

Dat het aantal bloemetjes/vruchtbeginsels niet de beperkende factor is blijkt onder andere uit twee waarnemingen. (i) Bij een ongeveer dezelfde hoeveelheid droge stof in de bloemschermen bij het begin van de bloei van de tweede orde (1991: 70 g/m², 1992: 90 g/m²) kunnen zeer grote verschillen in zaadopbrengst optreden (1991: 193 g/m², 1992: 496 g/m²). (N.B. dit waren teelten zonder dekvrucht en de zaden zijn met de hand geoogst, vandaar de opbrengst van bijna 5000 kg/ha in 1992). Of *vice versa* bij eenjarige karwij een relatief groot verschil in investering in de schermen (1990: 65 g/m², 1991: 40 g/m²) ten opzichte van vrijwel gelijke zaadopbrengsten (1990: 265 g/m², 1991: 280 g/m²) (zaden met de hand geoogst). Uit de getallen blijkt dat er geen relatie is tussen de hoeveelheid bloemen en de zaadopbrengst. Dit wordt bevestigd door waarneming (ii). Bij het scoren van de zaadzetting blijkt slechts een zeer gering deel van alle bloemetjes (<20%) een vruchtje te leveren.

Hierbij kunnen drie factoren een rol spelen:

- (1) andromonoecie. Het bij alle Umbelliferen optredende verschijnsel dat tweeslachtige bloemetjes (mannelijk én vrouwelijk) en mannelijke bloemetjes aan één plant voorkomen. Mannelijke bloemetjes kunnen geen vrucht vormen. Zelfbestuiving binnen een (tweeslachtig) bloemetje is bij Umbelliferen onmogelijk door protandrie (Zijlstra, 1915).
- (2) bestuiving. Als tweeslachtige bloemetjes niet worden bestoven kan er geen zaadje worden gevormd.
- (3) abortie. Een bestoven/bevrucht bloemetje kan door abortie verloren gaan.

Bestuiving. Het verschijnsel van de onvolledige, mannelijke bloemetjes is ook bij karwij geanalyseerd. Het percentage onvolledige bloemetjes neemt toe met de schermorde, is hoger in de centrale scherpjes van een scherm en is hoger bij een hoge plantdichtheid. Voor een groot deel kan dit verklaren waarom er bijvoorbeeld in de hogere orde schermen of bij een hogere plantdichtheid per scherm minder zaden worden gevormd.

Bij nauwkeurig observeren blijkt echter ook een deel van de volledige bloemetjes niet uit te groeien tot een vruchtje. Dat zou een gevolg kunnen zijn van onvolledige bestuiving. Het belang van bestuiving bleek erg duidelijk uit experimenten met gewaskooien waardoor insecten niet bij de bloeiende karwij konden komen. Fig. 1A laat resultaten zien van een dergelijk experiment. De kooien werden vergeleken met afdakjes van het zelfde gaasmateriaal om het effect van minder licht en de afwezigheid van insecten te kunnen onderscheiden. De kooien verlaagden de zaadopbrengst sterk, wat het belang van bestuiving aantoont, maar in diverse veldexperimenten kon de opbrengst niet worden verhoogd met handbestuiving (planten met rijp stuifmeel uit de rand van het proefveld werden over het te bestuiven veldje 'geveegd'). Dit geldt ook voor een experiment in tweejarige karwij (1990/91). In dit gewas bleek niet of nauwelijks zetting in de derde orde op te treden en dit werd door handbestuiving niet verbeterd. Echter verwijderen van de tweede orde schermen in kleine proefveldjes leidde ook

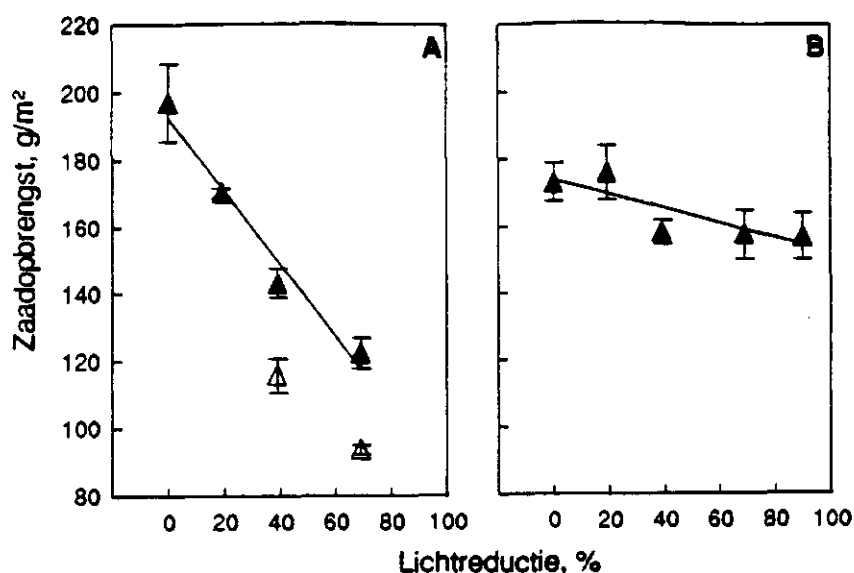


Fig. 1. Effect van beschaduwing (A) tijdens de bloei en (B) na de bloei (dichte symbolen) en van uitsluiting van insecten met behulp van gaaskooien (open symbolen) op de zaadopbrengst van eenjarige karwij. Balkjes geven standaardfout aan (n=4).

niet tot vermindering van de opbrengst, wat aangeeft dat er wel degelijk zaden konden worden gevormd in de derde orde. Het lijkt er dus op dat bestuiving niet beperkend is. Vaak zijn er erg veel insecten aanwezig en bovendien hebben we aangetoond dat de wind bij de bestuiving een rol kan spelen: karwijstuifmeel kon in de lucht in ruime mate worden aangetoond (zie Bouwmeester & Smid, in prep).

Licht. Fig 1A laat ook zien waardoor de zaadopbrengst dan wel wordt beïnvloed: de hoeveelheid licht tijdens de bloei. Een reductie in de hoeveelheid licht met circa 50% leidde tot een ongeveer 30% lagere opbrengst. Deze opbrengstderiving was geheel te wijten aan een vermindering van het aantal zaden, waarschijnlijk doordat bestoven volledige bloemetjes door een gebrek aan licht zijn geaborteerd (Tabel 2). Opmerkelijk is dat er op het moment van de bloei een grote voorraad (reserve)koolhydraten aanwezig is met name in de stengel (Bouwmeester et al., in prep.). Klaarblijkelijk zijn er voor een goede zetting beter beschikbare koolhydraten - direct afkomstig uit fotosynthese - nodig of heeft de lichtreductie een direct negatief effect op de sinksterkte van de bloemetjes/vruchtjes. De resultaten van de experimenten zijn ook toegepast op literatuur- en praktijkgegevens. Mede met behulp van waarnemingen van collega's (Van Roon & Bleijenberg, 1964; Froot, 1988; A. Evenhuis, H. Toxopeus, J. Wander, pers meded) is de hoofdbloeiperiode van tweejarige karwij in 11 verschillende jaren geschat en voor die periode is uit weersgegevens van het weerstation Wageningen de gemiddelde hoeveelheid fotosynthetisch actief licht berekend. Zaadopbrengsten (gegevens CBS en KSC) in die jaren en de gemiddelde lichtintensiteit bleken heel aardig gecorreleerd te zijn (Fig. 2) op dezelfde manier als in Fig. 1A (voor meer details zie Bouwmeester et al., in prep).

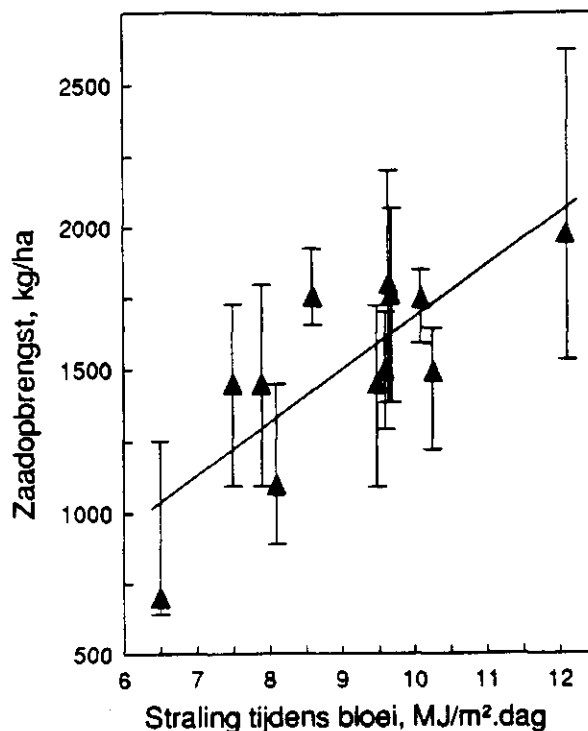


Fig. 2. Relatie tussen licht intensiteit tijdens de hoofdbloei van tweejarige karwij in de praktijk en praktijkopbrengsten. Driehoekjes geven jaarlijkse gemiddelde opbrengst aan. Balkjes geven hoogste en laagste provincie-opbrengst aan. Bronnen: CBS, Karwijstudieclub Karvo.

Tabel 2. Effect van beschaduwten op het aantal zaden/m² en het percentage abortie.

| Schaduw, % | Aantal zaden/m ² | | Abortie, % (1991) | | |
|-------------------------------|-----------------------------|--------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | 1991 | 1992 | 1 ^e Orde | 2 ^e Orde | 3 ^e Orde |
| 0 | 76.000 | 65.000 | 5,6 | 5,3 | 8,5 |
| 19 | | 54.000 | | | |
| 39 | | 46.000 | | | |
| 69 | 64.000 | 43.000 | 8,4 | 17,7 | 22,0 |
| 90 | 43.000 | | 14,4 | 20,5 | 20,3 |
| P _{lineaire relatie} | 0,04 | 0,01 | 0,02 | 0,01 | 0,02 |

In een kasexperiment is tweejarige karwij in verschillende ontwikkelingsstadia gelabeld met ¹³CO₂. Fig. 3 laat enkele resultaten uit dit experiment zien. Wanneer voor de bloei werd gelabeld, bevond zich direct na labelen 80-85% van de opgenomen ¹³C in het blad. Bij de eind oogst bleek een deel van de ¹³C vanuit het blad naar de stengel gerelocceerd te zijn en slechts 10-15% was in het zaad terecht gekomen. Werd aan het einde van de bloei (de vierde orde bloeide nog) gelabeld dan bevond zich direct na labelen de meeste ¹³C al in de stengel en ook circa 35% in de op het moment van labelen aanwezige zaden. Door relocatie liep dit op tot circa 65%. Bij labelen ná de bloei werd het grootste aandeel ¹³C in de zaden gevonden. Het liep op van circa 35% direct na labelen tot 85% van de totale label bij de eind oogst. Ondanks dat onder deze omstandigheden de vulling van de zaden nagenoeg met na de bloei gefixeerde koolstof plaatsvond, bleek de zaadvulling in het veld minder afhankelijk te zijn van externe omstandigheden dan de zaadzetting (Fig. 1B), waarschijnlijk doordat een grote hoeveelheid opslagsuikers aanwezig is, die voor de vulling kan worden aangesproken (zie Bouwmeester et al., in prep). Onder andere omstandigheden (bijvoorbeeld een zeer hoge zaadzetting) zou de hoeveelheid licht tijdens de vulling wellicht belangrijker kunnen zijn.

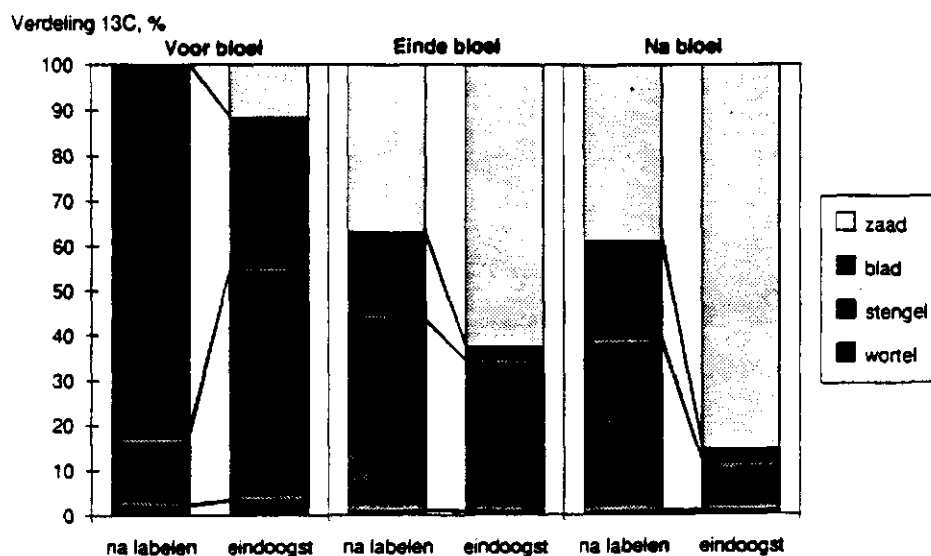


Fig. 3. Verdeling van door labeling met ¹³CO₂ in de plant gefixeerde ¹³C direct na labelen en bij de eind oogst voor drie verschillende labelingstijdstippen.

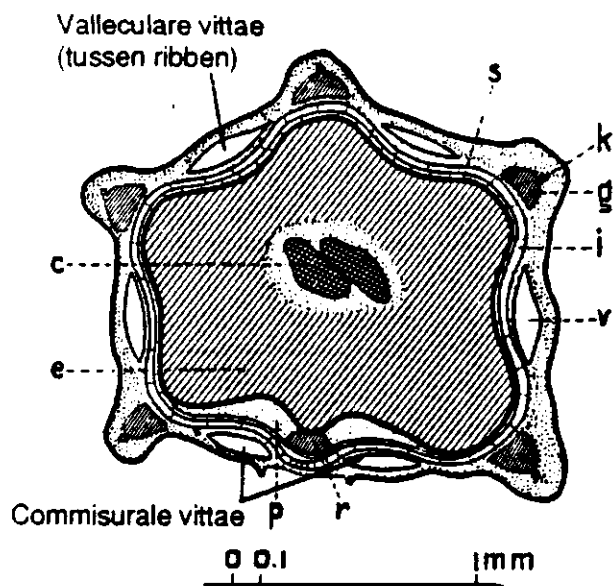


Fig. 4. Dwarsdoorsnede karwijzaad (Zijlstra, 1916).

5.4.3 Regulatie van het etherische-oliegehalte en carvonaandeel

Theoretische beperkingen aan het etherische-oliegehalte. Bij onderzoek naar de regulatie van het etherische-oliegehalte met het doel dit gehalte te verhogen is het van belang te weten of dit doel theoretisch ook haalbaar is. Een belangrijke beperking voor een verdere verhoging van het gehalte zou de grootte van de opslagstructuren kunnen zijn. Hoewel het goed zou zijn een studie aan die opslagstructuren, de *vittae*, met de huidige moderne technieken nog eens te herhalen, heeft Zijlstra al in 1916 een uitgebreide anatomische studie gedaan. De *vittae* of oliestriemen blijken in dwarsdoorsnede ellipsvormig te zijn en vrijwel over de gehele lengte van de vrucht te lopen. Er zijn zes *vittae*, twee zogenaamde commissurale en vier valleculare die verschillen in diameter (Fig. 4). De valleculare oliestriemen zijn ook nog iets korter. Met de maten die Zijlstra noemt is het mogelijk de inhoud van de *vittae* te schatten en daarmee het potentiële gehalte van de vruchtjes (Tabel 3). Als we aannemen dat de oliestriemen 1 mm korter zijn dan het vruchtje (geschat door mijzelf en Zijlstra op 4 mm) dan is het potentiële gehalte 275 µg etherische olie per vruchtje met één zaadje. Zaden uit de praktijk en veldproeven bevatten circa 50-150 µg etherische olie, wat minder is dan het berekende potentiële gehalte zelfs als de *vittae* korter zouden zijn (Tabel 3). Het lijkt er dus op dat er geen morfologische restricties zijn voor een hoger gehalte.

Dit wordt misschien bevestigd door de waarneming van Zijlstra dat de etherische olie soms als losse druppeltjes in de *vittae* zit (die zijn dan dus niet vol), maar het is onduidelijk in hoeverre dit door de gebruikte technieken als fixatie en snijden van de coupes is beïnvloed.

Ondanks dat er geen morfologische restrictie lijkt te zijn, is er wel een positieve relatie tussen zaadgrootte en oliegehalte (Fig. 5). Tweejarige karwij bevat bij een bepaalde grootte meer etherische olie dan eenjarige. Het is niet duidelijk of de relatie een morfologische basis heeft:

Tabel 3. Berekende inhoud van de vittae van karwij voor verschillende lengtes van die vittae en totale inhoud van een vruchtje met één zaad. Doorsnedes van commisurale en valleculeare vittae naar Zijlstra (1916). Inhoud vitta is lengte x p x (0,5 x tang) x (0,5 x rad). 1 mm³ etherische olie is circa 900 µg.

| | | Inhoud, µg etherische olie | | |
|------------------|-----|----------------------------|--------------|------------------------|
| | | Comm. vittae | Vall. vittae | Eén "zaadje" |
| Tangentiaal (µm) | | 260 | 300 | Som (4xvall.+ 2xcomm.) |
| Radiaal (µm) | | 65 | 80 | |
| Lengte (mm) | 2 | 24 | 34 | 183 |
| | 2.5 | 30 | 42 | 229 |
| | 3 | 36 | 51 | 275 |
| | 3.5 | 42 | 59 | 321 |
| | 4 | 48 | 68 | 367 |
| | 4.5 | 54 | 76 | 413 |
| | 5 | 60 | 85 | 459 |
| | 5.5 | 66 | 93 | 504 |
| | 6 | 72 | 102 | 550 |

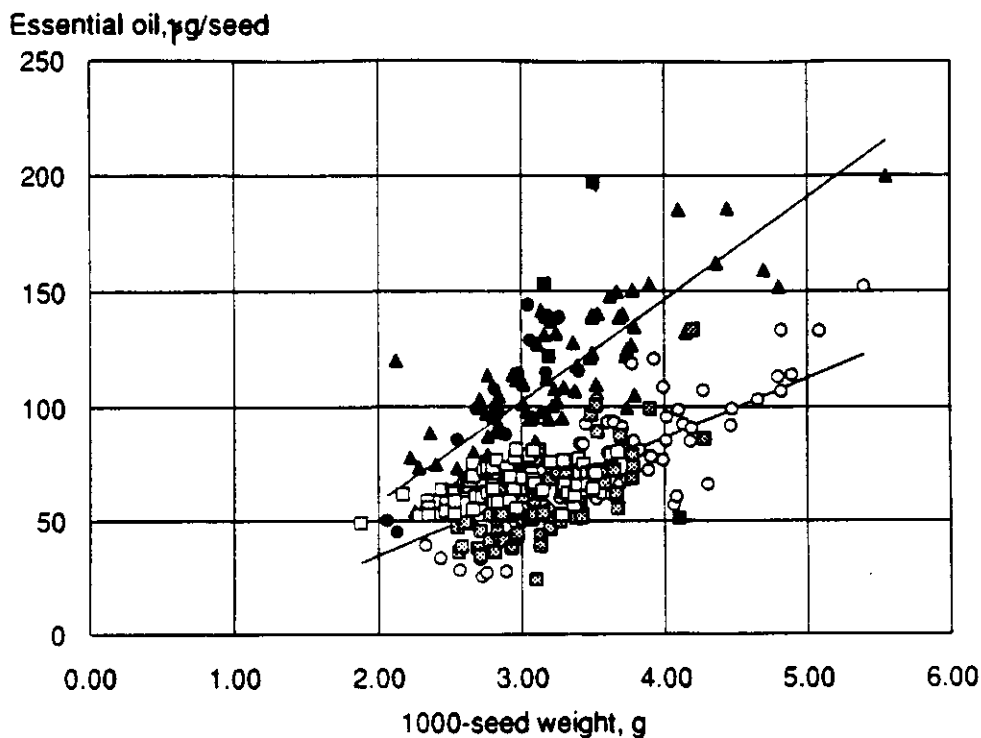


Fig. 5. Relatie tussen zaadgewicht en absolute gehalte etherische olie voor eenjarige (open symbolen) en tweejarige karwij (dichte symbolen). Resultaten uit Zijlstra (1940), praktijk en veldexperimenten.

een groter zaad kan meer etherische olie bevatten, of een fysiologische: een zaad dat harder groeit trekt meer assimilaten aan, waardoor er ook meer etherische olie gevormd kan worden. Het zou interessant zijn te weten waar het verschil tussen een- en tweejarige door wordt veroorzaakt. De relatie in Fig. 5 is in ieder geval vrij ruim. Zo varieert het gehalte bij een 1000-kg van 3 g voor eenjarige tussen 60 ± 30 $\mu\text{g}/\text{zaad}$ en voor de tweejarige tussen ongeveer 100 ± 40 $\mu\text{g}/\text{zaadje}$. Er lijkt dus sowieso ruimte te zijn om het gemiddelde gehalte te verhogen zeker voor de eenjarige.

Meting van het etherische-oliegehalte. Belangrijk voor een goede evaluatie van de proeven is een betrouwbare methode om het etherische-oliegehalte te bepalen. Dit kwam in paragraaf 5.4.1 ook al naar voren bij het verklaren van de veronderstelde negatieve trend in het etherische-oliegehalte, maar is ook belangrijk als naar de kwaliteit/samenstelling van de etherische olie wordt gekeken. Uit diverse experimenten is gebleken dat stoomdestillatie de samenstelling van de etherische olie beïnvloedt (Koedam, 1982; Fleisher & Fleisher, 1988). Dit wordt duidelijk geïllustreerd in Fig. 6. Doordat het polairder is wordt carvon met stoomdestillatie makkelijker geëxtraheerd dan limoneen en hoe korter/onvollediger wordt gedestilleerd hoe hoger het carvongehalte is, doordat er minder limoneen wordt geëxtraheerd. Dit kan leiden tot carvongehaltes van 60-75% (gegevens karwijstudieclub, zie Bouwmeester, 1991b) of zelfs 80% (Fleisher & Fleisher, 1988). Het misleidende is dat een dergelijk hoog carvonpercentage suggereert dat er veel carvon in de etherische olie zit, terwijl er alleen maar weinig limoneen in zit.

Vorming etherische olie in relatie tot ontwikkeling. De vorming van etherische olie is in zowel veld- als kasproeven in zowel een- als tweejarige karwij onderzocht. In Fig. 7 zijn de resultaten te zien van een kasproef met een- en tweejarige karwij, waarbij alleen de tweede orde schermen

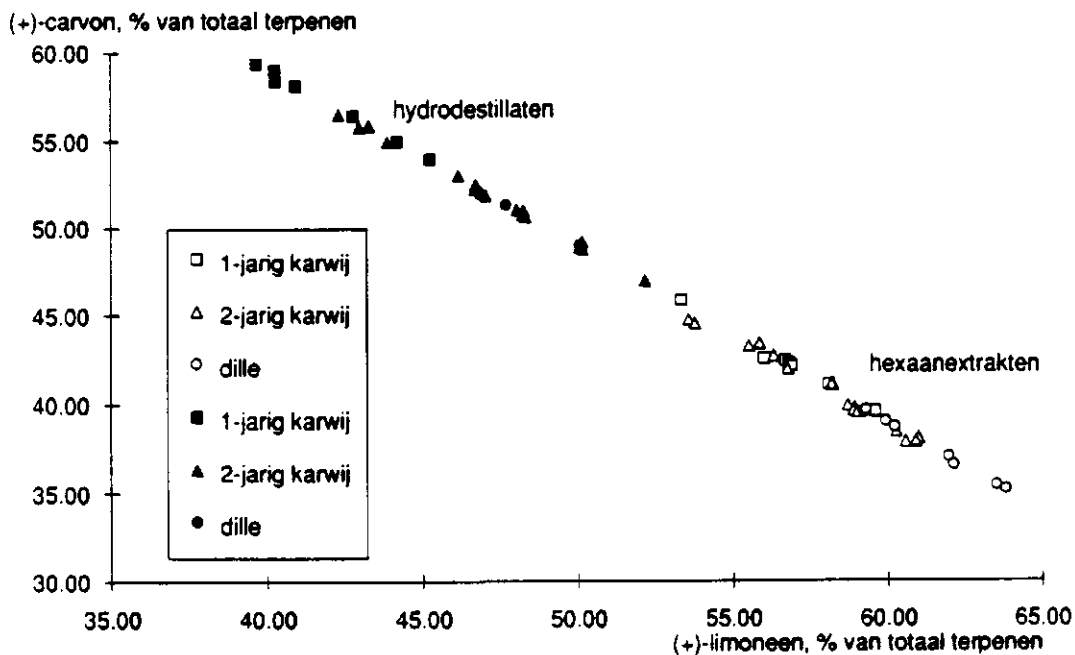


Fig. 6. Relatie tussen limoneen- en carvongehalte (% van piekoppervlak GC) in hexaanextracten en stoomdestillaten.

aan de plant werden gelaten (de rest werd verwijderd). Te zien is dat de limoneenproductie het eerst op gang komt, 1-2 weken later gevolgd door carvon (Fig. 7A-B). In de jonge vruchtjes bereikt het oliegehalte een veel hoger percentage dan dat uiteindelijk in het rijpe zaad wordt gevonden. Opvallend is dat het gehalte in rijp zaad bij een- en tweejarige karwij vrijwel gelijk is, terwijl op het veld de tweejarige altijd een hoger gehalte heeft, en dat de carvon/limoneen verhouding (c/l ratio) vrij hoog is met 1,5 in de eenjarige en 1,8 in de tweejarige (normaal circa 1,0). We komen daar zo op terug. De vruchtjes van de eenjarige karwij waren bijna twee keer zo zwaar als van de tweejarige. Bij een zelfde relatieve gehalte (%) betekent dat dat de vruchtjes van de eenjarige veel meer olie bevatten dan de tweejarige (800 versus 450 $\mu\text{g}/\text{vruchtje}^1$) (Fig. 7C-D). Ook dit zijn zeer hoge waarden en dat heeft ongetwijfeld te maken met het feit dat concurrerende schermen verwijderd waren, zodat er per vruchtje meer assimilaten beschikbaar waren. Het opvallende is dat als de etherische-olie-accumulatiesnelheid ($\mu\text{g}/\text{vruchtje}.\text{dag}$) per mg

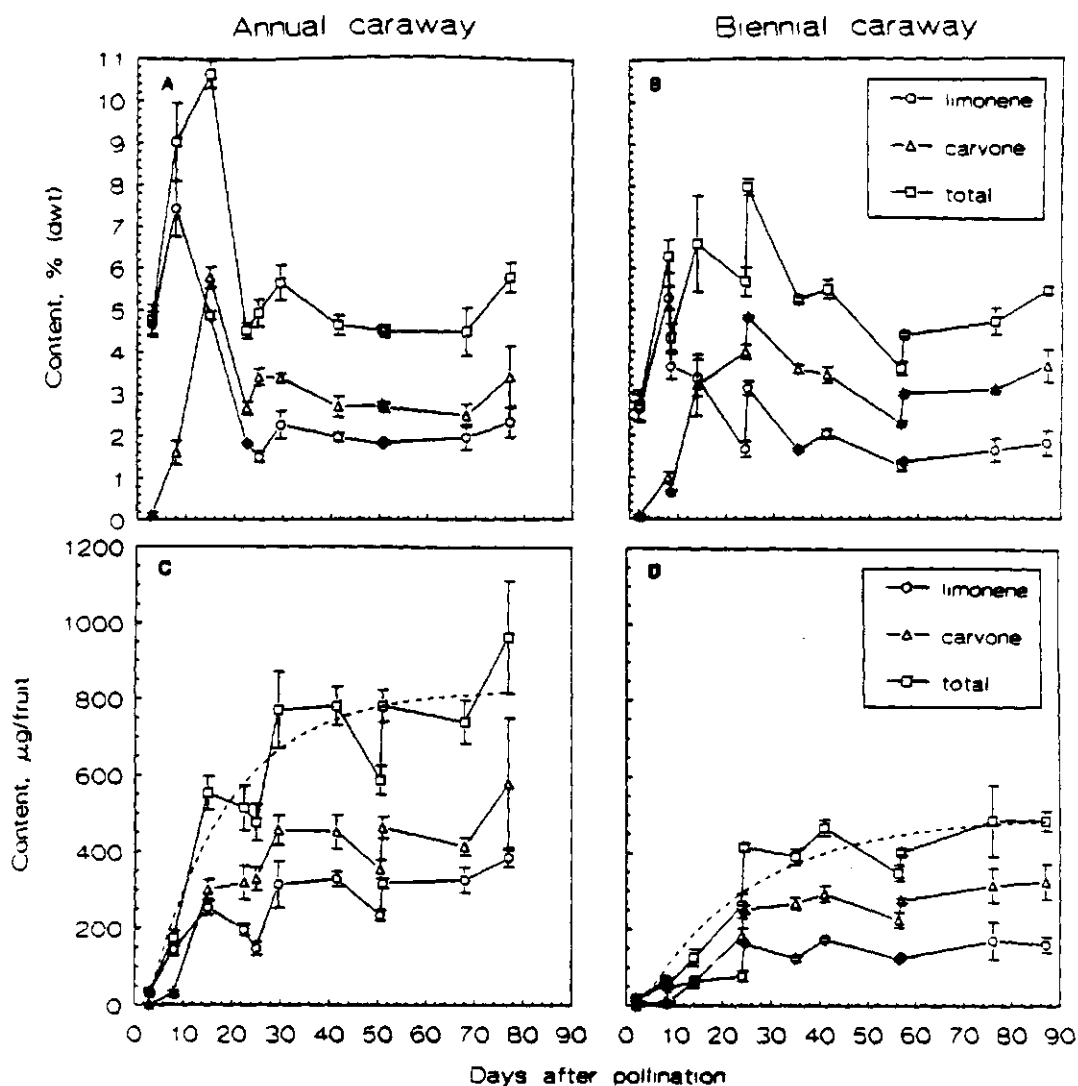


Fig. 7. Gehaltes limoneen, carvon en de som van die twee van eenjarige (A,C) en tweejarige karwij (B,D), als percentage van het zaadgewicht (A,B) en als absoluut gehalte (C,D) in afhankelijkheid van ontwikkelingsstadium (dagen na bestuiven). Balkjes geven standaardfout aan (n=2).

¹ een vruchtje bestaat uit twee zaden!

in de plant aanwezige koolhydraten voor een- en tweejarige karwij wordt uitgezet, de twee grafieken op elkaar vallen (Fig. 8). Dit is een aanwijzing dat de vorming van de etherische olie bepaald wordt door de hoeveelheid beschikbare assimilaten. In veldproeven waren de absolute gehalten etherische olie veel minder hoog. Vruchtjes van een- en tweejarige karwij hadden in proeven in 1992 een gehalte van circa 250 µg/vruchtje. Doordat de vruchtjes van eenjarige karwij net als in de kas ook op het veld zwaarder waren dan van de tweejarige was het gehalte (%) van de eenjarige lager (3-4 versus 5-6%). Uit de kasproef blijkt dat eenjarige karwij zeker wel de potentie heeft om een flinke hoeveelheid etherische olie te maken (net zo veel of zelfs meer dan de tweejarige), maar omdat de vruchtjes zwaarder worden is het relatieve gehalte in het algemeen lager. Dit betekent dat de eenjarige een ongunstigere koolstofallocatie heeft: in vergelijking met tweejarige karwij steekt de eenjarige relatief meer energie in andere componenten van het zaad dan in etherische olie.

Carvon/limoneen ratio. Wanneer schermen op verschillende tijdstippen na bestuiving van de plant werden gehaald en op een reeks sucroseconcentraties geplaatst bleek dat (i) hele jonge vruchtjes bij voldoende sucrose-aanbod *in vitro* al carvon kunnen accumuleren terwijl dat aan de plant dan nog niet gebeurt en (ii) dat er in wat oudere vruchtjes nog steeds limoneen kan worden gevormd, terwijl dat aan de plant dan al niet meer gebeurt. Dit duidt erop dat het productie/opslag systeem voor carvon en limoneen respectievelijk eerder, dan wel langer actief kan zijn als voldoende substraat (=sucrose) aanwezig is dan op grond van metingen aan de plant zou worden verwacht.

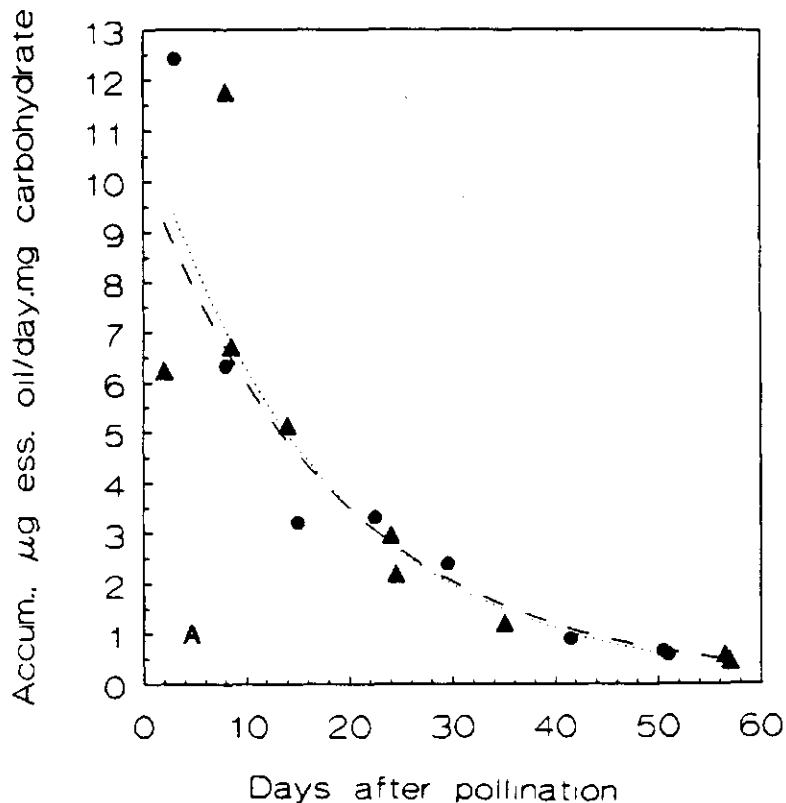


Fig. 8. Accumatiesnelheid van etherische olie per dag per mg beschikbare hoeveelheid koolhydraten in eenjarige (rondjes en stippellijn) en tweejarige karwij (driehoekjes en gebroken lijn).

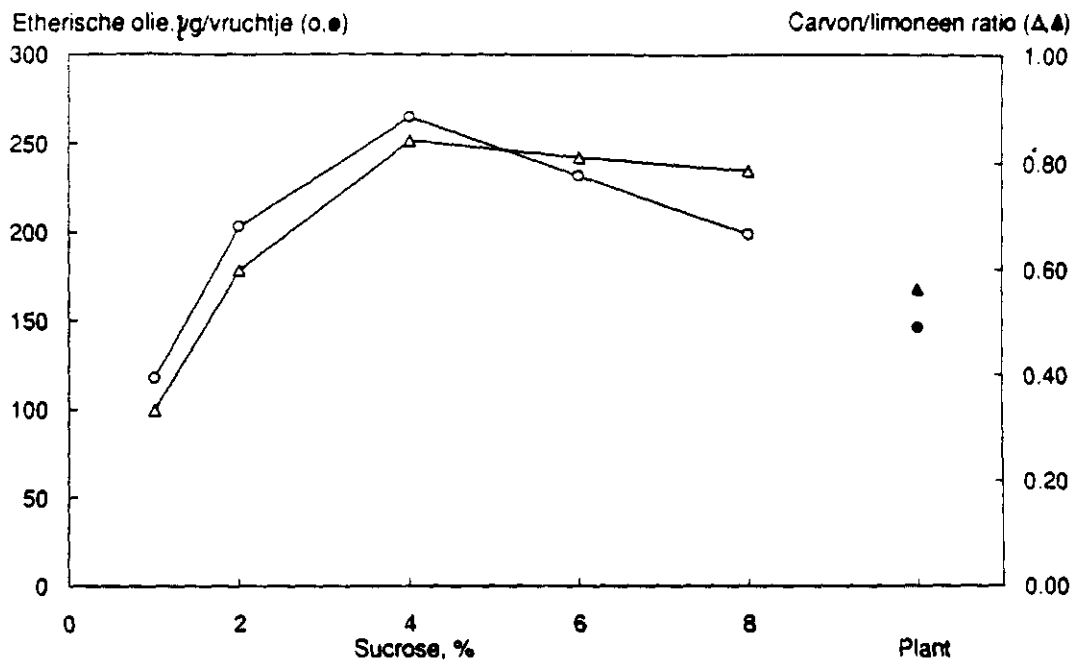


Fig. 9. Effect van sucroseconcentratie in *in vitro* systeem op het gehalte etherische olie en de carvon/limoneen verhouding van eenjarige karwij.

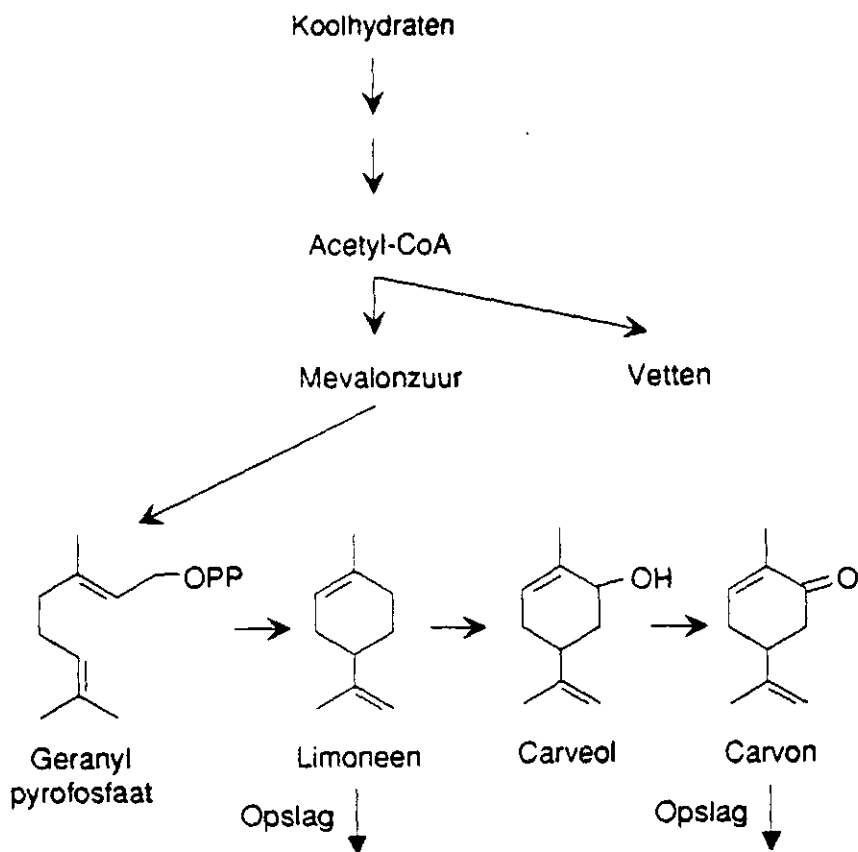


Fig. 10. Vermoedelijke biosyntheseroute van carvon en limoneen.

De *c/l* ratio is in de twee belangrijkste *in vitro* experimenten vrijwel op dezelfde manier afhankelijk van de sucroseconcentratie (Fig. 9). In beide gevallen neemt de ratio toe van circa 0,3 tot 0,8. De toename van de ratio betekent dat bij een hoger sucrose-aanbod er relatief steeds meer sucrose wordt gebruikt om carvon te maken. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat de opslag van limoneen de produktie van limoneen uit geranyl pyrofosfaat (stap 1 in Fig. 10) niet kan bijhouden en dat betekent dat er meer substraat (=limoneen) beschikbaar komt voor de stappen 2 en 3 (Fig. 10), wat uiteindelijk leidt tot een grotere opslag van carvon. De *c/l* ratio aan de plant was in experiment (expt) 1 hoger dan in expt 2 (Fig. 9). Bij benadering was er in expt 1 gemiddeld per vruchtje per dag 53 kJ/m² (bloei in september) en in expt 2 29 kJ/m² straling ingevallen (naast het in beide experimenten aanwezige kunstlicht). Meer invallende straling (=meer assimilaten) gaf dus een hogere *c/l* ratio. Verder verwijzen we nog even terug naar het hiervoor beschreven kasexperiment waar een *c/l* ratio van 1,5 en 1,8 werd gevonden. Van die planten waren concurrerende schermen afgeknipt en de assimilatenbeschikbaarheid voor de etherische-olievorming zou daardoor flink verhoogd kunnen zijn, wat ook weer leidt tot een verhoogde *c/l* ratio. Dit zelfde effect werd tenslotte ook nog in een veldproef aangetoond. Beschaduwning vanaf begin bloei tot oogst veroorzaakte een verlaging van het etherische-oliegehalte van ongeveer 160 naar 80 µg/zaadje en een verlaging van de *c/l* ratio van 1,2 naar 0,8 (Fig. 11).

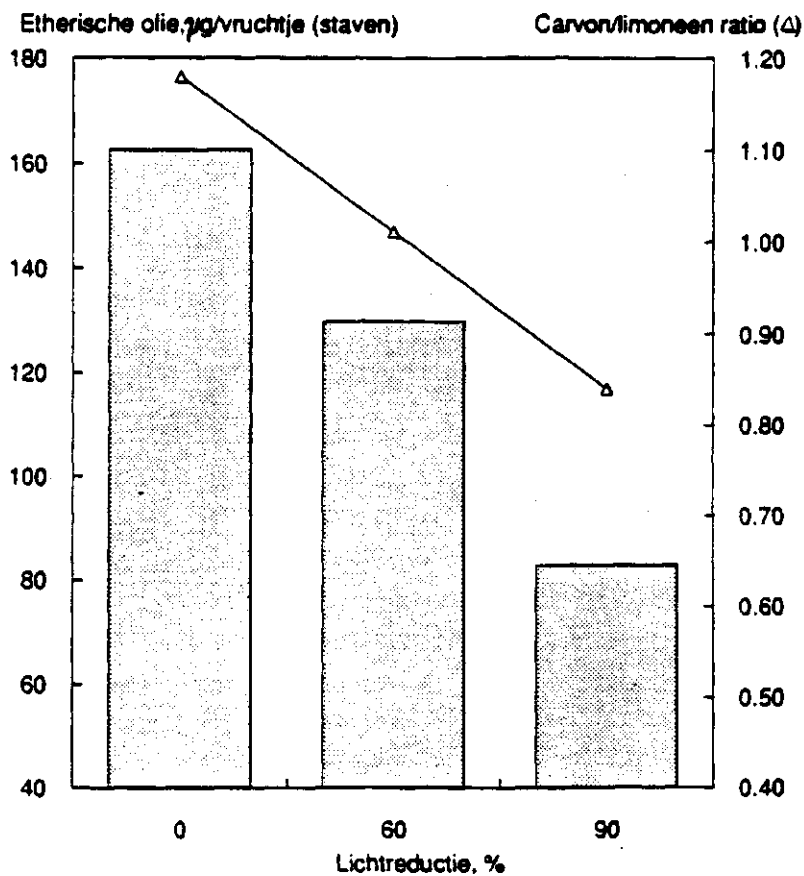


Fig. 11. Effect van lichtreductie van begin bloei tot oogst op het gehalte etherische olie en de carvon/limoneen verhouding van eenjarige karwij in een veldexperiment.

Enantiomeren van carvon en limoneen. Uit het onderzoek op het ATO-DLO is gebleken dat zowel (+)- als (-)-carvon effectief zijn voor de kiemremming van aardappels, maar dat in verband met de nasmaak van de aardappels (+)-carvon meer geschikt is. Van tweejarige karwij en dille is bekend dat die voor vrijwel 100% (+)-carvon bevatten en slechts een zeer geringe hoeveelheid van de (-)-vorm (Ravid et al., 1992). Van eenjarige karwij is dit niet bekend en evenmin - voor alle drie de soorten - of er genetische variatie is voor de hoeveelheid (-)-enantiomeer. Tenslotte was het van belang om voor het toekomstige carvonbiosynthese-onderzoek een meetmethode te ontwikkelen voor de enantiomeren, zodat in enzymstudies de (+)- en (-)-produkten kunnen worden onderscheiden. Van 36 monsters van dille en een- en tweejarige karwij is daarom, in samenwerking met CPRO-DLO, de enantiomere samenstelling gemeten in, als extra factor, zowel hexaanextracten als stoomdestillaten van de monsters. Tabel 4 laat zien dat er geen verschil is in enantiomere samenstelling tussen eenjarige en tweejarige karwij, maar dat dille voor zowel limoneen als carvon een hogere (-)/totaal ratio heeft. Dit duidt erop dat er in dille meer geranyl pyrofosfaat in (-)-limoneen wordt omgezet, wat ook leidt tot meer (-)-carvon dan in karwij (Fig. 10). De (-)/totaal-limoneen verhouding is identiek in hexaanextracten en stoomdestillaten, maar de (-)/totaal-carvon verhouding is in stoomdestillaten hoger dan in de hexaanextracten. Dit is vermoedelijk het gevolg van de hoge-temperatuur condities tijdens stoomdestillatie waardoor mogelijk een deel van het (-)-cis- en trans-carveol, die beide zijn aangetoond, is omgezet in (-)-carvon. Het experiment toont aan dat naast de route van de (+)-enantiomeren zoals aangegeven in Fig. 10, ook de route van de (-)-enantiomeren zoals gevonden in *Mentha spicata* (Gershenzon et al., 1989) in karwij en dille optreedt. De carvonkwaliteit in eenjarige en tweejarige karwij is exact gelijk.

Tabel 4. Enantiomere ratio's in hexaanextracten (H) en stoomdestillaten (S) van dille en een- en tweejarige karwij.

| | (-)/totaal limoneen | | (-)/totaal carvon | | Aantal gemeten monsters | |
|-----------|---------------------|-------|-------------------|-------|-------------------------|-------|
| | Hexaan | Stoom | Hexaan | Stoom | Hexaan | Stoom |
| Eenjarig | 0,56 | 0,55 | 0,46 | 0,60 | 7 | 7 |
| Tweejarig | 0,55 | 0,55 | 0,45 | 0,57 | 16 | 19 |
| Dille | 0,95 | 0,80 | 0,55 | 0,64 | 8 | 2 |

Vervluchtiging etherische olie. Bij het vergelijken van etherische-oliegehalten uit de praktijk en weersgegevens bleek er een negatieve correlatie te bestaan met de windsnelheid tijdens de zaadvulling (Toxopeus & Bouwmeester, 1993) en in een kasexperiment bleek het etherische-oliegehalte van planten die werden blootgesteld aan met ventilatoren opgewekte wind veel lager te zijn dan in controle planten. Beide resultaten zijn niet ondubbelzinnig. In het eerste geval kan er sprake zijn van een schijnrelatie (omdat bijvoorbeeld veel wind samengaat met veel bewolking). In het tweede geval kan ook sprake zijn van remming van de fotosynthese omdat de huidmondjes sneller sluiten. In beide gevallen zou dat gewoon kunnen leiden tot minder produktie in plaats van verlies van etherische olie. Daarom is (in eerste instantie in samenwerking met K. Hartmans ATO-DLO) een methode ontwikkeld om het verlies rechtstreeks te meten. Laboratoriummetingen van de verliezen vertoonden een erg grote variatie tussen planten en ontwikkelingsstadia. Het gemiddelde over een groot aantal metingen was 14 ng carvon en 30 ng limoneen/vruchtje.dag (limoneen vervluchtigt makkelijker). Bij een hoeveelheid van 30.000 vruchtjes/m² en een periode van 50 dagen van begin zaadgroei tot oogst zou dit in het veld neerkomen op een verlies van 210 g carvon en 450 g limoneen/ha, respectievelijk 0,7 en

1,5% van de geschatte opbrengst van 30 kg van beide componenten. Dat is erg weinig, maar wordt mogelijk verhoogd door het effect van wind en temperatuur. Er is ook getracht de verliezen van carvon en limoneen uit het gewas te meten met behulp van polycarbonaat gewaskamers. Echter doordat carvon en limoneen adsorberen aan kunststof en organisch materiaal werden slechts zeer geringe hoeveelheden gemeten, zelfs toen carvon en limoneen na het verwijderen van het gewas in een bekende hoeveelheid in de gewaskamer werden aangebracht.

Vervluchtiging van carvon en limoneen bij de oogst blijkt echter een belangrijke verliespost te zijn. In samenwerking met Johan Wander (PAGV) is een oogstproef uitgevoerd, waarbij karwij en dille met verschillende dorstroommel-omtreksnelheden zijn gedorst. Er was een significante negatieve relatie tussen die omtreksnelheid en het etherische-oliegehalte (Tabel 5). Het hoogste toerental resulteerde in een 10-15% lager gehalte dan de hand-geogoste controle. Er kon worden aangetoond dat dit werd veroorzaakt door vervluchtiging van carvon en vooral van limoneen. Een zeer voorlopige visuele inspectie liet zien dat dit waarschijnlijk wordt veroorzaakt doordat een deel van de zaden is beschadigd tijdens het dorsen. Opmerkelijk is dat het carvonpercentage in de etherische olie ook daalde, wat erop duidt dat er meer carvon dan

Tabel 5. Invloed van de omtreksnelheid van de dorstroommel op het carvon- en limoneengehalte van karwijzaad en het carvonpercentage in de etherische olie (gemiddelde van twee oogsttijdstippen).

| Omtreksnelheid m/s | Limoneen % (dwt) | Carvon % (dwt) | Carvon % in etherische olie |
|---|---------------------|-------------------|--------------------------------|
| 0 | 2.77 | 3.09 | 52.68 |
| 14,1 | 2.61 | 2.88 | 52.48 |
| 17,0 | 2.63 | 2.85 | 51.91 |
| 19,6 | 2.65 | 2.84 | 51.69 |
| 26,7 | 2.61 | 2.78 | 51.64 |
| 33,9 | 2.50 | 2.66 | 51.61 |
| $P_{\text{negatieve lineaire relatie}}$ | <0.001 | <0.001 | 0.005 |

limoneen verloren ging. Carvon heeft een veel geringere dampspanning dan limoneen en uit de vervluchtigingsmetingen bleek ook dat er veel meer limoneen vervluchtigde. Het afnemende carvonpercentage is dus nog niet te verklaren.

5.5 Conclusies en suggesties

Er zijn grote variaties in zaadopbrengst en etherische-oliegehalte tussen bedrijven en jaren, maar de veronderstelde negatieve trend in het etherische-oliegehalte vanaf het begin van deze eeuw hangt samen met de minder volledige stoomdestillatiemethode die in de laatste jaren is gebruikt. Dit laat zien dat het erg belangrijk is om een nauwkeurige en reproduceerbare meetmethode te hebben.

Uit het onderzoek blijkt dat licht een belangrijke rol speelt bij het succes van de karwijteelt. Er blijkt een goede correlatie te bestaan tussen de hoeveelheid licht tijdens de bloei en de zaadzetting en daarmee de zaadopbrengst. Bestuiving is wel belangrijk, maar is onder veldomstandigheden niet beperkend, omdat zowel insecten als wind eraan bijdragen. De omstandigheden voor de bloei lijken - uiteraard binnen bepaalde grenzen - veel minder invloed

te hebben op de zaadopbrengst. Ondanks dat uit labelingsexperimenten blijkt dat de vulling van de zaden onder optimale omstandigheden voor circa 90% met na de bloei gefixeerde koolstof gebeurt, blijkt in veldproeven beschaduwing na de bloei slechts een gering negatief effect op de opbrengst te hebben, waarschijnlijk doordat de vulling kan plaatsvinden vanuit de grote voorraad reservekoolhydraten.

Het etherische-oliegehalte is de resultante van vorming van die olie en verliezen. Verliezen lijken tijdens de teelt niet erg belangrijk, maar onderzoek in samenwerking met het PAGV toont aan dat beschadigingen als gevolg van dorsen wel tot verliezen door vervluchtiging lijden. Voor de vorming van etherische olie is de assimilatenbeschikbaarheid van belang. Lichtreductie leidt tot een verminderde olievorming en verwijderen van concurrerende schermen tot een stijging. Met behulp van *in vitro* experimenten werd de relatie tussen sucrose en carvon- en limoneenvorming aangetoond. Naast een effect op de totale hoeveelheid blijkt het assimilatenaanbod ook de verhouding tussen carvon en limoneen te beïnvloeden. Hoe hoger het assimilatenaanbod is hoe hoger de carvon/limoneen ratio. De resultaten geven aan dat vooral de bloeiperiode en de eerste weken van de zaadvulling van belang zijn voor de carvonopbrengst. Aangezien de hoeveelheid licht in die periode niet is te manipuleren zal geprobeerd moeten worden het gebruik van het beschikbare licht te verbeteren. Te denken valt aan optimaliseren van de teeltwijze (plantverband, stikstof) voor een betere lichtinval in het gewas en aan veredeling op types planten die gunstiger omspringen met het beschikbare licht. Bijvoorbeeld types die tijdens de bloei minder concurrerende groei van hogere orde vertakkingen hebben of hun opgeslagen reservekoolhydraten beter ter beschikking stellen van de zettende zaden. Types, die minder vette olie vormen zouden wellicht meer koolhydraten beschikbaar hebben voor de vorming van etherische olie. Belangrijke winst zou misschien te boeken zijn bij de bloemblaadjes, die een aanzienlijk deel van het invallende licht tegenhouden. Door middel van veredeling kunnen die bloemblaadjes misschien kleiner worden of zelfs verdwijnen (vooropgesteld dat dit geen negatief effect heeft op de bestuiving door insecten). Als de lichtinval in het gewas tijdens de bloei met 20% kan worden verbeterd zou dit een opbrengstverhoging van circa 15% tot gevolg kunnen hebben (Fig. 1). Omdat een deel van de etherische-olievorming al tijdens de bloei plaatsheeft zou dat wellicht ook kunnen leiden tot een hoger etherische-oliegehalte met mogelijk bovendien een betere kwaliteit. Het feit dat de c/l ratio kan worden beïnvloed geeft aan dat daarin wellicht ook mogelijkheden liggen om de carvonopbrengst te verhogen. Het geplande fysiologisch/biochemisch onderzoek aan de carvonbiosynthese zal daarvoor de instrumenten moeten kunnen aandragen.

Ik wil bij deze de collega's van het AB-DLO en ook de personen buiten het instituut, die op wat voor manier dan ook hebben bijgedragen aan de totstandkoming van het resultaat - te veel om allemaal persoonlijk te noemen - hartelijk bedanken voor hun ondersteuning en inzet.

Aangehaalde literatuur

- Bernelot Moens, H.L., J. Kuizenga & G. Liefstingh, 1973. Teelt van karwij. Rapport nr. 8, Proefstation voor de Akkerbouw, Lelystad, 36 pp.
- Fleisher, A. & Z. Fleisher, 1988. The essential oil of annual *Carum carvi* L. grown in Israel. In: Flavors and Fragrances: A World Perspective (Eds. B.M. Lawrence, B. D. Mookherjee, and B. J. Willis). Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, pp. 33-40.
- Floot, H.W.G., 1988. Bestrijding van verbruining in karwij. Proefveldverslag 1987 voor de klei-akkerbouw in Groningen en Friesland, 60-61.

- Gershenzon, J., M. Maffei & R. Croteau, 1989. Biochemical and histochemical localization of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of spearmint (*Mentha spicata*). *Plant Physiology* 89: 1351-1357.
- Koedam, A., 1982. The influence of some distillation conditions on essential oil composition. In: N. Margaris, A. Koedam & D. Vokou (Eds), *Aromatic plants: Basic and applied aspects*, Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, 229-236.
- Ravid, U., E. Putievsky, I. Katzir, V. Weinstein & R. Ikan, 1992. Chiral GC analysis of S(+)- and R(-)-carvone with high enantiomeric purity in caraway, dill and spearmint oils. *Flavour and Fragrance Journal* 7: 289-292.
- Roon, E. van & H.J. Bleijenberg, 1964. Breeding caraway for non-shattering seeds. *Euphytica* 13: 281-293.
- Zijlstra, K., 1915. Over karwij en de aetheriese karwijolie. *Mededeelingen van de Rijks Hoogere Land-, Tuin- en Boschbouwschool* 8, 1-128.
- Zijlstra, K., 1916. Über *Carum carvi* L. In: *Receuil des Travaux Botaniques Néerlandais Vol. 13 (3,4)* (Eds M. W. Beyerinck, H. Heukels, J. W. Moll, E. Verschaffelt, H. de Vries & F. A. F. C. Went). M. de Waal, Groningen, The Netherlands, pp. 159-340.
- Zijlstra, K., 1940. Het verband tussen zichttijd en opbrengst van karwij. *Vereniging tot exploitatie van proefboerderijen in de klei- en zavelstreken van de provincie Groningen. Verslag 1935/39*, 137- 141.

6. Publikaties

Wetenschappelijk

- Bouwmeester, H.J., J. Davies & H. Toxopeus, in prep. Enantiomeric composition of carvone, limonene and carveols in seeds of dill, and annual and biennial caraway varieties.
- Bouwmeester, H.J. & A.-M. Kuijpers, 1993. Relationship between assimilate supply and essential-oil accumulation in annual and biennial caraway (*Carum carvi* L.), *Journal of Essential Oil Research* 5: 143-152.
- Bouwmeester, H.J. & H. Smid. Seed yield in caraway (*Carum carvi* L.). Role of polination. Submitted to *Journal of Agricultural Science (Cambridge)*.
- Bouwmeester, H.J., H. Smid & E. Loman. Seed yield in caraway (*Carum carvi* L.). Role of assimilate availability. Submitted to *Journal of Agricultural Science (Cambridge)*.
- Kappers, I.F. & H.J. Bouwmeester. Effect of sucrose on carvone and limonene accumulation in caraway (*Carum carvi* L.). Submitted to *Phytochemistry*.
- Toxopeus, H. & H.J. Bouwmeester, 1993. Improvement of caraway essential oil production in the Netherlands. *Industrial Crops and Products* 1: 295-301.

Congressen en overig

- Bouwmeester, H.J., 1991a. Karwijzaad. De produktie en het gehalte aan etherische olie. In: N. Vertregt & W.J.M. Meijer (Eds), *Gewasdiversificatie en Agrificatie. Agrobiologische Thema's* 4: 24-36.
- Bouwmeester, H.J. 1991b. Produktie van etherische karwijolie. Een literatuuronderzoek. CABO-DLO verslag nr. 150, 42 pp.
- Bouwmeester, H.J., 1992a. De invloed van gewasopbouw en omgevingsfactoren op de produktie en kwaliteit van karwijzaad. Projectverslag 1991. In: *Onderzoeksprogramma ter verbetering van karwij als akkerbouwgewas en ter introductie van nieuwe afzetmogelijkheden. Verslag 1991* (W.J. Meijer, ed.), 17pp.

- Bouwmeester, H.J., 1992b. Effects of environmental factors on caraway (*Carum carvi* L.) essential oil production. Abstracts 23rd International Symposium on Essential Oils, Auchincruive, September 9-12 1992, Scotland.
- Bouwmeester, H.J., 1993. De invloed van gewasopbouw en omgevingsfactoren op de productie en kwaliteit van karwijzaad. Projectverslag 1992. In: Onderzoeksprogramma ter verbetering van karwij als akkerbouwgewas en ter introductie van nieuwe afzetmogelijkheden. Verslag 1992 (W.J. Meijer, ed.), 14pp.
- Bouwmeester, H.J. & Evenhuis, A. 1991. Karwijteelt en karwijonderzoek in Duitsland en Polen. Verslag van studiereis van 12 mei 1991 t/m 18 mei 1991, 11 pp.
- Bouwmeester, H.J., A-M. Kuijpers & M. Verberne, 1991. Limitation of essential- oil synthesis in caraway seed by assimilate availability. Posterabstract First European Symposium on Industrial Crops and Products, November 1991, Maastricht, The Netherlands.
- Bouwmeester, H.J. & W.J.M. Meijer, 1991. Additieven en pesticiden uit agrarische grondstoffen. Een milieuvriendelijk programma: kansen voor karwij? Spil 95-98: 85-89.
- Bouwmeester, H.J. & W.J.M. Meijer, in press. Yield of caraway and carvone for industrial applications. Proceedings of EC-meeting The production and impact of specialist alternative crops in the rural community, 27-28 April 1993, Brussels, Belgium.
- Bouwmeester, H.J., M. Verberne & M. Wijlhuizen, 1992. Production of essential oil in caraway. Abstracts of International Symposium Phytochemistry and Agriculture (T.A. van Beek, ed.), April 22-24 1992, Wageningen, The Netherlands, p. 75.
- Bouwmeester, H.J., A.S.A Welten, J. van Strien & K.J. Hartmans, 1993. Volatilization of essential oil from caraway. Abstract paper, Abstracts 24th International Symposium on Essential Oils, 21-24 July, Berlin, Germany, p. 25.
- Davies, J.A.R. en H.J. Bouwmeester, 1993. Bepaling van enantiomeren van limoneen en carvon in karwij. CABO-verslag.
- Kappers, I.F. & H.J. Bouwmeester, 1993. Essential oil formation in caraway fruits in relation to development and sucrose availability. Poster abstract, Abstracts 24th International Symposium on Essential Oils, 21-24 July, Berlin, Germany, p. 79.
- Kappers, I.F., M. Verberne & H.J. Bouwmeester, 1992. Effect of sucrose on essential-oil formation in caraway fruits of detached umbels. Abstracts 23rd International Symposium on Essential Oils, September 9-12 1992, Auchincruive, Scotland.
- Kuijpers, A-M., 1991. Het etherische-oliegehalte in zaden van een- en tweejarige karwij (*Carum carvi* L.). Verslag afstudeeropdracht IAH Larenstein, Wageningen, 64 pp.
- Smid, H. & H.J. Bouwmeester, 1993. Effecten van licht en bestuiving op de zaadzetting en oliesyntese van karwij. Proefresultaten 1992. CABO-verslag 181, 33pp.

Studenten

- Loman, E., 1992. De invloed van gewasopbouw en omgevingsfactoren op de productie en kwaliteit van karwijzaad. Verslag afstudeervak Produktkunde, vakgroep Landbouwplantenteelt en Graslandkunde, LUW, 60pp.
- Strien, J. van, 1992. Verdamping van etherische olie uit karwijzaad. Verslag afstudeervak Produktkunde, vakgroep Landbouwplantenteelt en Graslandkunde, LUW, 36pp.
- Verberne, M., 1991. Factoren die de etherische-oliesynthese in vruchten van karwij (*Carum carvi* L.) beïnvloeden. Verslag afstudeeropdracht IAH Larenstein, Wageningen, 74 pp.
- Welten, A.S.A., 1993. Het kwantificeren van de vervluchtiging van etherische karwijolie. Verslag afstudeervak vakgroep Agronomie, LUW, 39 pp.

Gepland

Bouwmeester, H.J. & H. Smid. Partitioning of ^{13}C labeled assimilates to seed and essential oil production in caraway.

Bouwmeester, H.J. Essential-oil content and quality of caraway seed.

Bouwmeester, H.J., J. Wander & M. de Rooij. Losses of carvone and limonene during harvest of caraway and dill seed.

8. Bestedingen project 777 - AB-DLO 1 januari 1993-1 juni 1994

| Personeel | | | Begroot mensdagen | Gerealiseerd mensdagen | |
|-------------------|------------------|-----------------|--------------------------|---------------------------|-----|
| Eigen aandeel | Onderzoekleiding | 40 ¹ | | 103 | |
| | Assistentie | 44 | proefveldass. | 19 | |
| | | | onderz.ass. | | 126 |
| | | | NOP-project ² | | 170 |
| Programma-aandeel | Onderzoekleiding | 175 | | 148 | |
| | Assistentie | --- | | --- | |
| Totaal personeel | | 259 | | 566 | |

| Materieel | | gulden | gulden |
|-------------------|--|--------|--------|
| Eigen deel | | --- | |
| | Projectcoördinatie en extra kosten afsluitingprogramma | | 2.800 |
| | Analyses lab AB-DLO | | 18.00 |
| | Chemicaliën, GC e.d. | | 7.000 |
| | Gebruik kassen, cellen | | 38.000 |
| | Reizen | | 1.200 |
| | Subtotaal | | 67.000 |
| Programma-aandeel | Onderzoek SKE | | 8.000 |
| | Subtotaal | | 8.000 |
| Totaal materieel | | --- | 75.000 |

¹ incl. coördinatie karwijprogramma

² I.F. Kappers

5.3 Onderzoek naar de beperking van het optreden van en de schade door verbruiningsziekte in karwij

-
1. **Projecttitel:** Onderzoek naar de beperking van het optreden van en schade door verbruiningsziekte in karwij

 2. **Projectleiding:** Ir. A. Evenhuis

Medewerkers: Ing. B. Verdam (IPO-DLO)
Ing. J.G.N. Wander
Ing. H.W.G. Floot
Ing. H.J. van der Mheen

 3. **Samenwerking:** R.O.C. Ebelsheerd
IPO-DLO
Prof. H.C. van Hall-Instituut
CPRO-DLO
AB-DLO

 4. **Doelstelling:** Inzicht vergroten in de biologie van de veroorzaker(s) van de verbruiningsziekte in karwij. Dit moet leiden tot het aangeven van methoden waardoor de schade in de karwijteelt, als gevolg van het optreden van deze ziekte, beperkt kan worden.

 5. **Onderzoeksverslag:** 5.1 Samenvatting
5.2 Inleiding
5.3 Methoden
5.4 Resultaten
5.5 Conclusies

 6. **Publikaties**

5.1 Samenvatting

De oogstzekerheid in de karwijteelt wordt in belangrijke mate bepaald door het optreden van de verbruiningsziekte. Om een verdere teeltoptimalisatie mogelijk te maken is in 1990 een onderzoek gestart naar de beperking c.q. bestrijding van deze ziekte, veroorzaakt door *Mycocentrospora acerina*. De biologische eigenschappen van het pathogeen waren niet of nauwelijks bekend. Een praktische bestrijdingswijze ontbrak eveneens. Doel van het project was om op basis van de opgedane kennis omtrent de schimmel maatregelen te genereren waardoor de schade als gevolg van de verbruiningsziekte beperkt kan worden.

Inoculum van buiten het veld lijkt een geringe rol te spelen, omdat conidiën van *M. acerina* zich slechts over een beperkte afstand verspreiden.

De belangrijkste inoculumbron is de grond. Isolatie van de schimmel uit de grond is gelukt. Dit opent de mogelijkheid om de besmettingsgraad van de grond te bepalen, waardoor een goede perceelskeuze met betrekking tot verbruining beter mogelijk wordt.

Daarnaast werd vastgesteld dat zaaizaad besmet kan zijn met *M. acerina*. Een toets is ontwikkeld om de mate van zaadbesmetting aan te tonen. Daarmee kan in de toekomst uitgegaan worden van ziektevrij zaaizaad.

Ontsmetting van zaaizaad gaf een goede bescherming van de kiemplant tegen infectie vanuit de bodem en het zaad. Introductie in de praktijk zal afhangen of een toelating verkregen kan worden.

In het veld bleek dat de schimmel in ernstige mate voorkwam in gewassen met een dichte stand. Middels vermindering van de zaaizaadhoeveelheid, een niet te nauwe rijenafstand en een beperkte stikstofgift kon de schade door de ziekte beperkt worden.

Een aantal gewassen en akkeronkruiden bleken vatbaar voor *M. acerina*. De bijdrage aan de inoculumopbouw in het veld lijkt beperkt. In karwijstro kunnen chlamydosporen gevormd worden. Na de oogst blijven deze op het land en vormen een inoculumreservoir voor een volgende karwijteelt.

Ten behoeve van de veredeling is door het PAGV een resistentietoets ontwikkeld. Met deze toets moet het mogelijk zijn het resistentieniveau in karwijpopulaties omhoog te brengen.

Uit de resultaten blijkt dat een beperking van de ziekte bereikt kan worden indien een aantal teeltmaatregelen, gericht op een niet te dicht karwijbestand, getroffen worden. In 1994 worden nog waarnemingen in veldproeven gedaan. De uitgebreide resultaten worden beschreven in een PAGV-verslag.

5.2 Inleiding

De oogstzekerheid van karwij hangt in belangrijke mate af van het optreden van de verbruiningsziekte. Om een verdere teeltoptimalisatie mogelijk te maken is in 1990 een onderzoek naar de beperking cq bestrijding van deze ziekte gestart. Van het pathogeen, *Mycocentrospora acerina*, was aan het begin van het onderzoek weinig bekend. Gestart werd met een literatuuronderzoek naar de biologie van deze schimmel. Op basis hiervan werd een onderzoekprogramma samengesteld en uitgevoerd. Medio 1992 werd de onderzoekcapaciteit uitgebreid met 0.4 fte, bijgedragen door IPO-DLO.

Het onderzoekprogramma was breed van opzet, omdat nog weinig bekend was van het pathosysteem. Uitgangspunt was het voorkomen van schade door vermindering van het optreden van de schimmel. Een goede kennis van de schimmel en het gewas is hiervoor noodzakelijk. De ontwikkeling van de ziekte in het gewas werd gevolgd. De wijze van overleving en de primaire inoculumbronnen werden bepaald. In het veld werden een aantal teeltmaatregelen beproefd op hun effect tegen de verbruiningsziekte. In de kas werden proeven uitgevoerd gericht op de ontwikkeling van toetsmethoden zodat een gezondere uitgangssituatie van de teelt in de toekomst mogelijk wordt.

Waarnemingen in het veld en kasproeven gaven aanvullende informatie omtrent het genoemde pathosysteem. Dit heeft geleid tot het aangeven van maatregelen ter beheersing van het optreden van de verbruiningsziekte in karwij.

5.3 Methoden

De schimmel werd geïsoleerd van verschillende plantedelen en percelen. De zo verkregen isolaten werden in diverse proeven gebruikt. De cultures werden aangehouden op Aardappel Glucose Agar (AGA) of Sucrose agar met streptomycine (SuA+).

Inoculum werd gemaakt door met schimmel overgroeid medium in water stuk te slaan met een blender. De verkregen chlamyosporensuspensie werd over kaasdoek gehaald. Door telling werd de concentratie van het inoculum vastgesteld en zonodig aangepast. In kasproeven werd met 0, 10, 100 en 1000 chlamyosporenketens per gram grond gewerkt. In veldproeven werd een concentratie van $1 \cdot 10^4$ gebruikt, die met een rugspuit over de veldjes verspoten werd.

De resistentietoets, de zaadontsmetting en de biotoets zijn gebaseerd op inoculatie van de grond met chlamyosporenketens. Bij de gewasrestenproeven dient het stro van de verschillende gewassen als inoculum. Het aantal kiemplanten en het percentage door *M. acerina* aangetaste planten werd bepaald.

Voor de toets op besmetting van zaad worden zaden uitgelegd op vochtig filtreerpapier. Na een dag incubatie bij $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gevolgd door een week bij $18\text{ }^\circ\text{C}$ kan besmetting worden vastgesteld.

Isolatie van de schimmel uit de grond is gebaseerd op nat zeven van de grond. Gevolgd door uitplaten op Sucrose agar medium met carvon.

In de veldproeven werden de objecten aangelegd in blokkenproeven. De worteldiameter, de standdichtheid, de stengelaantasting en de opbrengst zijn de belangrijkste parameters die bepaald werden.

Door het plaatsen van rotorods en vangplanten kon de sporeproductie en verspreiding vastgesteld worden. Bladnatschrijvers werden gebruikt om de bladnatperiode in het veld te meten.

5.4 Resultaten

5.4.1 Beschrijving van de verbruiningsziekte in karwij

De schimmel kan langdurig in de vorm van chlamydosporen in de grond overleven (Wall & Lewis, 1980). De grond vormt de belangrijkste inoculumbron voor de ziekte. De besmetting van het zaad speelt een rol bij de verspreiding over lange afstand. Zaailingen kunnen worden geïnfecteerd via conidiën en chlamydosporen. Reeds enkele dagen na infectie kan sporulatie waargenomen worden, waarmee de infectiecyclus rond is. In het veld verspreidt de schimmel zich middels spatverspreiding van conidiën. De afstand waarover de conidiën zich verspreiden is beperkt.

In de herfst, vindt op afstervend blad onder koele en vochtige omstandigheden inoculumopbouw plaats in het veld. In het volgende voorjaar kunnen hieruit, in regenachtige perioden, stengels, schermen en zaden aangetast worden. Naarmate dit vroeger in het seizoen gebeurt zal de schade groter zijn. De opbrengstverliezen door verbruining kunnen oplopen tot 75%.

M. acerina zonder symptoomexpressie:

In de winter werd *M. acerina* symptomeloos op karwijblad aangetroffen. Dit geeft aan dat *M. acerina* tenminste zonder symptoomexpressie op karwij kan voorkomen. Dit doet tevens vermoeden dat de schimmel op diverse andere gewassen mogelijk ook zonder symptoomexpressie voorkomt.

Symptoomexpressie op hypocotyl, bladstelen en blad:

Het hypocotyl wordt als het ware ingesnoerd. Ze krijgt een donkerbruine tot zwarte kleur. Met het blote oog is vaak een wittige waas te zien veroorzaakt door conidiën van *M. acerina*. De donkere kleur wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de gevormde chlamydosporen. De plant sterft af. Dit verschijnsel kan aangeduid worden met de term "damping off".

De schimmel vormt rood-bruine bladvlekken. Deze zijn vaak omgeven door een niet scherp begrensde donkere zone. Het geheel geeft daardoor een wat verwaterde indruk. In het veld zijn de lesies vaak wat scherper begrensd dan in de kas. Dit heeft mogelijk te maken met het feit dat in de kas altijd een relatief hoge luchtvochtigheid gehandhaafd werd. In het veld worden vochtige periodes afgewisseld met droge periodes.

Symptoomexpressie op de stengel, schermen en zaden:

Op de stengel worden scherp begrensde lesies gevormd. Deze zijn vrij donker van kleur tot zwart, met een paarse gloed. Soms is er een wittig overtrek te zien veroorzaakt door sporen die gevormd worden op de lesie.

Schermaantasting is moeilijk waarneembaar. De schermen trekken zich samen. De zaden lijken enigszins ruw. De bruine kleur van gezond zaad is verdwenen en heeft plaats gemaakt voor een donkerbruine tot zwarte kleur.

Symptoomexpressie op de wortel:

Bij beschadiging treedt in de wortel een rood verkleuring op. Deze wordt vaak, ten onrechte, aangezien voor verbruining. De symptomen op de wortel worden gekenmerkt door een donker bruine kleur. Na inoculatie wordt eerst een kleine lesie zichtbaar. Deze is onregelmatig van vorm, donkerbruin en begint vaak in de buurt van een beschadiging of zijwortel. Na verloop van tijd groeit de lesie uit tot een ovale roodbruine plek in en op het weefsel. Uiteindelijk wordt de hele wortel gekoloniseerd. De lesie wordt donkerder tot bijna zwart waarschijnlijk door de vorming van chlamydosporen in het weefsel. Bij ernstige aantasting sterft de plant af.

5.4.2 Effect voor- en dekvruchten op verbruining

Doel van deze proef is na te gaan of *M. acerina* in staat is in gewasresten van verschillende gewassen te overleven en een volgend karwij gewas te infecteren. In tabel 1 staat de mate van aantasting van karwij bij de verschillende behandelingen gemiddeld over twee kasproeven.

Tabel 1 Het percentage gekiemde en door *M. acerina* geïnfecteerde toetsplanten, op grond geïnfecteerd met stroresten van enkele gewassen of chlamydosporen van *M. acerina*.

| Behandeling/ Inoculum | Kieming [%] | Infectie [%] | Bakken met >= 1 zieke plant [%] |
|--------------------------|----------------|-----------------|---------------------------------------|
| Controle | 79.7 | 0.0 | 0 |
| Spinazie | 77.8 | 0.7 | 50 |
| Zomergerst | 78.6 | 0.7 | 33 |
| Erwten | 77.6 | 0.2 | 17 |
| Karwij | 71.9 | 9.0 | 100 |
| 100 * | 70.3 | 61.8 | 100 |
| 1000 * | 68.8 | 97.2 | 100 |
| LSD (0.05) | 10.3 | 15.6 | 38 |

*: inoculatie van de grond met respectievelijk 100 en 1000 chlamydospo -

renketens per gram grond.

Op grond, geïnoculeerd met chlamydosporen van *M. acerina*, vielen toetsplanten na opkomst weg. Ook het kiemingspercentage bleef achter bij de controle. In de objecten met gewasresten bleek overdracht van *M. acerina* op ingezaaide karwij plaats te vinden. De mate waarmee zaailingen op grond met gewasresten van dekvruchten ziek werden verschilde echter niet significant van de controle. Van de toetsplanten uitgezaaid op grond met gewasresten van erwten, zomergerst, spinazie en karwij werden respectievelijk 1, 3, 3 en 38 planten geïnfecteerd door *M. acerina*. Het aantal aangetaste toetsplanten was lager dan in beide geïnoculeerde objecten. Dit wijst erop dat via gewasresten van dekvruchten een beperkte hoeveelheid inoculum overgebracht kan worden. Het percentage geïnfecteerde planten in de karwijobjecten wijst in de richting van een redelijke overdracht. Voor erwten, zomergerst en spinazie lijkt overdracht van marginaal belang. Echter in de veldsituatie kunnen enkele zieke zaailingen wel dienen als besmettingsbron voor naburige gezonde zaailingen.

Wall en Lewis (1980) vonden een verwaarloosbare afname van de vitaliteit van chlamydosporen in de grond gedurende een periode van twee jaar. Hermansen (1992) toonde aan dat een 3-jarige rotatie nauwelijks een afname van bewaarrot bij peen door *M. acerina* tot gevolg had. Dit geeft aan dat chlamydosporen in geïnfecteerd karwijstro na onderploegen mogelijk een kunnen rol spelen in de levenscyclus van de schimmel en infectie van een volgend gewas karwij. Het effect van dekvruchten op overdracht van *M. acerina* wordt nog onderzocht in veldproeven.

5.4.3 Effect stikstofgift en plantdichtheid op verbruining

De uitbreiding van de verbruiningsziekte in karwij vindt plaats tijdens vochtige periodes. Maatregelen die de duur van de bladnatperiode in het gewas beperken zijn mogelijk geschikt om schade door de verbruiningsziekte te voorkomen. In proeven is het effect van stikstof, zaadhoeveelheid en rijenafstand bepaald.

In 1993 zijn tijdens een regenbui de veldjes zomerkarwij met een hoge stikstofgift gelegerd. De verbruiningsziekte ontwikkelde zich met name hierin sterk. In 1992 legerde het gewas niet. In beide jaren was de ontwikkeling van de verbruining in de geïnoculeerde velden sterker dan in de controle velden. Tabel 2 geeft de belangrijkste resultaten.

Tabel 2 Legering, percentage zieke planten (incidentie), mate van aantasting (severity), opbrengst en bladnatperiode van zomerkarwij bij verschillende stikstof niveaus en inoculatie met *M. acerina*.

| N- gift | Inocu- latie | Legering | | Incidentie | | Severity | Opbrengst | | Bladnat periode |
|--------------|-----------------|----------|------|------------|------|----------|-----------|------|--------------------|
| | | [%] | | [%] | | [%] | [kg/ha] | | [uur.min /dag] |
| | | 1992 | 1993 | 1992 | 1993 | 1993 | 1992 | 1993 | 1993 |
| 40 | - | 0 | 13 | 1 | 73 | 8.4 | 541 | 1169 | 14h 14' |
| 40 | + | 0 | 10 | 13 | 99 | 30.8 | 554 | 792 | - |
| 100 | - | 0 | 63 | 1 | 89 | 10.9 | 741 | 1059 | 15h 20' |
| 100 | + | 0 | 55 | 30 | 100 | 44.0 | 733 | 532 | - |
| 160 | - | - | 78 | - | 93 | 13.6 | - | 1063 | 15h 55' |
| 160 | + | - | 83 | - | 100 | 41.1 | - | 503 | - |
| LSD n (0.05) | | | 18 | 2 | 3 | 6.1 | 116 | 120 | 55' |

In 1992 en 1993 leidde een hogere N-gift tot meer verbruining. In 1993 komt dit duidelijk tot uiting in de mate van aantasting. Is deze hoog dan treedt schade op. De schadedrempel kan nog niet exact bepaald worden.

De tabellen 3 en 4 geven het effect van de zaaizaadhoeveelheid en de rijenafstand op verbruining in respectievelijk winter- en zomerkarwij.

Tabel 3 Percentage zieke planten (incidentie), opbrengst en bladnatperiode van winterkarwij bij verschillende rijenafstanden over twee zaaizaadhoeveelheden in 1993.

| Rijen afstand | Zaad Hoeveelheid | Incidentie | Opbrengst | Bladnat periode |
|------------------|---------------------|------------|-----------|--------------------|
| [cm] | [kg/ha] | [%] | [kg/ha] | [uur.min./dag] |
| 12 | 6 & 12 | 52 | 1610 | 6 h 45' |
| 36 | 6 & 12 | 46 | 1689 | |
| 48 | 6 & 12 | 41 | 1552 | 6 h 10' |
| LSD (0.05) | | 9 | n.s. | 24' |

Tabel 4 Legering, percentage zieke platen (incidentie), mate van aantasting (severity), opbrengst en bladnatperiode van zomerkarwij bij verschillende zaaizaadhoeveelheden over drie rijenafstanden in 1992 en 1993 (3 proeven)

| Rijen afstand [cm] | Zaadhoe- veelheid [kg/ha] | Legering [%] | Inci- dentie [%] | Severity [%] | Opbrengst [kg/ha] | Bladnat periode [uren.min /dag] |
|--------------------------|---------------------------------|-----------------|------------------------|-----------------|----------------------|--|
| 12,36&48 | 4 | 25 | 39.1 | 14.6 | 602 | 7 h 13' |
| 12,36&48 | 8 | 34 | 34.0 | 17.6 | 514 | 7 h 45' |
| LSD (0.05) | | 8 | 5.9 | 2.6 | 55 | 26' |

Bij winterkarwij gaf een verruiming van de rijenafstand een beperking van het optreden van de verbruiningsziekte. Dit werd enigszins in de opbrengst terug gevonden. Bij zomerkarwij leidde vermindering van de hoeveelheid zaaizaad tot een geringer optreden van *M. acerina*.

In de proeven met verschillende stikstofgiften, zaaizaadhoeveelheden en rijenafstanden blijkt dat de bladnatperiode en het optreden van *M. acerina* gecorreleerd zijn. Tevens blijkt dat *M. acerina* meer voorkomt in gelegeerde dan in staande karwij gewassen. De mate van optreden van de verbruiningsziekte en schade worden voor een groot deel bepaald door het weer. Om de opbrengstzekerheid van karwij te vergroten moet legering worden voorkomen. Maatregelen die de gemiddelde bladnatperiode in het gewas verkorten, verkleinen de kans op schade door de verbruiningsziekte.

5.4.4 Isolatie van de schimmel uit de grond en toetsing op resistentie

De mate van grondbesmetting kan geschat worden door een biotoets en door grond nat zeven en verdunningen van het residu uitplaten. De methode van zeven en uitplaten is ontwikkeld in samenwerking met het Prof. H.C. van Hall Instituut. Na een aantal testseries werd grond waarin een natuurlijke besmetting voorkwam met beide methoden getoetst.

In de biotoets werd zomerkarwij als toetsplant het meest geschikt bevonden. Deze plant kiemt sneller dan winterkarwij en lijkt iets makkelijker aangetast te worden. Echter in praktijkgrond blijken veel storende factoren op te treden wat de biotoets minder geschikt maakt voor een schatting van het inoculumniveau in de grond.

Bij het uitplaten kan het aantal ontstane kolonies bij verschillende verdunningen uitgezet worden tegen de verdunningsfactor. Hierdoor wordt een rechte lijn verkregen. De hellingshoek is een maat voor de efficiëntie van de methode als grond gebruikt werd met een bekende hoeveelheid *M. acerina*.

Op basis van de hellingshoek gevonden bij de geïnoculeerde grond en de praktijk grond kan geschat worden wat de waarde van de hoeveelheid inoculum in de praktijk grond is, zie tabel 5.

Tabel 5 De geschatte besmetting van praktijkgrond met chlamydosporenkentens (inoculum potentieel) op basis van de hellingshoek gerelateerd aan grond met een bekende hoeveelheid inoculum.

| Proef | | hellings hoek | standaard afwijking | t-waarde | inoculum potentieel | standaard afwijking |
|------------|---|------------------|------------------------|----------|------------------------|------------------------|
| Praktijk | 3 | 0.128 | 0.038 | 3.37 | 95 | 30 |
| Inoculatie | 3 | 1.344 | 0.123 | 10.92 | 1000 | - |
| Praktijk | 4 | 0.428 | 0.057 | 7.55 | 648 | 110 |
| Inoculatie | 4 | 0.661 | 0.070 | 9.38 | 1000 | - |

Zou niet op basis van de standaard inoculatie gecorrigeerd zijn dan zou de tweede praktijk waarde voor inoculum potentieel in de grond ongeveer de helft lager zijn geweest.

Met de zeef en uitplaat-methode kon de besmetting van de grond redelijk geschat worden. Opgemerkt moet worden dat sprake is van een vrij hoog besmettingsniveau. Verder onderzoek zal moeten uitwijzen of de beide methoden afzonderlijk of gecombineerd geschikt zijn om lagere besmettingsniveaus aan te tonen.

In samenwerking met het CPRO-DLO is een eerste selectieronde uitgevoerd ter verhoging van het resistentieniveau in de populatie zomerkarwij. Zaden uitgezaaid op besmette grond die een "gezonde" kiemplant gaven werden uitgeselecteerd. Het effect van de selectie procedure zal in de komende jaren moeten blijken.

5.4.5 Effect van zaadontsmetting op infectie van karwij zaailingen

Zaadontsmetting kan mogelijk een bijdrage leveren aan de vertraging van een epidemie door bescherming van de kiemplant.

In de kas werd het effect van zaadontsmettingsmiddelen op infectie van zaailingen door *M. acerina* uit de grond bepaald, zie tabel 5.

Tabel 6 Het kiemingspercentage, het percentage door *M. acerina* aangetaste planten (incidentie) bij verschillende zaadbehandelingen van winterkarwij bij verschillende inoculumdruk.

| Inoculatie niveau | Behandeling | Kieming [%] | Incidentie [%] |
|-------------------|---------------|-------------|----------------|
| Controle | onbehandeld | 91 | 0 |
| | fosetyl-Al * | 90 | 0 |
| | carbendazim * | 93 | 0 |
| | iprodion * | 91 | 0 |
| 1000 ** | onbehandeld | 56 | 68 |
| | fosetyl-Al * | 53 | 64 |
| | carbendazim * | 93 | 15 |
| | iprodion * | 87 | 6 |
| LSD (0.05) | | 11 | 15 |

* De middelen zijn niet als zaadontsmetting toegelaten in karwij

** Grond geïnoculeerd met 1000 chlamyosporenketens per gram grond.

De resultaten van zaadontsmetting tegen zaadbesmetting geven hetzelfde beeld als van zaadontsmetting tegen infectie vanuit de grond. Enkele middelen kunnen de kiemplant beschermen tegen een eerste infectie van zaailingen tegen *M. acerina* uit grond of zaad.

De tabellen 7 en 8 geven het effect van zaadontsmetting in het veld.

Tabel 7 Het aantal planten per vierkante meter, het percentage door *M. acerina* aangetaste planten (incidentie) en de opbrengst van twee percelen zomerkarwij in 1991.

| Behandeling | EH 630 | | | EH 636 | | |
|---------------|---------------------------------|----------------|-------------------|---------------------------------|----------------|-------------------|
| | Plant aantal [m ⁻²] | Incidentie [%] | Opbrengst [kg/ha] | Plant aantal [m ⁻²] | Incidentie [%] | Opbrengst [kg/ha] |
| onbehandeld | 79 | 7 | 2315 | 70 | 3 | 2101 |
| carbendazim * | 74 | 0 | 2323 | 73 | 7 | 1972 |
| prochloraz * | 96 | 7 | 2350 | 73 | 7 | 2088 |
| iprodion * | 78 | 0 | 2464 | 73 | 0 | 2148 |
| LSD (0.05) | 11 | - | 155 | - | - | 130 |

* De middelen zijn niet toegelaten als zaaizaadontsmetting van karwij

Tabel 8 Het plantaantal en schieters in het voorjaar en het percentage planten met verbruining (incidentie) in winterkarwij in 1993.

| Behandeling | Plant aantal [m ⁻²] | Schieters aantal [m ⁻²] | Incidentie [%] |
|---------------|---------------------------------------|---|-------------------|
| onbehandeld | 164 | 89 | 42 |
| carbendazim * | 164 | 107 | 34 |
| prochloraz * | 131 | 80 | 32 |
| iprodion * | 163 | 109 | 36 |
| LSD(0.05) | - | 18 | - |

* De middelen zijn niet toegelaten als zaaizaadontsmetting van karwij.

De effecten van zaadontsmetting op verbruining in het veld lijken beperkt. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de voor verbruining relatief ongunstige jaren. Opvallend is het effect van zaadontsmetting op het aantal schieters.

5.5 Conclusies

De verbruiningsziekte geeft problemen als tijdens de generatieve periode van karwij zich langdurige periodes met regenval voordoen. Tot op heden kan de ziekte niet curatief bestreden worden. De maatregelen die genomen kunnen worden zijn gericht op een vermindering van het risico op schade door de ziekte.

Zaadontsmetting heeft vooral in de kas goede resultaten laten zien. Zowel infectie vanuit de grond als uit het zaad kunnen worden bestreden. De resultaten in het veld zijn nog niet beschikbaar. Zolang in karwij geen toelating voor zaadontsmetting bestaat, blijft deze mogelijkheid voor de praktijk onbeschikbaar. Het gebruik van gezond zaaizaad kan de problemen met de verbruiningsziekte verminderen. Een toets is ontwikkeld waarmee snel en betrouwbaar een partij zaaizaad op besmetting gecontroleerd kan worden.

De verspreiding van de sporen van de schimmel bleek beperkt. Dit geeft aan dat infectie van karwij vanuit waardplanten in bermen en andere karwijpercelen slechts een geringe rol speelt. De onkruidbezetting op het perceel zelf speelt mogelijk wel een rol. Vruchtwisseling leverde met betrekking tot *M. acerina* in peen weinig op (Hermansen, 1992).

Het effect van de dekvruchten op verbruining is slechts beperkt. Ondanks dat spinazie, erwten en ook zomergerst vatbaar zijn lijken ze niet veel bij te dragen aan de inoculumopbouw.

Isolatie van de schimmel uit de grond is gelukt. De biotoets en de isolatie op een selectief medium bieden perspectief om de grondbesmetting

te bepalen. Dit kan als hulpmiddel bij de perceelskeuze dienen. Om een dergelijke methode voor de praktijk beschikbaar te maken is vervolg onderzoek noodzakelijk.

In een open en staand gewas zijn de omstandigheden voor *M. acerina* relatief ongunstig. Zodra een gewas gelegerd is kan de schimmel zich snel uitbreiden en opbrengstverliezen tot 75% veroorzaken. Met een gematigde stikstofgift in de generatieve fase neemt de kans op legering en daarmee ziekte sterk af. Bij beperking van de hoeveelheid zaaizaad zal het aantal planten per m² afnemen. Daardoor wordt het optreden van *M. acerina* beperkt. Vermindering van de zaaizaadhoeveelheid bleek geen consequenties te hebben voor de opbrengst. Een tendens werd waargenomen dat vergroting van de rijenafstand de ziekte onderdrukte.

Met een reeks van maatregelen kan het risico op schade door de verbruiningsziekte in de karwijteelt beperkt worden. Uitgangspunten hierbij zijn: 1) Een gezonde begin situatie (gezond zaaizaad, perceelskeuze) waardoor de inoculum opbouw in de herfst beperkt wordt. 2) Door teeltmaatregelen beïnvloeden van het microklimaat in het gewas (vermindering zaadhoeveelheid, beperking stikstofgift en niet te nauwe rijenafstand), waardoor de start van de epidemie in het voorjaar vertraagd wordt. 3) Zaadontsmetting kan de eerste infectie van karwij vertragen maar is nog niet toegelaten. Vollevelds behandelingen tegen *Sclerotinia* hebben soms een nevenwerking op verbruining, maar het resultaat is vaak onzeker.

Literatuur

Hermansen, A., 1992

Effects of crop rotation on attack by *Mycocentrospora acerina* on carrots. In: *Mycocentrospora acerina* in carrots: Host range, epidemiology and prediction, Agricultural University of Norway, Doctor Scientiarum Theses 1992:7

Wall C.J. & Lewis, B.G., 1980

Survival of chlamydospores and subsequent development of *Mycocentrospora acerina* in soil, Trans. Br. Mycol. Soc. 75(2): 207-211

6 Publikaties

Bouwmeester H.J. & A. Evenhuis, 1991

Karwijteelt en karwijonderzoek in Duitsland en Polen, Studiereis van 12 mei 1991 t/m 18 mei 1991; 11 pp. CABO-DLO - PAGV

Ester A., H. Floot, J. Wander, 1994.

Wortelluis in karwij is nu goed te bestrijden; Kilval werkt maandenlang afdoende. In: Boerderij/akkerbouw 79 - no. 4, p. 14-15.

Evenhuis, A., 1991

Literatuurstudie naar de biologie van *Mycocentrospora acerina* (verbruiningsziekte karwij), Interne mededeling PAGV volgnummer 767; 30 pp.

Evenhuis, A., 1992

Invloed van gewasresten op inoculumopbouw van *Mycocentrospora acerina*, Proefveldverslag 1991 voor de klei-akkerbouw in Groningen en Friesland, Stichting Proefboerderijen Noordelijke akkerbouw, p. 109-110.

Evenhuis, A., 1992

De invloed van zaaizaadontsmetting op de ontwikkeling van de verbruiningsziekte in eenjarige karwij, Proefveldverslag 1991 voor de klei-akkerbouw in Groningen en Friesland, Stichting Proefboerderijen Noordelijke akkerbouw, p. 111-112.

Evenhuis, A., 1993

KARWIJ - Invloed van de standdichtheid op verbruining (*Mycocentrospora acerina*), Proefveldverslag 1992 voor de klei-akkerbouw in Groningen en Friesland, Stichting Proefboerderijen Noordelijke akkerbouw, p.100-101.

Evenhuis, A., 1994

De invloed van zaaizaadontsmetting op de ontwikkeling van de verbruiningsziekte in eenjarige karwij, Proefveldverslag 1993 voor de klei-akkerbouw in Groningen en Friesland, Stichting Proefboerderijen Noordelijke akkerbouw, p. 105-106.

Evenhuis, A., 1994

KARWIJ - Invloed van de standdichtheid op verbruining (*Mycocentrospora acerina*), Proefveldverslag 1993 voor de klei-akkerbouw in Groningen en Friesland, Stichting Proefboerderijen Noordelijke akkerbouw, p.107-109.

Evenhuis, A, in voorbereiding

Injury stimulates colonization of caraway roots by *M. acerina*

Evenhuis, A., & B. Verdam, in voorbereiding

Onderzoek naar verbruiningsziekte (*Mycocentrospora acerina*) in karwij, PAGV verslag

Evenhuis, A., B. Verdam, M. Gerlagh & H.M. van der Geijn, in voorbereiding

Major diseases of caraway in the Netherlands, Industrial Crops and Products

Evenhuis, A. & B. Verdam, in voorbereiding

Infection of fruits (seeds) of caraway (*Carum carvi*) by *Mycocentrospora acerina*

Mheen, H.J. van der, 1992

Produktie van zaad en carvon door karwij en dille, PAGV-Jaarboek 91/92:

Mheen, H.J. van der, 1992

Vergelijking zaadopbrengst en -kwaliteit van een- en tweejarige karwij en dille, Proefveldverslag 1991 voor de klei-akkerbouw in Groningen en Friesland, Stichting Proefboerderijen Noordelijke akkerbouw, p.113-115.

Mheen, H.J. van der, 1993

Vergelijking zaadopbrengst en -kwaliteit van één- en tweejarige karwij en dille op de noordgroningse klei, Proefveldverslag 1992 voor de klei-akkerbouw in Groningen en Friesland, Stichting Proefboerderijen Noordelijke akkerbouw, p.102-104.

- Mheen, H.J. van der, A. Evenhuis & J.G.N. Wander, 1994
Carvonproduktie uit karwij- en dillezaad In: Agrificatie en 'nieuwe' gewassen voor de akkerbouw, Themaboekje nr. 17, PAGV, p. 43-57.
- Mheen, H.J. van der & B.G. Muuse, 1993
Dill beats caraway as producer of carvone, Prophyta 3: 42-44
- Muuse, B.G., R.E. Nijburg, J.T.P. Derksen, H.J. van der Mheen, 1992
Agronomical aspects of dill and caraway: resources of essential oils (Symposium Phytochemistry and Agriculture 22-24/4/'92 I.A.C.)
- Prinsen, J.D, M.N.C.P. Buysman, A. Evenhuis, M. Gerlagh & B. Verdam, 1991
Pests and diseases in caraway in the Netherlands; IPO-DLO, PAGV; Poster abstract, First European Symposium on Industrial Crops and Products, Maastricht 25-27 november 1991, p. 30.
- Stok, T van der & A. Evenhuis, 1993
Carvon in 1994 op de markt, Oogst 24 no. 6: 36-37.
- Wander J., 1992.
Literatuurstudie carvonproducerende gewassen. PAGV interne mededeling nr. 907, 16 pp.
- Wander J., 1993.
Voor carvon-produktie duizenden hectaren nodig; Teelt karwij en dille opnieuw in onderzoek, In: Oogst, 12 maart 1993, p. 38.
- Wander J., 1994.
Invloed van de dekvrucht op de ontwikkeling van karwij. In: Proefveldverslag 1993 voor de klei-akkerbouw in Groningen en Friesland. SPNA, 1994, p. 110 - 112.
- Wander J. & M. de Rooy, 1994.
Invloed omtreksnelheid dorstrommel en rijpheid op dorsbeschadiging karwij. In: Proefveldverslag 1993 voor de klei-akkerbouw in Groningen en Friesland. SPNA, 1994, p. 113 - 114.
- Wander, J., 1994.
Zomerkarwij in trek; Gebrek aan zaaizaad kan teelt beperken. In: Boerderij/akkerbouw 79 - no.4, p. 23.
- Wander J.G.N., 1994.
Teelt van karwij. PAGV, teelthandleiding nr.60, 40 pp.

BESTEDING PERSONELE CAPACITEIT EN MATERIEEL 1993

| Personeel | begrote md. | gerealiseerde md. |
|--------------------------|-------------|-------------------|
| eigen aandeel | | |
| onderzoekers | 100 | 90 |
| proefv./lab.ass. | 20 | 53 |
| programma-aandeel | | |
| onderzoeker | 172 | 172 |
| proefv./lab.ass. | - | 70 |
| totaal personeel | 292 | 385 |

Materieel

| | | |
|----------------------|-------------|-------------|
| eigen aandeel | | |
| proefveldkosten | 15000 | |
| - Ebelsheerd | | 24603 |
| - Westmaas | | 7682 |
| - Lelystad | | 2779 |
| monsterkosten | | 413 |
| reis-/verblijfkosten | <u>3000</u> | <u>2317</u> |
| | 18000 | 37794 |

Programma-aandeel

| | | |
|-----------------------|-------------|-------------|
| proefveldkosten | 10000 | |
| - Ebelsheerd | | 23411 |
| - Droevendaal | | 4300 |
| - Lelystad | | 5996 |
| gebruik kas (1 comp.) | | 2500 |
| monsterkosten | 5000 | 34 |
| literatuurattendering | | 224 |
| reis-/verblijfkosten | <u>5000</u> | <u>2995</u> |
| | 20000 | 39460 |

totaal materieel 38000 77254 *

* via herstructureringsgeld is f 9000,-- toegezegd waarvan de helft aan het programma-aandeel kan worden toegekend.

5.4 Ecologie en biologische bestrijding van *Sclerotinia sclerotiorum* in karwij



ipo-dlo

Projectverslag 1990-1993

DLO-Instituut voor Planteziektenkundig Onderzoek (IPO-DLO),
Binnenhaven 12, Postbus 9060, 6700 GW Wageningen.

1. **Projecttitel:** Ecologie en biologische bestrijding van *Sclerotinia sclerotiorum* in karwij.
2. **Projectleiding:** Dr. Ir. M. Gerlagh
Medewerkers: Ing. B. Verdam; H.M. van de Geijn.
3. **Samenwerking:** PAGV, CPO, ATO, LUW, RUG, AB, Van Hall Instituut.
4. **Doelstelling:** Verhogen van het inzicht in de totstandkoming van infectie van karwij door *Sclerotinia sclerotiorum*. Dit moet vervolgens dienen als basis voor betere biologische bestrijding van het pathogeen. Door een zodoende bereikte verhoogde oogstzekerheid (zonder belasting van het milieu), zou karwij een aantrekkelijker alternatief worden in het bouwplan.

5. Onderzoekverslag

5.1. Samenvatting.

Karwij kan zowel in het eerste als het tweede teeltjaar door *Sclerotinia sclerotiorum* worden aangetast. Aantasting in het eerste jaar bleek niet over te gaan naar het tweede jaar, maar wel door produktie van sclerotiën bij te dragen aan het niveau van besmetting in het tweede jaar. Een sclerotium produceert na kieming apotheciën. De ziekte-incidentie hangt samen met de dichtheid van de apotheciën, doch de relatie wordt beïnvloed door grootte van het veld, milieu-omstandigheden, enz. Het bleek mogelijk het aantal vruchtlichamen per m² zeer sterk te reduceren door toepassing van kalkstikstof in het begin van het tweede teeltjaar of van de antagonist *Coniothyrium minitans* in de herfst van het eerste teeltjaar. Hiermee kan *S. sclerotiorum* in karwij effectief worden bestreden.

5.2. Inleiding.

In de loop van het onderzoek aangaande de ecologie en de biologische bestrijding van *S. sclerotiorum* in karwij werden de volgende factoren onderzocht:

- infectie van het gewas in eerste en tweede teeltjaar;
- mogelijkheden tot beperking van de infectie door reductie van het aantal vruchtlichamen van *S. sclerotiorum*;
- onderdrukking van het verschijnen van vruchtlichamen door kalkstikstof;
- onderdrukking van het verschijnen van vruchtlichamen door bevordering van afsterven van de sclerotiën m.b.v. antagonisten, met name de mycoparasiet *Coniothyrium minitans*.

5.3. Methoden.

Het onderzoek sloot aan bij lopend onderzoek op IPO-DLO, zowel in het laboratorium als op het veld.

Potentiële antagonisten van *S. sclerotiorum* werden afgeënt van sclerotiën uit grond¹. Na kweek op voedingsmedium werden sporensuspensies van 10⁶ conidiën ml⁻¹ gemaakt in water. Sclerotiën van *S. sclerotiorum* werden kortstondig ondergedompeld in deze suspensies, en vervolgens per 25 uitgelegd in de bovenste cms van potjes met potgrond. Deze werden onder voortdurend hoge vochttoestand enkele maanden in een kas bij circa 20°C geïncubeerd. Per potje werden de apotheciën geteld die zich over die periode ontwikkelden. De proeven werden beëindigd wanneer geen nieuwe apotheciën meer verschenen.

Voor het verzamelen van aan het gewas karwij gerelateerde gegevens werd gebruik gemaakt van proefvelden. Tweejarige karwij van het ras Bleija was de standaard. Tenzij anders vermeld, werd gezaaid volgens de gangbare praktijk. Het gewas peen als tweejarige teelt werd eveneens gebruikt ter vervanging van karwij.

Bodembesmetting met *S. sclerotiorum* en inoculum-dichtheid werd bepaald door telling van het aantal apotheciën tussen twee gewasrijen. Deze gegevens werden omgerekend naar aantallen per m². Ziekte-incidentie werd bepaald door telling van

¹Gerlagh, M. & Vos, I., 1991. Enrichment of soil with sclerotia to isolate antagonists of *Sclerotinia sclerotiorum*. In: Beemster et al. (eds.), Biotic interactions and soil-borne diseases, Proceedings of the first conference of the European Foundation for Plant Pathology, Elsevier, Amsterdam, etc.: 165-171.

zieke en gezonde planten over bepaalde lengtes rij.

Kalkstikstof-behandeling werd uitgevoerd 14 dagen vóór de zaai van karwij en dekvrucht, resp. vóór hervatting van de groei in het tweede jaar door strooien van 500 kg ha⁻¹ 'Perika'. Bespuitingen met de antagonist *C. minitans* bestonden uit meerdere bespuitingen per seizoen, steeds met 1 à 2 weken tussenruimte, van een sporensuspensie van 5.10⁶ sporen ml⁻¹, 1000 l ha⁻¹. De sporensuspensie werd verkregen door *C. minitans* te kweken op gesteriliseerde, vochtige haver gedurende drie weken bij 20°C. Daarna werd de kweek gedroogd en bij 4°C bewaard. Per l benodigde spuitvloeistof werd circa 1 g van een mengsel van dit gedroogde materiaal van verschillende isolaten in een mixer in water fijngeslagen, gefiltreerd door dubbel kaasdoek, en met kraanwater tot de gewenste concentratie verdund.

5.4. Resultaten.

5.4.1. Infectie van het gewas karwij in eerste en tweede teeltjaar.

Karwij kan zowel in de herfst van het eerste teeltjaar als in het volgende productiejaar worden aangetast door *S. sclerotiorum*. Door in de herfst in een aantal rijen van het gewas alle zieke planten te markeren, en zieke en gezonde planten te tellen, kon in het volgende jaar eenvoudig worden geteld hoeveel van de in het tweede jaar zieke planten ook reeds in de vorige herfst ziek waren. Het bleek dat de zieke planten in het tweede jaar geen verband toonden met ziekte in het eerste jaar (Tabel 1). Dit houdt in, dat het belang van aantasting in het eerste jaar uitsluitend is gelegen in de productie van sclerotiën, die in het tweede jaar aan de basis liggen van vruchtlichamen, en dus mogelijke infectie.

Tabel 1. Relatie tussen infectie van karwijplanten met *S. sclerotiorum* in het eerste en het tweede jaar (gemiddeld aantal planten per 18 m rijlengte over 12 veldjes en twee rijen per veldje).

| eerste jaar | ziek | | gezond | |
|-------------|------|--------|--------|--------|
| | | 18 | | 278 |
| tweede jaar | ziek | gezond | ziek | gezond |
| | 1 | 17 | 20 | 258 |

Regressie ziek eerste jaar/ziek tweede jaar ----> $r = 0,162$ (n.s. bij $P = 0,05$, $df = 20$, Student's t test).

5.4.2. Relatie inoculumdichtheid/gewasaantasting.

Door het grote aantal ascosporen dat door één enkel apothecium kan worden geproduceerd, is het niet zonder meer duidelijk dat reductie van het aantal apotheciën noodzakelijk zal leiden tot beperking van de aantasting van het gewas. De literatuur op dit punt is niet unaniem, maar de meerderheid der gegevens wijst op een overwegende invloed van inoculumbronnen binnen het bestudeerde veld ten opzichte van bronnen uit buurpercelen. Bovendien is vaak een relatie tussen inoculumdichtheid en ziekte-incidentie beschreven. Deze relatie hangt af van de

grootte van het bestudeerde veld (Boland & Hall, 1988)². Wij vonden in veldjes van 6x6 m² stamslaboon binnen gelijkmatig besmette velden van 108 m² een circa vijfvoudige toename van de ziekte-incidentie bij een tien keer hoger aantal vruchtlichamen. Bij peen was de toename in ziekte-incidentie onder vergelijkbare omstandigheden ongeveer drievoudig (Tabel 2). Hoewel gewas, weersomstandigheden, absoluut niveau van inoculumdichtheid en perceelsgrootte alle een rol spelen, kan er geen twijfel aan bestaan, dat reductie in inoculumdichtheid met b.v. een faktor 10 zal leiden tot een aanzienlijke reductie in ziekte-incidentie.

Tabel 2. Effekt van inoculum-dichtheid van *S. sclerotiorum* op ziekte-incidentie bij boon en peen.

| Behandeling | boon | | peen | |
|----------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| | apotheciën ¹⁾ | ziekte-incidentie ²⁾ | apotheciën ¹⁾ | ziekte-incidentie ²⁾ |
| controle | 0,01 a | 4,43 a | 0,00 a | 5,43 a |
| sclerotiën, dosis 1 | 2,16 b | 13,79 a | 2,87 b | 8,07 a |
| sclerotiën, dosis 10 | 23,35 c | 63,07 b | 31,36 c | 22,79 b |

¹⁾ aantallen per m²

²⁾ aantal zieke planten aan weerszijden van 6 m rijlengte

Cijfers in kolommen die worden gevolgd door verschillende letters zijn significant verschillend ($P \leq 0,05$).

5.4.3. Onderdrukking van apotheciën door kalkstikstof.

De meststof kalkstikstof heeft een bekende nevenwerking als herbicide, en onderdrukt bovendien het verschijnen van apotheciën van *S. sclerotiorum*. In proeven met karwij werd dit effect bevestigd. In tweejarige karwij werd de grond besmet met sclerotiën. Vervolgens werd 500 kg kalkstikstof ha⁻¹ toegediend veertien dagen voor het zaaien van de karwij onder dekvrucht, resp. in het tweede jaar begin maart, bij het hervatten van de groei van het gewas. In verband met het lage aantal apotheciën en de lage ziekte-incidentie als gevolg van droge weersomstandigheden in het eerste jaar, werd een deel van het veld in het tweede jaar opnieuw besmet met sclerotiën. In het eerste jaar werd een duidelijk effect van kalkstikstof gevonden, doch de verschillen tussen behandeld en onbehandeld werden langzaam kleiner tegen het einde van het seizoen. In het tweede jaar werd geen nawerking gevonden van het eerste jaar, maar de kalkstikstof toediening van het tweede jaar bleek tot een zeer sterke reductie van het aantal apotheciën te leiden in het ten tweede male besmette deel van het veld. De ziekte-incidentie leek

² Boland, G.J. & Hall, R., 1988. Relationships between the spatial pattern and number of apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* and stem rot of soybean. *Plant Pathology* 37: 329-336.

hiermee te corresponderen. doch dit effect bleek statistisch niet significant (Tabel 3). Als conclusie kan gesteld worden, dat toediening van kalkstikstof in het oogstjaar van karwij perspectief biedt ter beperking van schade door *S. sclerotiorum*.

Tabel 3. Effect van toepassing van kalkstikstof op het verschijnen van vruchtlichamen van *S. sclerotiorum* en ziekte-incidentie van karwij op besmette grond.

| toediening kalkstikstof | | apotheciën per m ² , 1992 | ziekte-incidentie 1992 (planten m ⁻¹) | apotheciën per m ² , 1993 | | ziekte-incidentie 1993 (planten m ⁻¹) | |
|-------------------------|------|--------------------------------------|---|--------------------------------------|---------------------|---|---------------------|
| 1992 | 1993 | | | eenmalig besmet (1992) | opnieuw besmet 1993 | eenmalig besmet (1992) | opnieuw besmet 1993 |
| - | - | 0,21 ab | 0,3 | 0,02 | 1,13 a | 0,5 | 1,6 |
| - | + | 0,30 a | 0,4 | 0,02 | 0,03 b | 0,2 | 0,3 |
| + | - | 0,09 c | 0,2 | 0,04 | 1,48 a | 0,4 | 0,5 |
| + | + | 0,13 bc | 0,1 | 0,02 | 0,13 b | 0,3 | 0,1 |

Cijfers in kolommen die worden gevolgd door dezelfde letter zijn niet significant van elkaar verschillend (l.s.d. bij $P \leq 0,05$). Waar geen letters zijn weergegeven is het kalkstikstof-effect voor de betreffende waarneming niet significant.

5.4.4. Reductie van het overleven van sclerotiën door bespuiting van een ziek gewas in het eerste jaar met de antagonist *C. minitans* en gevolgen voor ziekte-incidentie in het oogstjaar.

In oriënterende laboratorium-proeven werden sclerotiën van *S. sclerotiorum* gedompeld in sporensuspensies van potentiële antagonisten, zoals *Trichoderma* spp. en *Gliocladium* spp. en de specifieke mycoparasiet *C. minitans*. De sclerotiën werden vervolgens ondiep weggelegd in potjes met potgrond. De grond werd vochtig gehouden, en na enige maanden verschenen er apotheciën, die werden geteld. Hoewel alle getoetste antagonisten afkomstig waren van sclerotiën van *S. sclerotiorum*, reduceerde alleen *C. minitans* het aantal apotheciën gedurig en in sterke mate. Daarom werd alleen met deze antagonist verder gewerkt.

Door problemen met uitwintering van karwij werd een veldproef uitgevoerd met het vergelijkbare gewas peen. Door afdekken met stro en plastic werd de peen de winter doorgehouden om in het tweede jaar in bloei en tot zaadvorming te geraken. Het gewas werd geteeld op veldjes met een kunstmatige besmetting door *S. sclerotiorum*. In de herfst van het eerste jaar werd de helft van de percelen bespoten met de antagonist *C. minitans*. Dit leidde tot infectie van de op zieke planten gevormde sclerotiën, zodat in het voorjaar van het tweede jaar op de behandelde percelen veel minder apotheciën werden aangetroffen (Tabel 4, Afbeelding 1). Tevens werd vanaf het verschijnen der apotheciën regelmatig met *C. minitans* gespoten op dezelfde percelen die ook in het najaar behandeld waren.

Deze behandelingen leidden tot een sterke reductie in aantasting van de zaad-schermen (Tabel 4).

Tabel 4. Effect van bespuiting van peen in de herfst van het eerste jaar en in het voorjaar van het tweede jaar met *C. minitans* op het aantal apotheciën en op de ziekte-incidentie.

| Behandeling | aantal apotheciën m ⁻² | aangetaste schermen (%) |
|--------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| <i>C. minitans</i> | 0,09 a | 0,46 a |
| controle | 1,67 b | 3,94 b |

Cijfers in kolommen verschillen significant ($P < 0,05$).

5.5. Algemene conclusies.

- 1. Bij tweejarige karwij leidt aantasting door *S. sclerotiorum* in het eerste jaar slechts tot indirecte schade door productie van sclerotiën, die in het tweede jaar vruchtlichamen leveren. In het eerste jaar aangetaste planten groeien in de meeste gevallen in het tweede jaar weer gezond uit.
- 2. De relatie inoculumdichtheid (apotheciën m⁻²)/gewasaantasting is aanwezig, doch hangt van veel factoren af. Reductie van de inoculumdichtheid in de orde van 90% leidt tot aanzienlijke ziekte-vermindering.
- 3. Door toepassing van kalkstikstof (500 kg ha⁻¹) vroeg in het tweede teeltjaar kan een aanzienlijke (90%) reductie in verschijnen van apotheciën worden bereikt.
- 4. Bekende antagonisten als *Trichoderma* spp. en *Gliocladium* spp. schieten tekort in het verminderen van de overleving van sclerotiën, maar de specifieke mycoparasiet *C. minitans* is hoogst effectief.
- 5. Door bespuiting van een ziek tweejarig gewas in de herfst van het eerste teeltjaar met een sporensuspensie van *C. minitans* ($5 \cdot 10^6$ sporen ml⁻¹; 1000 l ha⁻¹) wordt een zodanige beperking van het overleven van sclerotiën bewerkstelligd, dat in het volgende jaar reductie van inoculumdichtheid met $\geq 90\%$ en derhalve reductie van aantasting optreedt.

6. Publicaties

- Gerlagh, M., van de Geijn, H.M. & Verdam, B., 1993. Microbial suppression of viable sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* and white mould disease in field crops. In: Fokkema, N.J., Köhl, J. & Elad, Y. (eds.), Biological control of foliar and post-harvest diseases, IOBC/WPRS Bulletin 16 (11): 64-68.
- Gerlagh, M., van de Geijn, H.M., Verdam, B. & Fokkema, N.J., 1993. Perspective of long term biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Coniothyrium minitans*. Poster 6th International Congress of Plant Pathology, Montreal, Canada, 28

July-6 August.

- Sandys-Winsch, C., Whipps, J.M., Gerlagh, M. & Kruse, M., 1993. World distribution of the sclerotial mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *Mycological Research* **97**: 1175-1178.
- Verdam, B., Gerlagh, M. & van de Geijn, H.M., 1993. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* in caraway (*Carum carvi*). *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Universiteit Gent* **58/3b**: 1343-1347.

7. Voortgang in relatie tot de projectbeschrijving

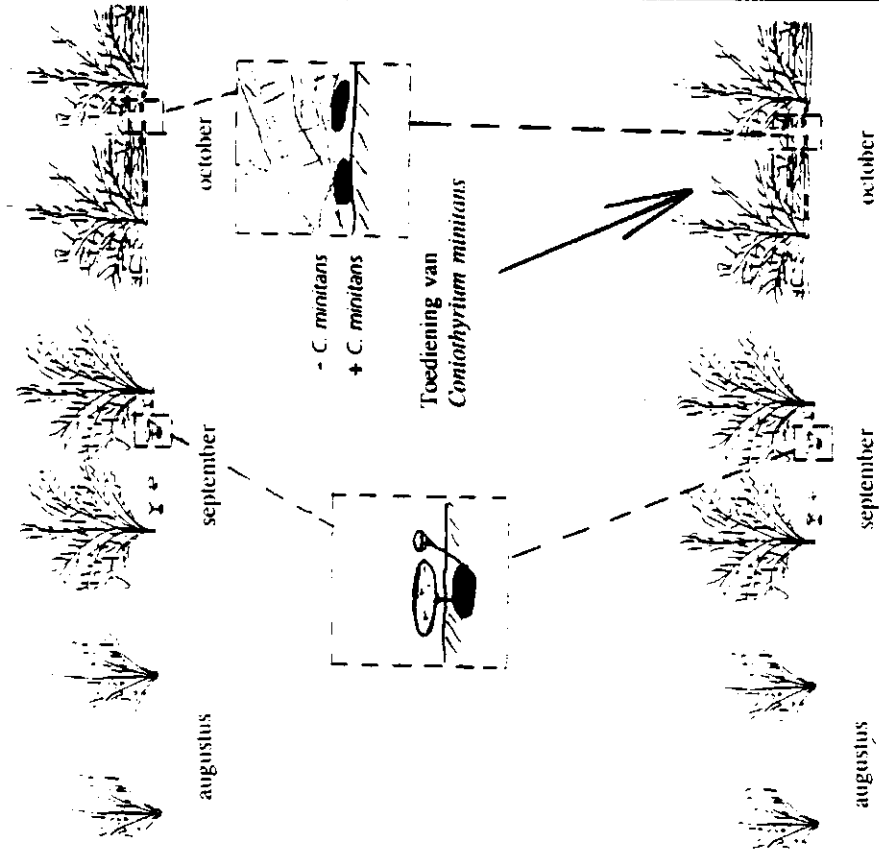
Hoewel het voortdurend een probleem was voldoende aantasting van karwij door *S. sclerotiorum* tot stand te brengen, heeft, door de integratie in het IPO-DLO-onderzoek aan biologische bestrijding van *S. sclerotiorum*, toch zodanige voortgang kunnen plaatsvinden, dat aan het einde van de periode een uitvoerbare strategie is aan te geven. Eén strategie berust op toepassing van kalkstikstof, een tweede is gebaseerd op effectief gebruik van de antagonist *C. minitans*. Beide berusten op reductie van de dichtheid van besmettingsbronnen in het tweede-jaars gewas. De noodzaak van bestrijding is afhankelijk van de door *S. sclerotiorum* te verwachten economische schade, niet alleen in het oogstjaar van het gewas zelf, maar ook in navolgende teelten. Praktische toepassing van *C. minitans* wacht nog op de toelating van de genoemde antagonist. Aan het laatste wordt verder aandacht besteed.

8. Besteding (personeel/materiëel).

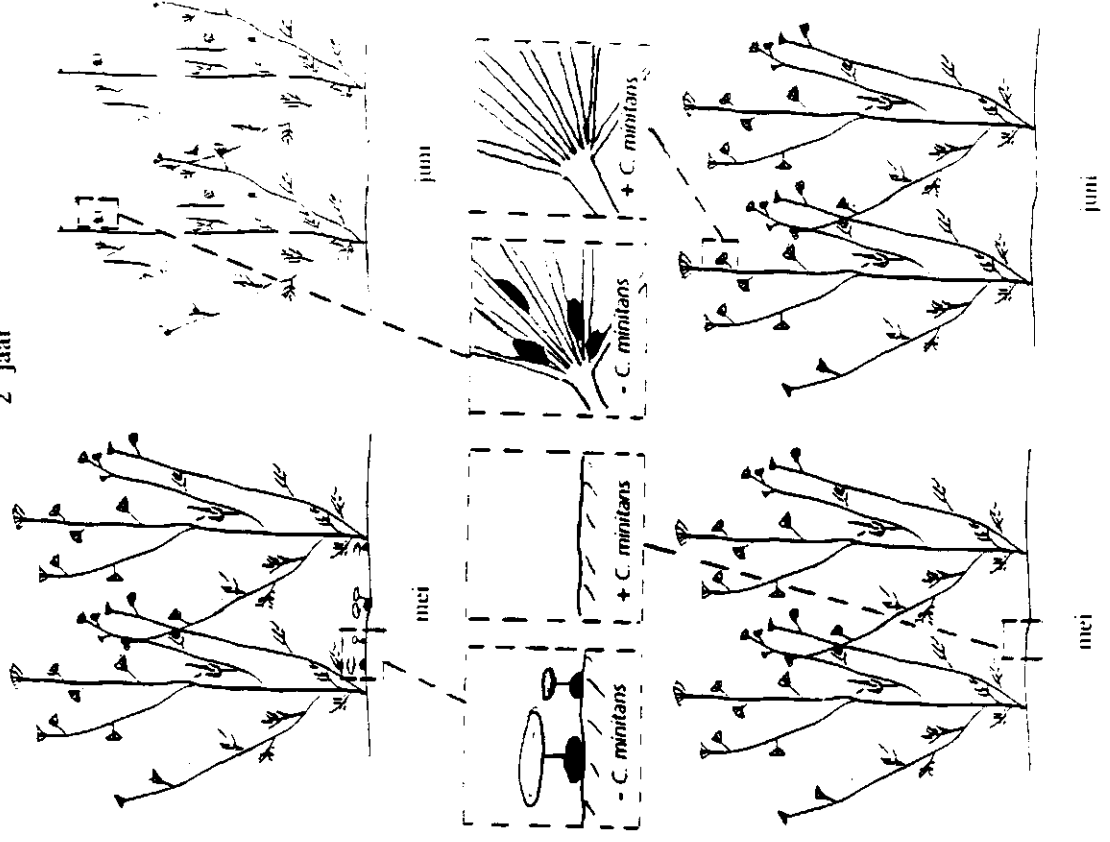
Zie bijlage.

Afbeelding 1. Schematische weergave van de toepassing van de antagonist *Coniothyrium minitans* ter bestrijding van *Sclerotinia sclerotiorum* in tweejarige karwij. (De bovenste helft geeft de controle weer. Let op vruchtlichamen in de nazomer van het eerste jaar en sclerotiën onder in het gewas in oktober. Door toepassing van *C. minitans* verschijnen er geen vruchtlichamen in het tweede jaar, en blijft het gewas gezond.)

1^o jaar



2^o jaar



INSTITUUT VOOR PLANTEZIEKTENKUNDIG ONDERZOEK (IPO-DLO)

Eindverantwoording Karwij t/m dienstjaar 1993
Raming januari t/m 15 november 1994

| Personele inzet in dagen | 1991 | | 1992 | | 1993 | | 1994 | | Totaal | |
|--------------------------------|---------|--------------|---------|--------------|---------|--------------|---------|--------|---------|--------------|
| | begroot | gerealiseerd | begroot | gerealiseerd | begroot | gerealiseerd | begroot | raming | begroot | real./raming |
| eigen aandeel | | | | | | | | | | |
| Gerlagh | 105 | 67 | 105 | 126 | 105 | 115 | 85 | 137 | 400 | 445 |
| vd Geyn | 105 | 60 | 105 | 163 | 105 | 145 | 85 | 117 | 400 | 485 |
| diversen ondersteuning | | | | 10 | | 33 | | 25 | | 68 |
| programma aandeel | | | | | | | | | | |
| Verdam | 168 | 160 | 168 | 160 | 168 | 160 | 140 | 130 | 644 | 610 |
| | 378 | 287 | 378 | 459 | 378 | 453 | 310 | 409 | 1444 | 1608 |
| materiële inzet | 1991 | | 1992 | | 1993 | | 1994 | | Totaal | |
| | begroot | gerealiseerd | begroot | gerealiseerd | begroot | gerealiseerd | begroot | raming | begroot | real./raming |
| eigen aandeel | | | | | | | | | | |
| gebruik proefbedrijf | 40 | 50 | 40 | 65 | 40 | 65 | 35 | 55 | 155 | 235 |
| gebruik resistentiekas | | 9 | | 9 | | 10 | | 8 | | 36 |
| overhead | | 40 | | 65 | | 65 | | 55 | | 225 |
| programma aandeel | | | | | | | | | | |
| overig materieel | 30 | 4 | 30 | 6 | 30 | 9 | 25 | 7 | 115 | 26 |
| | 70 | 103 | 70 | 145 | 70 | 149 | 60 | 125 | 270 | 522 |

In de gegevens van 1992 was alleen de inzet van de statisticus meegenomen. Sinds 1992 schrijft binnen het IPO-DLO iedereen tijd, ook de mensen van de TD, huishoudelijke dienst e.d. Deze dagen zijn in bovenstaande opstelling wel meegenomen. De door de ondersteuning geleverde inzet in 1991 is dus niet zichtbaar.

In deze cijfers is de inzet meegenomen van de volgende projecten:

14022 Sclerotinia sclerotiorum

14025 ecologie en biologische bestrijding in karwij

14036 vroege verbruiningsziekte in karwij

fbez*14025.wk3* (130694)

5.5 Biologie en bestrijding van de wollige karwijluis



EINDVERSLAG 1990-1993

ipo-dlo

Projecttitel: Biologie en bestrijding van de wollige karwijluis

Projectleiding: J.D. Prinsen
Medewerkers: M.N.C.P. Buijsman

Instelling: IPO-DLO, Postbus 9060, 6700 GW Wageningen

Doelstelling: Beperken van schade door wortelluis in karwij

Inhoud:

1. Inleiding.
2. Cyclus luis en gewas
3. Onderzoekresultaten
 - 3.1. Ontwikkeling op de winterwaard
 - 3.2. Ontwikkeling op de zomerwaard
4. Aanbevelingen

1. INLEIDING

De wollige karwijluis (*Pemphigus passeki* Börner) kan grote schade toebrengen aan karwij. In het verleden is meermalen sprake geweest van misoogst: in de herfst moest het gewas worden ondergeploegd. Het optreden van de luis wisselt sterk: soms is ze talrijk, in andere jaren is ze nauwelijks te vinden. Ook de relatie tussen de aanwezigheid van luis en de daarbij optredende schade is niet eenduidig: een talrijke luizepopulatie leidt niet altijd tot schade.

Het hier beschreven onderzoek vond plaats toen het insecticide Vamidothion (Kilval) nog niet voor deze toepassing beschikbaar was. Daarom concentreerden wij ons op de mogelijkheden om teelt- en omgevingsfactoren te manipuleren. Een grondige kennis van de levenswijze van de luis moet aanwijzingen opleveren hoe en wanneer daarin kan worden ingegrepen.

Een grote handicap bleek het gebrek aan ruimte en menskracht op het proefbedrijf. Vaak bleek men delen van ons proefveld te gebruiken als toegangsweg en parkeerruimte voor werkzaamheden op naburige velden, en moesten afgesproken werkzaamheden op het laatste moment langdurig worden uitgesteld omdat men voorrang gaf aan andere prioriteiten. Dit heeft de kwaliteit van onze veldproeven geen goed gedaan.

2. CYCLUS LUIS EN GEWAS

De wollige karwijluis overwintert als ei op italiaanse en zwarte populier. De veel langs wegen aangeplante canadese en Amerikaanse populieren zijn ongeschikt als waardplant. In het voorjaar komt de fundatrix of stammoeder uit het ei en vormt een gal langs de hoofdnerf van het blad. Haar gevleugelde nakomelingen verlaten omstreeks juli de gal en vliegen naar karwij waar de larven worden afgezet. Deze vermenigvuldigen zich enkele generaties als ongevleugelden op de wortels, tot er omstreeks september een gevleugelde generatie ontstaat die terugvliegt naar populier waar dwergmannetjes en -wifjes worden afgezet. Deze dwergwifjes leggen diep in de spleten van de schors een ei, waarmee

de cyclus is gesloten. Een klein deel van de populatie op de karwijwortels vormt geen vleugels maar overwintert onder de grond als luis.

Karwij wordt meestal geteeld als tweejarig gewas. Het wordt in het voorjaar gezaaid met een dekvrucht, en groeit na de oogst van de dekvrucht tot de winter door. Het daaropvolgende voorjaar bloeit het gewas, waarna het zaad geoogst wordt. Sinds 1992 is er een eenjarig ras beschikbaar, dat in het voorjaar zonder dekvrucht wordt gezaaid, en nog diezelfde zomer wordt geoogst. Wij gebruikten de rassen Bleija (tweejarig) en Karzo (eenjarig).

3. RESULTATEN

3.1. ONTWIKKELING OP DE WINTERWAARD

Er is geen relatie gevonden tussen de omvang van herfstvlucht en het aantal gallen in het daarop volgende voorjaar. Sterftefactoren als slagregens tijdens de galinductie en predatie zijn niet gekwantificeerd. De larve van de zweefvlieg *Heringia heringi* Zetterstedt predeert in gesloten gallen; in rijpe, open gallen zijn de luizen bereikbaar voor wantsen en oorwormen.

Het tellen van gallen is moeilijk. Vooral in hoge bomen wordt de waarneming beïnvloed door wind, de stand van de zon en het aantal hoeken waaronder de boom met een verrekijker kan worden bekeken. Slechts grove schattingen zijn reproduceerbaar. Herfstmigranten komen terecht in luchtwervelingen aan de lijzijde van boomgroepen en vliegen vandaar terug naar de boom, gallen komen dan ook vaak geconcentreerd voor op bepaalde takken of op de laatste boom van een rij.

Wij vonden gemiddeld 39, maximaal 123 migranten in aan de boom ingehoesde gallen. Zonder de onbedoeld ingesloten predatoren, en zonder de invloed van het kooitje zouden die waarden hoger zijn geweest.

Voorjaarsmigranten kunnen afstanden van meerdere kilometers afleggen, bij grote dichtheden moet men ook rekening houden met bronnen op tientallen kilometers afstand. Als in gele vangbakken in het veld enkele gevleugelden gevangen worden is de vlucht voldoende talrijk om het hele veld te besmetten (voor shade is meer nodig, zie 3.2.). Gele vangbakken zijn efficiënter dan donkergeel, oranje, wit of blauwgroen gekleurde, en zuigvallen zijn efficiënter dan vangbakken. Voorjaarsmigranten zijn efficiënte kolonisatoren, elke gevleugelde zet haar larven af op meerdere planten.

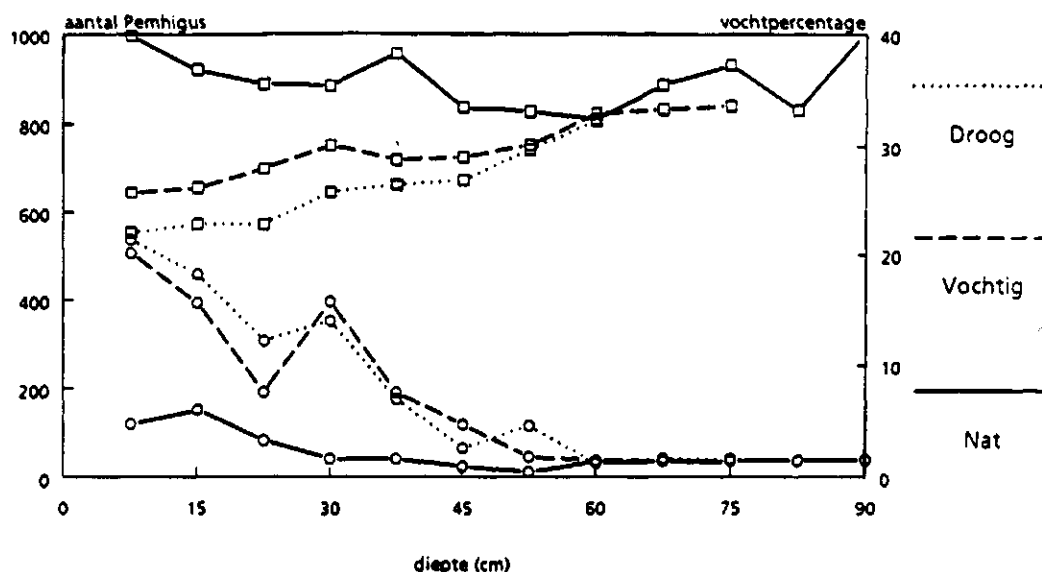
3.3. ONTWIKKELING OP DE ZOMERWAARD

De omvang van de voorjaarsmigratie (in de veldproef van 1990 in Blija zonder dekvrucht gesimuleerd door kunstmatige introductie) heeft invloed op de populatie die zich later in de zomer op de wortels van Bleija ontwikkelt, maar niet op het gewicht van de penwortels in de winter. De meeste uitkomsten van deze veldproef vertoonden helaas een te hoge variantie om significant te zijn.

De vochtvoorziening heeft een grote invloed op de aantallen luizen die zich op de wortels in kleigrond kunnen ontwikkelen. In de scheuren die in droge grond ontstaan komen wortels bloot te liggen die dan voor de luizen bereikbaar zijn. Deze hypothese werd getoetst in 1991 aan Bleija zonder dekvrucht onder overkappingen waaronder met beregening een natte,

een normale en een droge zomer werden gesimuleerd. Het meten van holten in de bodem bleek niet goed te realiseren, de grafiek toont de vervangende parameter vochtpercentage (berekend als $(v-d)d^{-1}$, v=versgewicht en d=drooggewicht) en het aantal luizen per monstereenheid (een grondcilinder met doorsnede 88 mm en hoogte 75 mm). De zomer van 1991 was zeer droog, het vochtprofiel van onze droge variant kwam tot in september overeen met de situatie onder de open hemel. De luizebezetting in de natte variant, 73.000 per m^2 was significant lager dan de 275.000 en 255.000 in de vochtige resp. droge variant. Andere jaren bevestigen de betekenis van het vochtgehalte van de bodem: in 1990, een jaar met een zeer droge julimaand, vonden we begin september 200.000 luizen per m^2 ; in 1992, een normale zomer gevolgd door een zeer natte augustus 26.000 luizen per m^2 ; in 1993, een jaar met een droog voorjaar gevolgd door natte zomer, en een vochtprofiel wat begin september ongeveer overeenkwam met de natte variant in 1991, minder dan 1000 luizen per m^2 .

luisprofiel versus vochtprofiel 2 - 5 september 1991



O = aantal Pempigus, □ = vochtpercentage

De wortelopbrengst (gemeten als het drooggewicht van de wortels die in de winter een versgewicht hadden van minstens twee gram, voldoende om het volgend voorjaar te gaan schieten) bedroeg in de natte, vochtige en droge variant resp. 93, 195, en 139 gram per m^2 . Deze verschillen zijn significant. Dit betekent dat een hoge luizenbezetting pas bij extreme droogte tot schade leidt. Extrapolatie van de groei van een gewas in de halfschaduw en luwte van onze overkappingen naar die in het vrije veld is natuurlijk niet zonder meer mogelijk.

In 1993 onderzochten we de invloed van de dekvrucht op de ontwikkeling van wortelluizen. Met Vamidothion creerden we een variant

zonder wortelluizen, daarnaast maakten we gebruik van de natuurlijke invlucht, en voegden in een paar gevallen extra luizen toe. Zie onderstaand schema voor de uitgevoerde gewascombinaties en de resultaten.

GEVONDEN WORTELLUIS. 1993. AANTALLEN PER M²

luis, aangebrachte populatie

| gewascombinatie | luis, aangebrachte populatie | | |
|-------------------------|------------------------------|------------|-------|
| | geen | natuurlijk | extra |
| Bleija | 0 | 26.000 | - |
| Bleija onder erwt | 0 | 2.400 | - |
| Bleija onder zomergerst | 0 | 0 | 0 |
| Bleija onder Karzo | 0 | 3.100 | - |
| Karzo | 0 | 1.700 | 6700 |

- variant niet uitgevoerd

Onder dekvrucht komen beduidend minder luizen tot ontwikkeling dan onder Bleija zonder dekvrucht. Opvallend is dat onder gerst geheel geen luizen werden gevonden, ook niet in de plots waar extra luis werd toegevoegd. Onder de gerst bleven de karwijplantjes klein, zelden waren er meer dan vier kleine bladeren. Omdat de gerst pas zeer laat gemaaid kon worden, kon de karwij pas laat aan haar groeispuurt beginnen. Of de wortelluizen zich hadden kunnen handhaven als de karwij eerder was lichtgesteld is niet meer vast te stellen. Duidelijk is wel dat karwij die niet of zeer langzaam groeit voor wortelluizen geen aantrekkelijke waardplant is.

Op het eenjarige ras Karzo ontwikkelen wortelluizen zich minder sterk dan op Bleija. In 1992 kon er door het natte voorjaar pas laat gezaaid worden waardoor Karzo zich veel later ontwikkelde dan in 1993: zaai op 7 mei resp. 15 maart; bloei tweede helft juli resp. eind juni; oogst 24 september resp. 6 augustus. De vlucht van de voorjaarsmigranten vond vanaf midden juli, resp. resp vanaf begin juni plaats. Beide malen vulden we dit aan met luizen van elders, maar alleen in 1992 is de wortelluis aangeslagen. Daar bleek ook dat evenals bij Bleija de omvang van de kolonisatie gevolgen heeft voor latere ontwikkelingen. In 1993 konden we op 7 meter rijlengte slechts één luis terugvinden. Dit vroege gewas is daarmee aan besmetting ontsnapt.

Op bloeiende Bleija ontwikkelen zich slechts zeer bescheiden populaties. Deze kunnen afkomstig zijn van op het gewas overwinterende (winterharde) luizen, en van voorjaarsmigranten. Als er na de oogst geen groene karwijplanten meer over zijn sterven deze populaties af voordat

er gevleugelden zijn gevormd en dragen dus niet bij tot toekomstige populaties. Als er veel planten zijn die niet tot schieten zijn gekomen, en men het gewas laat doorgroeien voor een tweede oogst, kunnen zich wel grote populaties ontwikkelen (incidentele waarneming, Oldambt).

Kennelijk is bloeiende karwij voor wortelluizen geen geschikte waardplant, en ontsnapt een vroeg bloeiend gewas aan aantasting.

Herfstmigranten ontstaan onder invloed van daglengte, en mogelijk ook door crowding. Op de stoppel van Bleija, en mogelijk ook op Karzo (weinig waarnemingen) ontstaan nauwelijks herfstmigranten, waardoor deze gewassen nauwelijks bijdragen tot de overwinterende generatie. Dit biedt mogelijkheden om in een gebied de populatie terug te brengen middels synchronisatie van de teelt (door in een bepaald jaar af te zien van het laten overstaan of zaaien van Bleija). In wegbermen in het Oldambt komt ook karwij voor, afkomstig van van de kar gevallen zaad. Hierop komen wortelluizen voor. In vergelijking met het landbouwareaal zijn deze planten verwaarloosbaar.

4. AANBEVELINGEN

Het grootste effect is te verwachten van het manipuleren van groeiomstandigheden van karwij in het jaar van inzaaien. Schade door de wollige karwijluis kan worden beperkt door:

-vochtvoorziening: voorkomen van extreme droogte beperkt de schade aan tweejarige karwij. Het Oldambt is zeer diep gedraineerd en heeft een laag polderpeil. Berekening bij extreme droogte is daar nu niet goed mogelijk. Verhoging van het polderpeil kan het optreden van droogte uitstellen. Dit vraagt nader onderzoek in andere disciplines dan de gewasbescherming.

-rassenkeuze: het eenjarige ras Karzo lijkt, door zijn korte groeiperiode, te kunnen ontsnappen aan aantasting door wortelluis. In jaren waarin het gewas laat op gang komt zal het effect minder zijn. Meer onderzoek is gewenst om hierover een betrouwbare uitspraak te doen.

-dekvruchtkeuze: een dekvrucht met dichte stand die de groei van de karwij sterk vertraagt vertraagt ook de ontwikkeling van de wortelluis. Meer onderzoek is gewenst om hierover een betrouwbare uitspraak te doen.

Hoewel de omvang van de voorjaarsmigratie in de onderzoeksjaren slechts een beperkte invloed had op aantallen luizen op de karwijwortels, hoeft de beschikbaarheid van winterwaarden natuurlijk niet gestimuleerd te worden. In natuurontwikkelingsgebieden die nu voor Groningen ontworpen worden spelen zwarte en italiaanse populieren tot nu tot geen rol. Voor bosaanplant op landbouwgebieden ligt het gebruik van zwarte of italiaanse populieren niet direct voor de hand, maar enige oplettendheid kan geen kwaad.

Of het periodiek terugdringen van de overwinterende populatie door synchronisatie van de teelt zinvol is kan op grond van het uitgevoerde onderzoek nog niet worden voorspeld.

De misoogsten uit het verleden vonden plaats in een periode dat het karwijareaal groter was dan nu. De te verwachten groei van het areaal geeft dan ook aanleiding alert te zijn op het opnieuw gevaarlijk worden van de wollige karwijluis.

INSTITUUT VOOR PLANTEZIEKTENKUNDIG ONDERZOEK (IPO-DLO)

Eindverantwoording Wollige karwijluis t/m dienstjaar 1993
Raming januari t/m september 1994

| Personele inzet in dagen | 1991 | | 1992 | | 1993 | | 1994 | | Totaal | |
|--------------------------------|----------------|---------------------|----------------|---------------------|----------------|---------------------|----------------|---------------|----------------|---------------------|
| | begroot | gerealiseerd | begroot | gerealiseerd | begroot | gerealiseerd | begroot | raming | begroot | real./raming |
| eigen aandeel | | | | | | | | | | |
| Prinsen J. | 126 | 167 | 120 | 200 | 120 | 172 | 90 | 125 | 456 | 664 |
| diversen ondersteuning | | | | 0 | | 18 | | 13 | | 31 |
| programma aandeel | | | | | | | | | | |
| Buyzman M. | 168 | 168 | 160 | 168 | 160 | 158 | 0 | 0 | 488 | 494 |
| | 294 | 335 | 280 | 368 | 280 | 348 | 90 | 138 | 944 | 1189 |
| materiële inzet | 1991 | | 1992 | | 1993 | | 1994 | | Totaal | |
| | begroot | gerealiseerd | begroot | gerealiseerd | begroot | gerealiseerd | begroot | raming | begroot | real./raming |
| eigen aandeel | 40 | | 40 | | 40 | | 40 | | 160 | |
| gebruik proefbedrijf | | 25 | | 25 | | 25 | | 19 | | 94 |
| gebruik entomologenkas | | 6 | | 4 | | 4 | | 3 | | 17 |
| overhead | | 40 | | 40 | | 41 | | 30 | | 151 |
| programma aandeel | 30 | | 30 | | 30 | | 23 | | 113 | |
| overkappingen | | 12 | | 0 | | 0 | | 0 | | 12 |
| overig materieel | | 4 | | 4 | | 3 | | 3 | | |
| | 70 | 87 | 70 | 73 | 70 | 73 | 63 | 55 | 273 | 274 |

Aanvankelijk werd binnen het IPO-DLO geen tijd geschreven door mensen vanuit de ondersteuning. Zodoende is vanaf 1993 de inzet hiervan zichtbaar gemaakt.

5.6 Vegetatieve instandhouding en vermeerdering van karwij

Projectverslag 1990-1993

1. **Projecttitel** : Vegetatieve instandhouding en vermeerdering van karwij
2. **Projectleiding** : ir. W.J. Neervoort
dr. ir. W. Bakker
- Medewerkers** : mw. W. Folkers
mw. ing. G. Huisjes
ing. D.G. Kuiper
studenten:
B. Muntinga, 1986
A. Mulder, 1987
T. de Boer, 1989
H. Coolman, 1990
J.J. Wolthuis, 1992
A. Satori (It), 1992
M. Vasciaveo (It), 1992
F. Buzenac (Fr), 1993
R. De Onffroy (Fr), 1993
3. **Samenwerking** : CPRO-DLO, RUG
4. **Doelstelling** : Optimalisatie van de vegetatieve instandhouding en vermeerdering van karwij t.b.v. de plantenveredeling
5. **Onderzoekverslag**
 - 5.1. Samenvatting
 - 5.2. Inleiding
 - 5.3. Methodes
 - 5.4. Resultaten
 - 5.5. Conclusie
6. **Publikaties**

Projectverslag 1990-1993

1. **Projecttitel** : Vegetatieve instandhouding en vermeerdering van karwij
2. **Projectleiding** : ir. W.J. Neervoort
dr. ir. W. Bakker
- Medewerkers** : mw. W. Folkers
mw. ing. G. Huisjes
ing. D.G. Kuiper
studenten:
B. Muntinga, 1986
A. Mulder, 1987
T. de Boer, 1989
H. Coolman, 1990
J.J. Wolthuis, 1992
A. Satori (It), 1992
M. Vasciaveo (It), 1992
F. Buzenac (Fr), 1993
R. De Onffroy (Fr), 1993
3. **Samenwerking** : CPRO-DLO, RUG
4. **Doelstelling** : Optimalisatie van de vegetatieve instandhouding en vermeerdering van karwij t.b.v. de plantenveredeling
5. **Onderzoekverslag**
 - 5.1. Samenvatting
 - 5.2. Inleiding
 - 5.3. Methodes
 - 5.4. Resultaten
 - 5.5. Conclusie
6. **Publikaties**

5. Onderzoekverslag

5.1. Samenvatting

In de periode 1990-1993 is op het Prof. H.C. van Hall Instituut te Groningen onderzoek verricht naar de mogelijkheden van de vegetatieve instandhouding en vermeerdering van karwij.

Verschillende delen van de plant werden op hun regeneratievermogen getoetst door ze in vitro op diverse media te zetten.

Bij het onderzoek naar de juiste mediumsamenstelling is uitgegaan van een 3-tal standaardmedia, waaraan verschillende hormonen, in verschillende concentraties en combinaties, werden toegevoegd (ca. 75 verschillende media).

Het vermogen tot volledige plantregeneratie blijkt vooral aanwezig te zijn bij onderdelen van de plant (explantaten) die uit jonge bloeiwijzen afkomstig zijn. In toenemende mate van geschiktheid kunnen genoemd worden: de schermstelen, de bloemknoppen en de bloemschermpjes (ontdaan van de bloemknoppen). De vorming van adventieve scheuten kan worden geïnduceerd, indien de genoemde explantaten, onder steriele condities, worden geplaatst op een Gamborg B5 medium met 2% suiker en de hormonen BA en NAA (0,5-2,0 mg/l) bij 16 hr licht, 3000 lux en 22 °C.

Onder deze condities werden achtereenvolgens bij schermstelen, bloemknoppen en bloemschermpjes slagingspercentages behaald van 5, 15 en 90%, indien de explantaten afkomstig waren uit de kas. Met materiaal verzameld in het veld dient rekening te worden gehouden met een verhoogde kans op endogene infecties en een terugval van de scheutinductie (ca. 50%)

Indien na 4-6 weken adventieve scheuten zijn gevormd, kunnen deze worden vermeerderd door de clusters in kleinere eenheden op te delen en over te plaatsen op een hormoonvrij MS10 medium. Voor de beworteling kan hetzelfde medium worden gebruikt, maar dienen de scheuten als individuele plantjes te worden overgezet, welke na 4 weken kunnen worden afgehard.

Ten behoeve van het CPRO-veredelingsprogramma werden 220 geniteurs, afkomstig uit diverse selecties van diploide en tetraploide karwij, volgens bovenstaande methode in weefselkweek gebracht. Het merendeel van deze geniteurs kon, middels adventieve scheutvorming, in stand worden gehouden tot het moment dat de bepaling van het oliegehalte van de oorspronkelijke planten had plaatsgevonden. Uiteindelijk konden 58 van de 65 veelbelovende geniteurs worden geklooneerd.

5.2. Inleiding

De veredeling op kenmerken, die na de bloei tot expressie komen, gaat bij kruisbevruchters zoals karwij over het algemeen traag omdat de geselecteerde moederplanten met een ongeselecteerd pollenmengsel zijn bestoven.

Indien vegetatieve vermeerdering van karwij voor de bloei of nog liever na de bloei tot de mogelijkheden behoort, kan selectie op kenmerken of eigenschappen die na de bloei tot uiting komen, efficiënter en sneller plaatsvinden.

Vanuit de literatuur (Amirato 1977; Furmanowa et al 1984; Bajaj et al 1988)) was bekend dat vegetatieve vermeerdering, via somatische embryogenese uit blad- en hypocotylweefsel van pas gekiemde karwijplantjes mogelijk is. Een groot nadeel van deze methode is echter dat geen goede fenotypische selectie van oorspronkelijke moederplanten kan plaatsvinden, waardoor ook waardeloos materiaal gedurende lange tijd in stand moet worden gehouden.

Vanuit het veredelingsonderzoek (CPRO-DLO) werd dan ook de wens geuit een effectieve methode voor de vegetatieve vermeerdering van karwij te vinden, welke in een zo laat mogelijk stadium van de plantontwikkeling is toe te passen, waarbij de betreffende moederplanten zo min mogelijk in hun groei en ontwikkeling worden geremd.

Vanuit de gestelde doelen is in de afgelopen onderzoekperiode ten behoeve van de vegetatieve vermeerdering van karwij o.a aandacht besteed aan de volgende onderwerpen:

- keuze explantaten
- ontsmettingsmethodes
- mediasamenstelling
- in vitro vermeerdering
- afharding in vitro plantjes
- kweekcondities weefselkweek
- opgroeiomstandigheden donorplanten
- genotype- en milieu-interakties
- genetische stabiliteit
- vegetatieve instandhouding en vermeerdering CPRO-selecties

5.3. Methoden

Geniteurs

Gedurende het onderzoek is gebruik gemaakt van een tiental karwijgenotypes, bestaande uit een aantal nederlandse en buitenlandse diploide rassen van winter- en zomerkarwij evenals van tetraploide selecties van winterkarwij en diploide selecties van zomerkarwij.

De zomerkarwij werd hoofdzakelijk gezaaid en opgekweekt in de kas; de winterkarwij al of niet in het vroege voorjaar opgerooid in het veld, vervolgens opgepot en tijdelijk opgeslagen in de koelcel bij 16 hr licht of direkt overgebracht naar de kas onder dezelfde lichtcondities.

In een aantal experimenten werd ook materiaal in het veld verzameld en zo snel als mogelijk in het laboratorium verwerkt.

Explantaten

Verschillende onderdelen van de plant (explantaten) zijn getest op hun vermogen tot orgaanregeneratie of scheutinductie, variërend van delen van het epicotyl, het blad de stengel en de bloeiwijze. Dit alles in relatie met diverse ontwikkelingsstadia van de verschillende explantaten en donorplanten. Tevens is hierbij de mogelijkheid bekeken of in het veld verzamelde explantaten gedurende min of meer lange tijd te bewaren zijn voordat ze in weefselkweek worden gebracht .

Desinfectie

Aangezien weefselkweek onder steriele condities en met steriel (gedesinfecteerd) uitgangsmateriaal dient plaats te vinden, zijn ook een aantal ontsmettingsmethoden beproefd, met als variabelen:

- de dompeltijd in 70% alcohol
- de dompeltijd en concentratie in en van NaClO
- het al of niet toevoegen van een uitvloeier (tween 20).

Media

Het onderzoek naar de juiste mediasamenstelling werd opgesplitst in twee aandachtspunten. Enerzijds de ontwikkeling van geschikte orgaaninducerende media (vnl. scheutinducerende media), anderzijds de ontwikkeling van geschikte vermeerderingsmedia.

Ten behoeve van de orgaanregeneratie werd als basis gekozen voor de volgende standaardmedia:

- MS medium; met en zonder vitamines + verschillende hormoonconcentraties en combinaties BA, NAA, 2,4-D, IAA en kinetine.
- MSN medium; + verschillende hormoonconcentraties en combinaties 2,4-D, IBA en AS.
- Gamborg B5 medium; + verschillende hormoonconcentraties en combinaties 2,4-D en BA of NAA en BA. Alle media werden verder voorzien van een standaard hoeveelheid suiker (2%), agar (0,8%) of gelrite (0,35%).

In totaal zijn ca. 75 verschillende media onderzocht.

Bij de experimenten ten behoeve van de in vitro vermeerdering werd uitgegaan van het gebruikelijke basismedium (MS10) zonder hormonen. In een aantal experimenten is gekeken in welke mate de groei van in vitro plantjes beïnvloed wordt door het toevoegen van geringe hoeveelheden hormonen (IAA en/of kinetine en NAA en/of BA).

In vitro instandhouding en vermeerdering CPRO-selecties

In het late voorjaar van 1992 is gestart met de in vitro instandhouding van individuele planten uit het CPRO-kweekprogramma. Deze geniteurs, behorend tot een 7-tal selecties uit het kweekprogramma t.b.v. de verbetering van het oliegehalte, groeiden in ruimtelijke isolatie op de Broekemahoeve te Lelystad of de kassen van het CPRO-DLO te Wageningen.

In totaal zijn 220 geniteurs, van zowel diploide en tetraploide winterkarwij als van diploide zomerkarwij, in weefselkweek gebracht. Per geniteur werden ter plekke 2-3 jonge bloeiwijzen verzameld en in een koelbox naar het laboratorium te Groningen vervoerd. Vervolgens werden per geniteur 30-60 van bloemknoppen ontdane bloemschermpjes verdeeld over 3 petrischalen met een Gamborg B5 medium met daaraan toegevoegd 0,25 mg NAA en 0,5 mg BA per liter, evenals 2% suiker en 0,35% gelrite.

Het doel van het gehele experiment was om deze geniteurs in stand te houden totdat de bepaling van het oliegehalte van de betreffende moederplanten had plaats gevonden. Vervolgens dienden de goede geniteurs in 25-voud te worden vermeerderd ten behoeve van het verdere kruisingsprogramma.

5.4. Resultaten

Vegetatieve vermeerdering van okselknoppen

Slechts in beperkte mate zijn uit okselknoppen van het epicotyl en de bloeistengel volledig geregenereerde planten verkregen. De beste resultaten werden behaald op een standaard MS medium met 0,5 mg NAA/l.

De meristemen groeiden veelal uit tot individuele plantjes, welke moeilijk bewortelden en nauwelijks in vitro te vermeerderen waren.

Orgaanregeneratie uit bladexplantaten

Bij bladexplantaten (al dan niet met hoofdnerf) van in vivo planten werd geen enkele reactie waargenomen in de vorm van calli- of orgaaninductie op MS media met verschillende concentraties en combinaties hormonen. Bovendien bleek een goede ontsmettingsmethode nauwelijks te combineren met een goede vitaliteit van deze explantaten.

Orgaanregeneratie uit scherm- en schermpjesstelen

Het gebruik van scherm- en schermpjesstelen voor orgaanregeneratie van karwij blijkt beter te voldoen dan de eerder genoemde explantaten. Vooral de wortelinductie levert weinig problemen op, mits jong materiaal wordt ingezet op een bewortelingsmedium op basis van MS zonder vitaminen, maar met het hormoon NAA in concentraties van 0,5-4,0 mg/l. Onder deze voorwaarden werd bij een vijftal geniteurs een bewortelingspercentage van 40-60% verkregen indien 1-2 cm lange, overlans doorgesneden, schermstelen werden gebruikt; bij het gebruik van schermpjesstelen was het bewortelingspercentage 2-12%.

Indien de bewortelde explantaten vervolgens op een hormoonvrij MS10 medium werden overgebracht, vormden zich, na ca. 2-3 maanden, adventieve scheuten aan het worteloppervlak (bij ca. 30% van de bewortelde explantaten).

Het aantal scheuten varieerde van één tot enkele tientallen per explantaat. Er werden geen duidelijke genotype-effecten waargenomen.

Op vergelijkbare media, waaraan naast NAA ook BA werd toegevoegd (concentratieniveaus 0,5-2,0 mg/l in diverse combinaties) vond wel intensieve callusvorming plaats, maar geen inductie van wortels of scheuten.

Orgaanregeneratie uit bloemknoppen

Evenals bij de vegetatieve vermeerdering van sommige Brassica's, is het ook bij karwij mogelijk gebleken uit het wondvlak van bloemsteeltjes van jonge bloemknoppen adventieve scheuten te induceren.

Deze inductie vond plaats op een Gamborg B5 medium met 2% suiker, 0,8% agar en diverse concentratiecombinaties van NAA en BA (voor beide hormonen 0,5-2,0 mg/l).

In een aantal experimenten met diverse geniteurs reageerden ca. 15% van de ingezette explantaten na 5-6 weken met adventieve scheutvorming. Indien BA aan het medium ontbrak, werden in eerste instantie alleen wortels gevormd, waaruit in enkele gevallen na 2-3 maanden scheuten ontstonden.

Orgaanregeneratie uit bloemschermpjes

De overstap van bloemknoppen naar bloemschermpjes bleek een goede keus te zijn. Omdat de bloemschermpjes ontdaan worden van de bloemknoppen en de kale schermmpjes op de kop in het medium worden geplaatst, wordt het wondoppervlak vergroot en is het contact met het medium intensiever.

Op dezelfde media, als gebruikt bij het onderzoek naar scheutinductie bij bloemknoppen, vond bij 40-60% van de ingezette bloemschermpjes scheutvorming plaats.

Deze bloemschermpjes waren afkomstig van diverse geniteurs, welke in het vroege voorjaar in het veld werden opgerooid en in de kas in bloei werden getrokken.

Toch bleken deze scheuten veelal vroegtijdig te verbruinen en moeilijk in stand te houden, ook na overplaatsing op een MS10 medium zonder hormonen.

Door in het basismedium agar (0,8%) te vervangen door gelrite (0,35%), werden de resultaten beduidend beter. Niet alleen tot uiting komend in een toename van de scheutinductie, maar ook in een drastische verbetering van de in vitro instandhouding en vermeerdering.

In een ruim opgezet experiment (ca. 100 bloemschermpjes/geniteur) met zowel 2-jarige als éénjarige karwij werden slagingspercentages behaald van 70-90% met bloemschermpjes uit de kas en 20-60% met bloemschermpjes van het veld.

Materiaal van het veld is in de regel moeilijker te desinfecteren, terwijl ook de weefselkweekreacties minder eenduidig zijn.

Gemiddeld werden de meest stabiele resultaten verkregen op een Gamborg B5 medium met daaraan toegevoegd 2% suiker, 0,35% gelrite, 0,25 mg NAA/l en 0,5 mg BA/l.

In vitro instandhouding en vermeerdering CPRO-selecties

De scheutinductie uit bloemschermpljes van individuele planten, afkomstig van 7 verschillende CPRO-selecties, verliep, met uitzondering van de in 1992 aangeleverde series (2x25 geniteurs), in het algemeen succesvol.

Bij de eerste 2 series was de besmettingsgraad relatief hoog (2-5% i.p.v. 0,5-1%) en bleek één van de series in de isolatievelden met groeistoffen te zijn bespoten. Het een en ander resulteerde in hoog een percentage uitval en vreemde groei-stoornissen van de explantaten.

Toch reageerden nog 36 van de 50 geniteurs met adventieve scheutvorming. Deze scheuten waren veelal niet erg vitaal en bleken moeilijk te vermeerderen. Uiteindelijk zijn 16 geniteurs gekloneerd (ca. 15 klonen/geniteur).

De resultaten van de navolgende series waren beduidend beter. Bij 168 van de 171 geniteurs konden scheuten worden geïnduceerd en in stand worden gehouden tot het moment dat de bepaling van het oliegehalte van de moederplanten had plaatsgevonden. Van de 65 hoogwaardige geniteurs konden er 58 worden gekloneerd ten behoeve van het verdere CPRO-kruisingsprogramma (ca. 22 klonen/geniteur).

Opvallend was de fenotypische gelijkheid van klonen afkomstig van dezelfde geniteur, in tegenstelling met de opvallende fenotypische verschillen tussen klonen van verschillende geniteurs.

Fenotypisch gezien, lijkt de in vitro vermeerdering geen invloed te hebben op de genetische stabiliteit. Ook chromosoomtellingen in delend weefsel uit de wortelpunten van gekloneerd materiaal bevestigen deze veronderstelling.

5.5. Conclusie

De resultaten geven aan dat een bruikbare methode is gevonden om karwij, in een relatief laat stadium van de plantontwikkeling, in vitro instand te houden en te vermeerderen.

Ten behoeve van de adventieve scheutvorming worden de beste resultaten verkregen indien jonge bloemschermpljes worden geplaatst op een Gamborg B5 medium, met daaraan toegevoegd 2% suiker, 0,35% gelrite en de hormonen NAA en BA (resp. 0,25 en 0,5 mg/l) bij een pH van 5,8.

Voor de verdere vermeerdering kan merendeels worden volstaan met een hormoonvrij MS10 medium.

Voor het in weefselkweek brengen van explantaten bestaat een afdoende oppervlakte sterilisatie uit: het ontvluchten en ontvetten van de explantaten in alcohol (70%) gedurende 1 minuut en het ontsmetten van de explantaten in NaClO (2%) gedurende 10 minuten.

Het afharden van in vitro plantjes verloopt vrijwel probleemloos, mits de plantjes na het oppotten gedurende een week onder plastic worden weggezet en regelmatig worden gelucht.

Het percentage uitval bedraagt ca. 5%.

Opvallend is de fenotypische gelijkenis van klonen afkomstig van dezelfde geniteur, in tegenstelling met de fenotypische verschillen tussen klonen van verschillende geniteurs.

De in vitro vermeerdering lijkt geen invloed te hebben op de genetische stabiliteit.

De resultaten van de in vitro vermeerdering van zowel zomerkarwij (2x) en winterkarwij (2x en 4x) verschillen nauwelijks van elkaar. Eventuele genotype-effecten van individuele planten zijn moeilijk te achterhalen omdat vele mogelijke verstrengelingen met niet te beheersen omstandigheden kunnen plaatsvinden.

6. Publikaties

- Ammirato, P.V., 1977. Hormonal control of somatic embryo development from cultured cells of caraway. *Plant Physiol.* 59: 579-586.
- Bajaj, Y.P.S., M. Furmanowa and O. Olszowska, 1988. Biotechnology of the micropropagation of medicinal and aromatic plants. *Biotechn. in Agr. and Forest.* Vol. 4. pp. 83-85.
- Boer, T. de, 1989. Perspectieven voor karwij; weefselkweek en nieuwe toepassingen. Van Hall Instituut. *Afstudeeropdracht 89LA03* 63 pp.
- Buzenac, F. and R. De Onffroy, 1993. Optimalization of tissue culture techniques for the in vitro propagation of caraway (*Carum carvi* L.). Van Hall Instituut. *Stageverslag* pp. 75.
- Coolman, H., 1990. Vegetatieve vermeerdering in vitro van karwij. Van Hall Instituut. *Afstudeeropdracht 90LA06* 65 pp.
- Furmanowa, M., O. Olszowska and D. Sowinska, 1984. Regeneration of plants by embryogenesis with callus cultures of *Carum carvi* L. *J. Plant Physiol.* Vol. 115. pp. 209-210.
- Satori, A. and M. Vasciaveo, 1992. Tissue culture techniques to caraway (*Carum carvi* L.). Van Hall Instituut. *Stageverslag* 58 pp.
- Wolthuis, J.J., 1992. Vegetatieve vermeerdering van karwij (*Carum carvi* L.) in vitro. Van Hall Instituut. *Afstudeeropdracht 92LA01* 63 pp.

5.7 De biologische activiteit van carvon



Projectverslag 1990-1993



1. **Projecttitel** De biologische activiteit van carvon.
2. **Projectleiding** W. Bakker, M. de Jonge
- Medewerkers** W. Folkers, D. Kuiper, G.J. Polman
- Studenten** H. Abbing, F. Benthem, R.W. Dijkhuizen,
C. Haker, G. Joling, W. Schirring, W. Waalkens
3. **Samenwerking** ATO-DLO, DLV, PAGV, RUG
4. **Doelstelling** Signalering van toepassingsmogelijkheden van
carvon in de gewas- en voorraadbescherming
5. **Onderzoekverslag**
 - 5.1 Samenvatting
 - 5.2 Inleiding
 - 5.3 Methoden
 - 5.4 Resultaten
 - 5.5 Conclusies
 - 5.6 Literatuur
6. **Publikaties**

5. ONDERZOEKVERSLAG: DE BIOLOGISCHE ACTIVITEIT VAN CARVON

5.1 SAMENVATTING

In verkennend onderzoek werd mogelijke toepassing van de uit karwij te winnen etherische olie d-carvon getoetst t.b.v. gebruik in de gewas- en voorraadbescherming. Hierbij werd voornamelijk uitgegaan van de geëxtraheerde olie als ook van enkele andere formuleringen, waaronder slow-release formuleringen.

d-Carvon heeft in laboratoriumcultures een remmende werking op de groei van het mycelium van een aantal ziekteverwekkers van planten zoals Fusarium culmorum, Pythium ultimum en Rhizoctonia solani. De effecten zijn afhankelijk van de temperatuur en de carvonconcentratie.

Bij de verwekker van de verbruiningsziekte van karwij Mycocentrospora acerina werd een beperkt effect, terwijl bij de antagonistische bodemschimmel Semphillum sp. in de gebruikte concentraties, geen negatief effect maar wel groeistimulering werd gemeten. Deze groeistimulering werd ook bij F. culmorum en M. acerina in lage doseringen bij 20 °C waargenomen.

Daarnaast geeft d-carvon in waterige oplossingen op kiemende zaden (haver, mosterd en tuinkers), bij bloembollen (tulp en lelie) behandeld vòòr het planten en op kiemplanten (haver, tomaat en tuinkers) bij relatief lage doseringen fytotoxische effecten. Het gebruik van carvon bij de zaaizaad- en pootgoed- ontsmetting middels dompeling voor het zaaien/planten is daarom niet aan te bevelen.

Wegens de grote vluchtigheid heeft toepassing in de getoetste formuleringen geen zin bij de ziektebestrijding en de bestrijding van tarweopslag in het open veld.

Toepassing van d-carvon in de gasfase bij produkten in rust zal gezocht moeten worden in een langdurende behandeling bij lage concentratie, waarbij een goede verdeling van het gas van groot belang is.

Bij een behandeling van tarwe tegen graanklanders werd door menging van het graan met de slow-release formulering van d-carvon in cyclodextrine in eerste proeven een veelbelovend resultaat verkregen.

5.2 INLEIDING

Van carvon is bekend dat het afhankelijk van de gebruikte concentratie en toedieningsvorm een groeiremmende, afwerende of dodende werking kan hebben op organismen. De kiemremmende werking op consumptieaardappelen, waarover elders in dit rapport geschreven wordt, is een voorbeeld van een toepassingsmogelijkheid van carvon bij hogere planten.

Daarnaast wordt aan carvon ook een schimmel-, bacterie- en insekten-dodende, remmende of afwerende (repellent) werking toegeschreven. In het streven het gebruik van synthetische gewasbeschermingsmiddelen te beperken, werd door het Prof. H.C. van Hall Instituut (VHI) als nevenactiviteit verkennend onderzoek uitgevoerd naar nog andere toepassingsmogelijkheden van carvon t.b.v. de gewas- en voorraadbescherming.

Gezien de vluchtigheid werd het accent gelegd op het gebruik bij zaaizaad- en pootgoed ontsmetting en het gebruik in afgesloten ruimten. Daarnaast werden nog enige andere mogelijkheden getoetst. Bij de proeven werden verschillende formuleringen van carvon gebruikt.

Gezien de noodzaak om de hoofdactiviteit van het VHI - de vegetatieve instandhouding en vermeerdering van karwij - prioriteit te geven, werden de activiteiten m.b.t. de toepassingsmogelijkheden van carvon in 1993 slechts op een beperkte schaal voortgezet.

Ontsmetting van zaaizaad en pootgoed is een zeer efficiënte methode om ziekteverspreiding te voorkomen. De effecten van carvon op enkele ziekteverwekkers in reïncultures alsmede de invloeden van een behandeling op de ontkieming van zaden, de groei van kiemplanten en bloembollen werden bepaald. Dit werd uitgevoerd middels bespuitingen, dompeling in een carvonbad en blootstelling aan carvongas. Na deze initiële proeven werd het onderzoek m.b.t. de bloembolontsmetting elders voortgezet.

Opslag van tarwe in veldbeemdgras voor de zaadoogst beconcurrereert dit gewas sterk, waardoor een grote opbrengstderving ontstaat. Tot 1991 werd deze opslag met het herbicide TCA (natriumtrichlooracetaat) bestreden. Gebruik daarvan werd in genoemd jaar verboden en er moet gezocht worden naar een andere bestrijdingswijze. Gebruik makend van de fytoxische eigenschappen van carvon werden in samenwerking met het PAGV enkele formuleringen van carvon getoetst.

Voorraadinsekten veroorzaken wereldwijd veel schade. Ter bescherming van granen, peulvruchten enz. worden o.a. synthetische middelen (methylbromide e.a.) ingezet. Het verbod op gebruik van deze middelen (in Nederland) of het niet meer mogen gebruiken van elders met deze middelen behandelde producten, vraagt om nieuwe technieken. Carvon zou een toepassingsmogelijkheid kunnen zijn en een onderzoek hiertoe werd daarom geïnitieerd.

5.3 METHODEN

In deze paragraaf worden alleen de algemeen gebruikte methoden en materialen beschreven. Bij de verschillende deelonderwerpen worden de meer specifieke technieken gegeven.

Carvon

Carvon werd in verschillende formuleringen gebruikt:

- [1] d-carvon gewonnen uit karwijolie, 95 %. Erko Brand, Erven Th. Koomen B.V. Holland, Spanbroek.
- [2] als slow-release formulering "medium". Proefmonster beschikbaar gesteld door Pennwalt Holland, Agchem Division, Rotterdam.
- [3] als slow-release formuleringen verkregen door inkapseling van d-carvon [1] in cyclodextrine (CD) (Anonymus, geen datum). Proefmonsters beschikbaar gesteld door AVEBE, Foxhol.
Gebruikte formuleringen:
 - a) 200 g beta CD, 150 ml water en 16 ml d-carvon;
 - b) 200 g beta CD, 100 ml water en 16 ml d-carvon;
 - c) 200 g beta CD, 150 ml water en 32 ml d-carvon.

[4] Luxan carvon emulsie (50%). Proefmonster beschikbaar gesteld door Luxan BV, Elst.

Voor de berekening van de gebruikte concentraties van de slow-release formuleringen in CD [3] werd aangenomen dat ca. 25% van de carvonconcentratie bij het formuleringsproces verloren ging. Meting van de carvonconcentraties in de gasfase was niet mogelijk.

Groeiomstandigheden van de planten.

Kiemingspercentages van zaden werden bepaald in een klimaatkast bij 20 °C. De planten werden geteeld in een kas (14-16 - 19-25 °C) met, wanneer nodig, aanvullende verlichting tot 16 uren/dag.

5.4 RESULTATEN

Bij een mogelijke toepassing van carvon als vervanger van synthetische bestrijdingsmiddelen zal de gebruikte concentratie zodanig moeten zijn, dat de schadeverwekkers voldoende gecontroleerd worden, maar het gewas/product geen schade ondervindt. Beide aspecten werden bij het onderzoek betrokken.

De biologische activiteiten waarop carvon getoetst is waren de volgende:

- 1) het gebruik als fungicide;
- 2) het gebruik als kiem- c.q. groeiremmer van zaden/gewassen, alsook het effect op kiemplanten;
- 3) het gebruik als insecticide;
- 4) het gebruik bij de specifieke isolatie van Mycocentrospora acerina uit de grond.

5.4.1. De fungicide werking van carvon

Het gebruik van kruiden en specerijen als traditioneel medicijn bij mens en dier is in vele culturen reeds lang bekend. Tot voor enkele decennia werd dit echter onvoldoende onderbouwd door exacte gegevens. De hernieuwde interesse in de westerse wereld in natuurlijke geneesmiddelen heeft de laatste jaren tot veel onderzoek geleid. De geneeskrachtige werking van kruiden wordt vaak toegeschreven aan de "essential oils". Karwij en dille bevatten de etherische olie carvon (Bouwmeester, 1991; Lichtenstein e.a., 1974).

Ramadan e.a. (1972a, 1972b) vonden een remmende werking van o.a. de etherische olie uit karwij en dille op een aantal voor de mens schadelijke bacteriën in laboratoriumcultures.

Farag e.a. (1989) toonden, eveneens in laboratoriumcultures, een remmende werking van de "essential oil" uit karwij op de aflatoxine producerende schimmel Aspergillus parasiticus aan. Ook werd een vermindering van de aflatoxine productie waargenomen.

Op soortgelijke wijze vonden Jirátko en Veselá (1992) met een extract uit dillezaden een remmende werking van korte duur op o.a. Rhizoctonia solani.

In onze proeven werd het fungicide effect van carvon op een aantal schimmels, waaronder ziekteverwekkers die op zaad- en pootgoed aanwezig kunnen zijn, in laboratoriumcultures getoetst. De schimmels waren: Fusarium avenaceum, F. culmorum, F. graminearum, Pythium ultimum, Rhizoctonia solani, Penicillium frequentans, Stemphiliium sp. en Mycocentrospora acerina.

Eventuele toepassing van carvon bij zaad- of pootgoedontsmetting stond ons hierbij meestal voor ogen.

Methoden

Herkomst en kweek van de schimmels

De schimmelcultures werden verkregen van het Laboratorium voor Phytopathologie LUW, Wageningen (Fusarium spp.), IPO-DLO, Wageningen (P. ultimum, P. frequentans), PAGV, Lelystad (Stemphiliium sp., M. acerina), terwijl R. solani geïsoleerd werd van aardappel. De kweek vond plaats op PDA (39g/l) in Petrischalen (diam. 85 mm) met 20 ml medium bij 24 °C. (F. avenaceum bij 20 °C) in het donker.

Toetsingstechniek

Toetsing van de fungicide werking van carvon gebeurde door:

- a) toevoegen van de carvonoplossing in een pons gaatje (diam. 22,5 mm) in het vaste medium volgens de methode beschreven door Ramadan (1972a) en El-Gengaihi en Zaki (1982).
- b) druppelen van de carvonoplossing op de vaste voedingsbodem.

De hoeveelheid carvonoplossing bedroeg 0,20 ml (formulering [1]) of 0,30 ml voor de slow-release formulering [2]. De verdunningen werden gemaakt door toevoeging van demiwater en enkele druppels Tween 20.

De carvonoplossingen werden direct of 2 dagen na het enten van de schimmel toegevoegd. Daarna werden de platen met doorzichtig plakband (tape) dichtgemaakt.

De toetsingen vonden in 3 herhalingen plaats bij de volgende temperaturen:

| | 24 | 20 | 15 | 5 (°C) |
|-------------------------|----|----|----|--------|
| <u>F. avenaceum</u> | | + | | |
| <u>F. culmorum</u> | + | + | + | + |
| <u>F. graminearum</u> | + | | | |
| <u>P. ultimum</u> | + | | | |
| <u>R. solani</u> | + | | | |
| <u>P. frequentans</u> | + | | | |
| <u>Stemphiliium</u> sp. | | + | + | + |
| <u>M. acerina</u> | | + | + | + |

Meting effecten

Gemeten werd de myceliumgroei van de schimmel per dag en de einddiameter van de kolonie na meestal 12-15 dagen.

Resultaten

In vergelijking met de verdunde d-carvonoplossingen [1] vertoonde de slow-release formulering [2] in alle eerste toetsingen een minder goede remming. Daarom werd deze formulering later niet meer gebruikt.

De belangrijkste resultaten van het effect van toediening van de d-carvonoplossingen [1] in de goed afgesloten schimmelcultures zijn gegeven in tabel 1.

Tabel 1. Effecten van d-carvonoplossing op de myceliumgroei van schimmelcultures.

| schimmel | tempe- ratuur (°C) | concentratie (ppm) | aantal dagen absolute remming | uiteindelijk effect t.o.v. blanco) ¹ |
|------------------------|--------------------------|-----------------------|-------------------------------------|--|
| <u>F. culmorum</u> | 24 | 80.000 | 13 | ++ |
| | 24 | 40.000 | 5 | + |
| | 24 | 20.000 | 3 | + |
| | 20 | 20.000 | 3 | - |
| | 20 | 2.500 | 0 | --- |
| | 15 | 20.000 | 5 | -- |
| | 5 | 5.000 | 17 | ++ |
| <u>F. graminearum</u> | 24 | 80.000 | 6 | - |
| <u>F. avenaceum</u> | 20 | 80.000 | 5 | - |
| <u>P. ultimum</u> | 24 | 80.000 | 12 | ++ |
| | 24 | 20.000 | 4 | - |
| <u>R. solani</u> | 24 | 80.000 | 14 | ++ |
| | 24 | 20.000 | 3 | - |
| | 24 | 10.000 | 0 | -- |
| <u>P. frequentans</u> | 24 | 80.000 | * | * |
| <u>Stemphilium</u> sp. | 20 | 80.000 | 0 | --- |
| | 20 | 2.500 | 0 | --- |
| | 15 | 80.000 | 0 | -- |
| | 5 | 80.000 | 0 | x |
| <u>M. acerina</u> | 20 | 20.000 | 0 | - |
| | 20 | 10.000 | 0 | -- |
| | 20 | 5.000 | 0 | --- |
| | 15 | 20.000 | 2 | - |
| | 5 | 20.000 | 9 | + |

-)¹
- ++ sterke remming
 - + gematigde remming
 - weinig remming
 - geen effect
 - stimulering groei
 - * sterke sporulering, geen duidelijk resultaat
 - x ook bij de blanco geen groei

5.4.2. Invloed van carvon op de ontkieming van zaden en de groei van planten

Als kiemremmer bij consumptieaardappelen is aangetoond dat afhankelijk van de gebruikte concentratie, duur en wijze van toediening, carvon de groei van planten kan beïnvloeden (Oosterhaven e.a., 1993).

Van dit effect zou mogelijk ook gebruik gemaakt kunnen worden bij de bestrijding van schot in tarwe en de bestrijding van tarwe-opslag in veldbeemdgras voor de zaadteelt.

Belangrijk bij het gebruik van carvon in de zaaizaad- en pootgoed ontsmetting is, dat de kieming en groei van de planten niet negatief beïnvloed worden, maar dat carvon wel werkzaam is tegen de ziekteverwekkers. Inzicht in de effecten van carvon op de kieming en groei van de betreffende gewassen is dus van wezenlijk belang. Daartoe werd een aantal experimenten uitgevoerd met zaaizaad, bloembollen en enkele kiemplanten.

A: Invloed op de kieming van zaaizaad

Methoden

In glazen Petrischalen: uitgevoerd met haver en mosterd door in een Petrischaal met daarin filtreerpapier, 10 ml van de d-carvonoplossing [1] toe te voegen en vervolgens 10 zaden te plaatsen. Na plaatsing van het deksel werd de schaal met parafilm gedicht en in een klimaatkast bij 20 °C geplaatst. 3 Herhalingen.

Carvonconcentraties: 0, 50, 100, 200, 400 ppm.

Beoordeling: kiemingspercentage.

Met de slow-release formulering [2] werden op dezelfde wijze alleen mosterdzaden getoetst in de carvonconcentraties: 0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 ppm.

In stoofdroog scherp zand: uitgevoerd in plastic koffiebekertjes gevuld met 147 g zand. Na toevoeging van 25 ml d-carvonoplossing [1] werden 5 haverzaden per bekertje gezaaid, de beker afgesloten met een deksel en in een klimaatkast bij 20 °C geplaatst. 3 Herhalingen.

Carvonconcentraties: 0, 50, 100, 200, 400 ppm.

Beoordeling: spruit- en wortellengte na 8 dagen. Hierna werden van elke getoetste concentratie aselekt 4 zaden/plantjes in potgrond overgepoot en zonder deksel bij 20 °C in de klimaatkast geplaatst. Na 8 dagen werd de ontwikkeling nogmaals beoordeeld.

In een mengsel van 50% potgrond en 50% stoofdroge grond: uitgevoerd in plastic koffiebekertjes. Na toevoeging van 10 ml d-carvonoplossing [1] werden 5 haverzaden per bekertje gezaaid. Verder als bij stoofdroog zand.

Carvonoplossingen: 0, 5, 100, 200, 400 ppm.

Beoordeling: spruit- en wortellengte na 10 dagen.

Resultaten

Na 8 dagen geeft een 50 ppm carvonoplossing [1] in de Petrischalen bij haver enige kiemremming. Deze is bij mosterd geringer. Bij 400 ppm treedt geen kieming van haver en mosterd op.

De slow release formulering [2] veroorzaakt vanaf 500 ppm een kiemremmend effect bij de mosterd. Bij 2500 ppm ontkiemen beide soorten zaad niet meer.

In een afgesloten milieu in scherp zand veroorzaakt de carvonoplossing [1] van 50 ppm bij haver een vertraagde ontwikkeling. Bij de 400 ppm oplossing is nog slechts een enkel zaad ontkiemt. Wanneer de planten daarna overgepoot worden in potgrond laten alleen de planten die een behandeling met de 400 ppm oplossing ondergaan hebben nog een groeiachterstand zien.

Wanneer de behandeling plaats vindt in een mengsel van zand en potgrond wordt ook bij de hoogste concentratie geen verschil tussen behandeld en onbehandeld waargenomen.

B: Bloembolbehandeling

In de bloembollenteelt worden de bloembollen standaard middels een (warm)waterbad waaraan een fungicide is toegevoegd, ontsmet.

Om de effecten van carvon te toetsen werden tulpe- en leliebollen in een waterbad met carvon gedompeld en leliebollen blootgesteld aan carvon in de gasfase. De concentratie van het carvon in de gasfase kon niet worden bepaald.

Methoden

I. Behandeling in dompelbad met carvon.

Experiment IA:

Gewas: Lelie; "Posito" en "Sterling Star" (met Pythium).

Ongesorteerd, niet ontsmet, bewaard bij - 2 °C.

Carvonconcentraties d-carvon [1]: 0, 12,5, 25, 50, 75, 100 ml carvon/l water.

Dompeltijden: 5, 15, 30 min.

Standaardbehandeling: 15 min dompeling in 2% Captan + 0,4% Benlate oplossing.

Per behandeling 5 bollen.

Na dompeling van de bollen in een afgesloten plastic emmer van 10 l werden de bollen aan de lucht gedroogd (max. 2 uren) en gepoot in 5 l potten gevuld met potgrond ("Posito" 3 herhalingen; "Sterling Star" 1 x) of zandgrond ("Posito" 1 x).

Beoordeling: stengellengte (wekelijks), afwijkingen, en na de bloei de ontwikkeling van het wortelstelsel.

Experiment IB:

Gewas: Lelie "Posito".

Ongesorteerd, niet ontsmet, tot 2 maanden voor de proef bewaard bij -2 °C, daarna bij 4 °C. Met kiemen van 1-5 cm.

Carvonconcentraties d-carvon [1]: 2,5, 5, 7,5, 10 ml carvon/l water.

Per behandeling 10 bollen, 1x. Verder als bij experiment IA.

Experiment IC:

Gewas: Tulp "Angelique".

Standaardmaat, niet ontsmet.

Carvonconcentraties d-carvon [1]: 0, 12,5, 25, 75 ml carvon/l water.

Dompeltijden: 5 en 30 min.

Standaardbehandeling: 5 en 30 min in Captan 1%, Sportak 0,3%, Benomyl 0,4%.

Per behandeling 6 bollen; poten na 2 uren, 7 dagen en 14 dagen bewaring bij kamertemperatuur. Geen koudebehandeling.

Beoordeling: stengellengte, afwijkingen, ontwikkeling wortelstelsel.

II. Behandeling in de gasfase van carvon.

De behandeling van de bollen vond plaats bij kamertemperatuur in een afgesloten plastic emmer, waarin op de bodem een vaatje met 150 ml carvonoplossing geplaatst was. De bloembollen werden op een gaas 15 cm boven deze vloeistof gelegd en de lucht werd middels een pompje gecirculeerd in een hoeveelheid van ca. 1½ l/uur. Voor een snelle beoordeling van de carvonwerking werden tevens enige tuinkersplantjes, tuinkers- en haverzaad behandeld.

Experiment IIA:

Gewas: Lelie "Sterling Star", "Connecticut King".

Ongesorteerd, niet ontsmet, bewaard bij -2 °C.

Carvonconcentraties d-carvon [1]: 0, 3000, 6000, 30.000 ppm.

Behandelingstijd: 2½, 5 en 7½ uren.

Standaardbehandeling: 15 min dompeling in 2% Captan + 0,4% Benlate oplossing.

Per behandeling 3 bollen van beide variëteiten. Na de behandeling werden de bollen gepoot in een mengsel van potgrond en scherp zand (2:1).

Beoordeling: stengellengte (wekelijks), afwijkingen, bloeitijdstip en na de bloei de ontwikkeling van het wortelstelsel.

Experiment IIB:

Gewas: Lelie "Sterling Star", "Connecticut King"

Ongesorteerd, niet ontsmet, bewaard bij -2 °C, daarna ca. 2 maanden bij 4 °C.

Carvonconcentraties d-carvon [1]: 0, 15.000, 30.000, 60.000 ppm.

Behandelingstijd: 2½, 5 en 7½ uren.

Per behandeling 6 bollen "Sterling Star" en 2 bollen "Connecticut King".

Verder als bij experiment IIA.

Resultaten

Dompeling: De opkomst van de leliebollen in zandgrond was beter dan die gepoot in potgrond. Bij de bollen in potgrond werd reeds bij een behandelingsconcentratie van 12,5 ml/l water een duidelijke groeiremming waargenomen, terwijl bij de bollen gepoot in zandgrond deze pas bij 75 ml/l water optrad. In de zandobjecten werd vanaf een concentratie van 25 ml/l water, schade aan de wortels opgemerkt. Bij de onbehandelde en standaardbehandelde tulpebollen werd na 2½ maand bovengrondse groei waargenomen. De behandelde bollen vertoonden een slechte opkomst of slechte groei.

Behandeling in de gasfase: Binnen een behandeling en tussen de behandelingen werden individuele verschillen waargenomen die waarschijnlijk door verschil in grootte van het uitgangsmateriaal en de vochtvoorziening veroorzaakt werden. Er werd geen negatief effect van de carvonbehandeling opgemerkt. Bij de tuinkersplantjes werd soms bij een concentratie van 30.000 en 60.000 ppm schade waargenomen, terwijl de ontkieming van zowel de haver als tuinkerszaden niet werd beïnvloed.

C: Effecten van carvon op kiemplanten

Voor het verkrijgen van informatie over de effecten van carvon op een groeiend gewas werden enige proeven uitgevoerd met kiemplanten. Eerst werden deze uitgevoerd met een grove verdunningsreeks (I), later met een meer verfijnde (II). Eveneens werd potgrond bespoten waarin vervolgens zaden ter kieming werden gelegd. In alle gevallen werden de objecten na behandeling afgedekt.

Methoden

Kiemplantbehandeling

Gewassen: tarwe, tomaat en tuinkers.

Deze werden in potgrond in kiembakjes gezaaid. Op het tijdstip van behandeling waren de plantjes respectievelijk 20, 6 en 8 cm hoog.

Carvonoplossingen:

(I) d-carvon [1] en slow-release formulering [2].

(II) d-carvon [1].

Carvonconcentratie:

(I) 0, 5.000, 10.000, 20.000 en 40.000 ppm.

(II) 0, 5.000, 8.000, 12.000, 16.000, 20.000 ppm.

Behandeling: spuiten; 200 ml per m². Na de bespuiting werden de planten in een afgesloten pedaalemmerzak bij kamertemperatuur geplaatst.

Beoordeling: op fytotoxische effecten.

Potgrondbehandeling

Gewassen: tarwe, tomaat en tuinkers.

Carvonoplossingen: d-carvon [1].

Carvonconcentraties: 0, 5.000, 10.000, 20.000 en 40.000 ppm.

Behandeling: na de bespuiting van de potgrond met 200 ml/0,1 m² in kiembakjes werd direct gezaaid. Hierna werden de bakjes in afgesloten pedaalemmerzakken weggezet bij kamertemperatuur.

Beoordeling: op fytotoxische effecten.

Resultaten

Bij behandeling (I) van de kiemplanten met de verdunde carvonoplossing vertoonde tuinkers na 4 dagen geelverkleuring van de bladeren bij een concentratie van 10.000 ppm. Bij de hogere concentraties werd een afsterven van de bladeren waargenomen. Bij een gebruik van 40.000 ppm werden alle drie soorten planten vrijwel volledig gedood. De slow-release formulering gaf na 14 dagen geen effecten te zien.

Bij behandeling (II) vertoonde tuinkers bij 8.000 ppm een geel verkleuring van de bladeren. Bij hogere concentraties stierf de tuinkers af.

Tarwe toonde geelverkleuring van de bladeren maar dit nam niet toe bij toenemende concentraties.

Bij tomaat werd bij 12.000 ppm een duidelijk toxisch effect waargenomen. De planten stierven af bij 16.000 ppm.

De potgrondbehandeling liet na 8 dagen alleen bij tuinkers in de concentraties van 20.000 ppm en 40.000 ppm enige geelkleuring van de bladeren zien.

In het algemeen is het effect van carvon bij toepassing op de grond te verwaarlozen.

D: Bestrijding van tarweopslag in de veldbeemdgraszaad teelt

In de teelt van veldbeemdgras voor de zaadoogst wordt wintertarwe algemeen als dekvrucht geteeld. Na oogst van de tarwe wordt in het veldbeemdgewas veel tarweopslag aangetroffen die door concurrentie veel opbrengstderving aan graszaad veroorzaakt.

Wegens het niet meer beschikbaar zijn van het herbicide TCA (natriumtrichlooracetate) moet naar andere oplossingen gezocht worden. In samenwerking met het PAGV/NGC werd een kasproef met carvon in verschillende formuleringen uitgevoerd om de eventuele toepasbaarheid van dit middel te bepalen.

De gebruikte formuleringen en concentraties van carvon waren:

- de Luxan carvon emulsie (50%) [4]; 6,12 en 18 kg/ha,
- de CD slow-release formuleringen [3a en 3b]; 3 en 6 kg/ha.

Na bespuitingen van de kiemende tarwe in potten werden deze zonder toedekking in het veld geplaatst. In Baltus e.a. (1994) is deze proef uitvoeriger beschreven. Geen van de bespuitingen verhinderde de ontkieming en ontwikkeling van de tarwe in voldoende mate. De cyclodextrine formuleringen bleken niet geschikt voor een bespuitingstoepassing wegens onvoldoende suspensievorming in het water.

5.4.3 Isolatie van Mycocentrospora acerina uit de grond

In Nederland is de verbruiningsziekte, veroorzaakt door de schimmel Mycocentrospora acerina, een belangrijke ziekte van karwij (Evenhuis, 1991). Deze schimmel heeft nog vele andere waardplanten waaronder dekvruchten van karwij. De grond, waarin de chlamydosporen van de schimmel achterblijven, wordt beschouwd als de belangrijkste infectiebron voor het gewas. Om inzicht te krijgen in de infectiedruk vanuit de grond werd met het PAGV samengewerkt voor de ontwikkeling van een selectieve opsporingstechniek.

Door middel van uitplating van de waterfractie van gezeefde bodemsuspensies op een PDA-voedingsbodem waaraan d-carvon [1] toegevoegd was, werden andere bodemorganismen voldoende onderdrukt om inzicht te krijgen in de infectiedruk van M. acerina vanuit de grond. In het verslag van het PAGV in dit rapport wordt hierop nader ingegaan.

5.4.4. Carvon bij de bestrijding van voorraadinsekten

Vorraadinsekten - o.a. klanders, meelwormen, spektorren - behoren tot de belangrijkste directe of indirecte schadeverwekkers van bewerkt of onbewerkt voedsel in opslag.

Vooraf in tropische gebieden doen zij veel schade, maar ook in gematigde gebieden dient men voorzorgmaatregelen tegen deze insekten te nemen. Naast preventieve maatregelen - hygiëne - waarbij bij het schoonmaken van de opslagruimten veelal een behandeling van de ruimte (silo, scheepsruim, container) met een insecticide of begassing (o.a. methylbromide) is opgenomen, kan ook het op te slaan produkt zelf behandeld worden. In Nederland en elders wordt het gebruik van chemische bestrijdingsmiddelen op het voedsel zelf echter sterk aan banden gelegd.

In de traditionele landbouw worden de voedselvoorraden op de bedrijven beschermd d.m.v. gebruik van as en scherp zand, middels verdelen van gemalen gedroogde bladeren, of door gebruik van oliën uit zaden van b.v. munt (Mentha spicata), de boom "neem" (Azadirachta indica) en andere planten (Stoll, 1986). Su (1985) toonde o.a. aan dat extracten uit dille een dodende of afwerende werking hebben op enkele voorraadinsekten o.a. Sitophilus oryzae, de rijstklander, terwijl Shaaya (1991) duidelijk verschillen waarnam t.a.v. de effecten van 28 "essential oils" uit meerdere specerijen en kruiden op enkele voorraadplagen.

Lichtenstein e.a. (1974) vonden ook een synergistische werking van d-carvon op een aantal chemische insecticiden.

In bovenstaande proeven werd de werking veelal aangetoond d.m.v. direct contact met het middel of als fumigans.

De door ons uitgevoerde proeven hadden in de eerste plaats het ontwikkelen van een goede toetstechniek om het effect van d-carvon op een aantal voorraadinsekten te bepalen, tot doel. Daartoe werden proeven uitgevoerd met de broodkever (Stegobium paniceum), Callosobruchus chinensis en de graanklander Sitophilus

granarius. Alleen van deze laatste kon met voldoende grote aantallen gewerkt worden. Daarom worden alleen hiervan de resultaten gerapporteerd.

Methoden

S. granarius was afkomstig van het Laboratorium voor Entomologie LUW en werd gekweekt op tarwe in 5 l weckflessen in een klimaatkast bij ca. 28 °C en een relatieve vochtigheid van 70 - 90%.

De behandelingen vonden onder dezelfde omstandigheden plaats. De proeven werden uitgevoerd in 1 l weckflessen. Bij gebruik van d-carvon [1] werd deze in een vaatje op de bodem van de weckfles gebracht. Enkele cm boven dit vaatje werd op een gaas geïnfecteerde tarwe (ei-, larvale- en pop stadium van het insect) of schone tarwe waaraan volwassen klanders toegevoegd werden, in afgesloten zakjes van luizegas geplaatst. De weckfles werd hierna gesloten.

De CD slow-release formuleringen [3] werden getoetst door menging van een hoeveelheid poeder met 50 g tarwe in een glazen potje van 400 ml. Na toevoeging van de klanders werd het potje met een deksel afgesloten.

Carvonconcentraties:

d-Carvon [1]: de hoeveelheid gebruikte carvon lag tussen 0 en 3 ml indien nodig aangevuld met water tot een gelijk volume.

CD slow-release [3]: de proeven werden uitgevoerd met 10 mg formulering a en b en 5 mg formulering c. Omdat niet voldoende klanders beschikbaar waren, werd de proef in enkelvoud uitgevoerd.

Beoordeling:

Afhankelijk van de proef werd na 1 - 2 weken het aantal dode volwassen klanders geteld.

Resultaten

De proeven uitgevoerd met de d-carvon formulering [1], gaven wisselende resultaten te zien zowel bij toepassing op volwassen dieren als op de jeugd stadia. In de ene herhaling werd een duidelijk effect van de carvon aangetoond, in een andere herhaling in het geheel niet.

Bij de proef met de slow-release formuleringen [3] waren alle volwassen klanders na ca. 10 dagen dood.

5.5. CONCLUSIES

De eigenschappen van een stof bepalen primair zijn toepassingsmogelijkheden. Voor toepassing van d-carvon in de gewasbescherming geldt hetzelfde, waarbij de prijs van het produkt en een goede formulering eveneens belangrijke factoren zijn. De belangrijkste kenmerken van d-carvon t.a.v. mogelijke inzetbaarheid als gewas-/voorraad beschermingsmiddel zijn:

- de remmende/dodende/afwerende werking tegen micro-organismen, insecten en andere schadeverwekkers;
- de fytotoxiciteit en de vluchtigheid.

Deze eigenschappen zijn afhankelijk van de gebruikte concentratie, toedieningsvorm en plaats van gebruik. In een tijd waarin het gebruik van synthetische middelen beperkt wordt, is het feit dat het een natuurlijk produkt betreft - gemakkelijk afbreekbaar en geen schadelijke residuën - en de geringe toxiciteit voor warmbloedigen (Chan, 1990) kenmerken die als zeer positief worden gewaardeerd. Daarnaast leggen de sterke vluchtigheid, de sterke geur en de gemakkelijke adsorptie door organische stof en kunststoffen beperkingen t.a.v. het gebruik op, tenzij specifieke formuleringen beschikbaar zijn.

In ons verkennend onderzoek komt de remmende c.q. dodende werking van d-carvon op enkele ziekteverwekkers bij planten, zoals Fusarium culmorum en Pythium ultimum, gemeten aan de mycelium groei van cultures in Petrischalen, in grote lijn overeen met de vindingen van Jirátko en Veselá (1992). Of d-carvon ook in dezelfde mate werkzaam is tegen de sporen van de schimmels of dat deze meer tolerant zijn zoals Ramadan e.a. (1972b) bij bacteriën aantoonde, werd niet in het onderzoek betrokken.

Door de grote vluchtigheid en de sterke adsorptie door organische stof zijn toepassingen in het open veld tegen schimmels in de getoetste formuleringen niet effectief. Dit geldt ook voor de bestrijding van schot in tarwe (Darwinkel, 1992) en voor de bestrijding van tarweopslag in veldbeemdgras voor de zaadteelt (Baitus e.a., 1994).

Toepassingen bij de ontsmetting van zaaizaad en bloembollen middels dompeling in een waterbad met carvonconcentraties die de pathogenen voldoende doden, geven grote kans op fytotoxische effecten of praktische bezwaren (zaaizaad). Gebruik als fumigans waarbij d-carvon gedurende langere tijd (dagen - weken?) in lage dosering toegediend wordt, biedt mogelijk meer perspectief. Dit omdat carvon bij in rust verkerend weefsel mogelijk minder snel fytotoxische effecten geeft, terwijl de pathogenen (zeker die aan de buitenkant van de produkten) wel voldoende bestreden worden.

Het verkrijgen van een goede en konstante verdeling van de carvon tijdens de behandelingsperiode is dan van groot belang.

De eerste resultaten met de in cyclodextrine opgenomen slow-release formuleringen, die als droge stof gemengd werden met graan t.b.v. de voorraadbescherming tegen klanders bieden een goed perspectief om dit onderzoek voort te zetten. Daarbij zou eventueel verbreding van het werkingsspectrum door menging met andere essentiële oliën betrokken moeten worden (Shaaya e.a. 1991).

Daar synthetische middelen in de voorraadbescherming elders in de wereld nog regulier gebruikt worden, zal de door Lichtenstein e.a. (1974) waargenomen synergistische werking van carvon op residuën van die middelen in voedingsprodukten in een eventueel vervolgonderzoek ook getoetst moeten worden. Beperking van het gebruik van synthetische middelen zou mogelijk ook bereikt kunnen worden door menging hiervan met carvon.

5.6. LITERATUUR

- Anonymus, geen datum. Molecular encapsulation by cyclodextrins. Publikatie AVEBE, Foxhol, Nederland en Chinoïn Pharmaceutical and Chemical Works Ltd., Boedapest, Hongarije. Ref. no.: 05.10.02.133 EF, 18 pp.
- Baltus, P., G.J. Polman & W. Bakker, 1994. Tarwe opslagbestrijding met carvon. Jaarboek PAGV 1993/1994, in druk.
- Bouwmeester, H.J., 1991. Karwijzaad. De produktie en het gehalte aan etherische olie. In: Gewasdiversificatie en agrificatie (W.J.M. Meijer & N. Vertregt red.): 24-36. Deel 4 Agrobiologische Thema's. CABO-DLO, Wageningen.
- Chan, PO C., 1990. NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of d-carvone (cas no. 2244-16-8) in B6C3F₁ mice (Gavage studies). U.S. Department of Health and Human Services. NTP TR 381, 40 pp.
- Darwinkel, A., 1992. Effect van karwij-olie op schot in een veldgewas tarwe. Jaarboek PAGV 1991/1992: 76-77.
- Evenhuis, A., 1991. Literatuurstudie naar de biologie van Mycocentrospora acerina. Interne mededeling PAGV no. 767. PAGV Lelystad, 30 pp.
- El-Gengaihi, S. & D. Zaki, 1982. Biological investigation of some essential oils separated from Egyptian plants. Herba Hungarica tom.21 no.1.
- Faraq, R.S., Z.Y. Daw & S.H. Abo-Raya, 1989. Influence of some spice essential oils on Aspergillus parasiticus growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. Journal of Food Science 54: 74-76.
- Jirátko, J. & G. Veselá, 1992. Effect of plant extracts on the growth of plant pathogenic fungi in vitro. Ochr. rostl. 28: 241-249.
- Lichtenstein, E.P., T.T. Liang, K.R. Schulz, H.K. Schnoes & G.T. Carter, 1974. Insecticidal and synergistic components isolated from dill plants. J.Agr. Food Chem. 22: 658-664.
- Oosterhaven, K., K.J. Hartmans & H.J. Huizing, 1993. Inhibition of potato (Solanum tuberosum) sprout growth by the monoterpene S-carvone: Reduction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity without effect on its mRNA level. J. Plant Physiol. 141: 463-469.
- Ramadan, F.M., R.T. El-Zanfaly, F.A. El-Wakeil & A.M. Alian, 1972a. On the antibacterial effects of some essential oils. I. Use of the agar diffusion method. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 2: 51-55.
- Ramadan, F.M., H.T. El-Zanfaly, A.M. Alian, F.A. El-Wakeil, 1972b. On the antibacterial effects of some essential oils. II. Studies on semi-solid agar phase. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm. 1: 96-102.
- Shaaya, E., U. Ravid, N. Paster, B. Juven, U. Zisman & V. Pissarev, 1991. Fumigant toxicity of essential oils against four major stored-product insects. Journal of Chemical Ecology 17: 499-504.
- Stoll, G., 1986. Natural crop protection based on local farm resources in the tropics and subtropics. Verlag Josef Margraf, Langen, Germany.
- Su, H.C.F., 1985. Laboratory study on effects of Anethum graveolens seeds on four species of stored-product insects. Journal of Economic Entomology 78: 451-453.

6. PUBLIKATIES

- Abbing, H. & W. Schirring, 1990. De biologische activiteit van carvon. Prof. H.C. van Hall Instituut, Groningen. Afstudeeropdracht, verslag no. 1990/L4A7. 52 pp.
- Baltus, P., G.J. Polman & W. Bakker, 1994. Tarwe opslagbestrijding met carvon. Jaarboek PAGV 1993/1994, in druk.
- Bentham, F. & C. Haker, 1993. De bestrijding van de graanklander met behulp van carvon. Prof. H.C. van Hall Instituut, Groningen. Afstudeeropdracht, verslag no. 93/LA/05. 88 pp.
- Dijkhuizen, R.W., 1992. Effecten van carvon in gasfase op een aantal gewassen. Prof. H.C. van Hall Instituut, Groningen. Afstudeeropdracht, verslag no. 92/LA/09. 35 pp.
- Waalkens, W. & G. Joling., 1991. Biologische activiteit van karwijolie/carvon. Prof. H.C. van Hall Instituut, Groningen. Afstudeeropdracht, verslag no. -. 64 pp.

**ONDERZOEKSPROGRAMMA TER VERBETERING VAN KARWIJ ALS AKKERBOUW-
GEWAS EN TER INTRODUCTIE VAN NIEUWE AFZETMOGELIJKHEDEN**

FINANCIELE VERANTWOORDING 1993

De bestedingen bij het Prof. H.C. van Hall Instituut t.b.v. de onderdelen vegetatieve instandhouding van karwij en de biologische activiteit van carvon waren voor de periode 1 oktober 1992 - 31 december 1993 als volgt:

Personeel

| | Begroot (voor 1 jaar) | | Gerealiseerd | |
|--------------------------|-----------------------|--------|--------------|--------|
| | md | bedrag | md | bedrag |
| <u>Eigen aandeel</u> | | | | |
| Onderzoekleiding | 2,7 | 1.890 | 7,5 | 5.250 |
| Assistentie | 24,1 | 7.200 | 30,5 | 9.150 |
| <u>Programma-aandeel</u> | | | | |
| Onderzoekleiding | 12,3 | 8.610 | 14,8 | 10.400 |
| Assistentie | 109,9 | 33.000 | 143,6 | 43.090 |
| Totaal personeel | 149 | 50.700 | 196,4 | 67.890 |

Materieel

| | | |
|--------------------------|--------|-------|
| <u>Eigen aandeel</u> | 3.500 | 1.478 |
| <u>Programma aandeel</u> | 10.210 | 4.630 |
| Totaal materieel | 13.710 | 6.108 |

| | |
|---------------------|--------------|
| Apparatuur | - |
| Verbruiksartikelen | 3.462 |
| Lab./kasgebruik | - |
| Reis- verbl. kosten | 1.490 |
| Lit. + diversen | <u>1.156</u> |
| | 6.108 |

5.8 Invloed van S-carvon op de spruitgroei van aardappelen en op de functionele en structurele eigenschappen van biologische membranen

Projectverslag 1990-1993



Agrotechnologisch Onderzoeksinstituut (ATO-DLO)
Bornsesteeg 59
Wageningen

ATO-DLO

Vakgroep Microbiologie
Rijks Universiteit Groningen
Kerklaan 30
Haren



1. **Invloed van S-carvon op de spruitgroei van aardappelen en op de functionele en structurele eigenschappen van biologische membranen.**

2. **Projectleiding** Drs. Ing. J. Oosterhaven (ATO-DLO)
Dr. B. Poolman en Prof W.N. Konings (RUG)

Medewerkers B. Nieuwenhuizen (RUG)

3. **Samenwerking** Drs. K. J. Hartmans (ATO-DLO)
Dr. B Jansen (LUW Organische Chemie)
Dr. J. Sikkema (LUW Industriële Microbiologie)

4. **Doelstelling**

ATO-DLO Inzicht verkrijgen in het werkingsmechanisme van carvon als kiemremmingsmiddel van aardappelen.

LUW Het verkrijgen van inzicht in de antimicrobiële werking van karwijolie.

5. Onderzoeksverslag

5.1 Samenvatting

Bij gebruik van S-carvon als spruitremmer en als stof met een antimicrobiële werking, komt meteen de vraag naar voren hoe het werkt. Niet slechts uit wetenschappelijke belangstelling komt deze vraag voort. Kennis over het werkingsmechanisme kan tevens iets zeggen over de toedieningsvorm en -frequentie en over het mogelijke gebruik van S-carvon op produkten/organismen die één of andere vorm van spruit- of groeiremming behoeven.

Het effect van S-carvon op de spruiting van aardappelen is overtuigend: het kan de spruitvorming gedurende geruime tijd blokkeren. Fysiologisch onderzoek aan intakte knollen die niet spruiten is lastig uit te voeren: er is geen spruit waaraan (biochemische) analyses gedaan kunnen worden. Daarom is gebruikt gemaakt van een systeem waarbij een deel van de knol wordt geïsoleerd waarop precies één spruit aanwezig is. Deze wordt op een vochtig, inert materiaal geplaatst en het knolstukje levert alle voedingsstoffen die benodigd zijn voor de groei van de spruit. Bij gelijke lengte van alle spruiten, wordt S-carvon toegediend en deze, en controle spruiten, worden onderworpen aan biochemische analyses. Blootstelling van spruiten aan S-carvon geeft een spoedige remming van de lengtegroei, terwijl controle spruiten in dit systeem gedurende lange tijd doorgroeien. S-carvon bevat een α - β -onverzadigde ketongroep en deze structuur blijkt een essentiële rol te spelen in het groeiremmingsproces. Ook de isopropenylgroep draagt bij aan het groeiremmingseffect. De spruitgroeiremming, veroorzaakt door S-carvon, is reversibel. Dit maakt het mogelijk S-carvon tevens te gebruiken als een tijdelijke spruitgroeiremmer voor pootgoed.

S-carvon wordt omgezet door aardappelweefsel. Het voornaamste omzettingproduct is neoisodihydrocarveol. Daarnaast komen nog andere, gereduceerde en geoxideerde verbindingen voor. Met ^{13}C -gelabeld S-carvon is aangetoond dat alle produkten inderdaad omzettingproducten van S-carvon zijn. Naast vrije carvonafgeleide produkten komen er ook wateroplosbare carvon-metabolieten voor. De identiteit van deze verbindingen zijn nog niet vastgesteld.

De remming van de spruitlengtegroei is gecorreleerd met het aktivitetsverlies van 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzym A reductase (HMGR). Dit is een sleutelenzym in de mevalonzuurroute, een route die leidt tot de synthese van o.a. hormonen (gibberelline, abscisine en cytokinine), sterolen en ademhalingsketencomponenten. In S-carvon behandelde spruiten is de HMGR-activiteit na drie dagen grotendeels en na vier dagen bijna geheel verdwenen. Enzymen uit de citroenzuurcyclus, vertonen geen verschillen in activiteit in controle en in S-carvon behandelde spruiten. Gebruik van specifieke antilichamen tegen het HMGR heeft aangetoond dat het aktivitetsverlies gepaard gaat met een blokkering van de synthese van het enzym. Het HMGR mRNA-nivo is echter niet gewijzigd door een S-carvon behandeling. Hoe de regulatie precies verloopt is nog niet opgehelderd, maar er vinden klaarblijkelijk post-translationele processen plaats die de aanwezigheid van het HMGR beïnvloeden.

De wondheling van aardappelen wordt gedeeltelijk geblokkeerd door S-carvon: de vorming van suberine vindt ca. 10 dagen later plaats t.o.v. controle wondhelend weefsel. De vorming van een cambiumlaag vindt nagenoeg niet plaats tot 21 dagen

na verwonding. Ondanks het feit dat S-carvon in een concentratie van ca. 15 mg/kg vers gewicht over de gehele periode aanwezig is, vindt er toch suberisatie plaats; m.a.w. het weefsel heeft zich aangepast aan de aanwezigheid van S-carvon. De uitgestelde suberisatie correleert met de activiteit van phenylalanine ammonia lyase (PAL), een enzym dat betrokken is bij de suberinevorming. Indien het wondhelingsproces eenmaal geïnitieerd is, heeft S-carvon nog wel een vertragend effect maar het proces wordt wel verder afgemaakt.

Aardappelweefsel reageert op een S-carvon behandeling met een stressreactie. De concentratie glutathion in het weefsel neemt toe van zowel de geoxideerde als van de gereduceerde vorm. Dergelijke reacties worden verondersteld een rol te spelen bij adaptatie van het weefsel aan stress-omstandigheden. S-carvon wordt klaarblijkelijk door aardappelweefsel herkend als een xenobiotische, niet-planteigen, verbinding waaraan het weefsel zich weet aan te passen.

S-carvon heeft een antimicrobiëel effect op o.a. melkzuurbacteriën in het concentratiegebied van 1 tot 10 mM. De groeiremming bleek het grootst bij de verzadigingsconcentratie van S-carvon (ca. 8 mM). De groeiremming van o.a. Lactococcus lactis, E. coli en Streptococcus thermophilus die optrad bij S-carvon concentraties van ca. 5 mM bleek goed te correleren met de ophoping van S-carvon in de cytoplasmamembraan. Hierdoor werd de protonenpermeabiliteit verhoogd, waardoor de "proton motive force" werd verlaagd met als gevolg dat de energietoestand van de bacteriën werd aangetast.

5.2 Inleiding

Carvon komt in de natuur in twee (spiegelbeeldige) vormen voor. S-carvon kan worden gewonnen uit de etherische olie van o.a. karwijzaad (Carum carvi L.) en dillezaad (Anethum graveolens L.). R-carvon komt van nature voor in de etherische oliën van o.a. hertsmunt (Engels: spearmint) en de etherische olie van Gingergrass bevat beide structuurisomeren. Naast het gebruik van S-carvon als geur- en smaakstof, kan het ook worden aangewend om de spruitvorming van aardappelen en de groei van diverse schimmels en bacteriën te remmen (Oosterhaven 1991a, 1991b, Hartmans et al. 1993). Bij toepassing van S-carvon als spruit- en bacteriegroeiremmer, komt meteen de vraag naar voren hoe het werkt. Deze vraag komt niet slechts uit wetenschappelijke belangstelling voort. Kennis over het werkingsmechanisme kan tevens iets zeggen over de toedieningsvorm en -frequentie en over het mogelijke gebruik van S-carvon op andere producten die één of andere vorm van spruitremming behoeven.

Monoterpenen hebben de eigenschap om de kieming van zaden te blokkeren en de groei van diverse micro-organismen te remmen. Er was tot op heden weinig bekend over het werkingsmechanisme van monoterpenen in het algemeen of van S-carvon in het bijzonder. Daarom is binnen dit deel van het karwijproject aandacht besteed aan de fysiologische en biochemische effecten van S-carvon op zowel spruitgroei (uitgevoerd op het ATO) als op de groei en energiehuishouding van micro-organismen (RUG, vakgroep microbiologie).

Gebaseerd op literatuurgegevens, waarin de effecten van geoxygeneerde monoterpenen op de cholesterolhuishouding waren beschreven, werd de hypothese opgesteld dat S-carvon de activiteit van het 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzym A reductase (HMGR) in de spruit zou remmen. Inname van bijv. menthol of borneol door ratten en vogels, leidde tot een vermindering van ca. 50% van de (lever)-HMGR activiteit. Het HMGR speelt ook in plantaardig weefsel een belangrijke rol en katalyseert de omzetting van 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A tot mevalonaat. Mevalonaat is een precursor voor de synthese van isopentenylpyrofosfaat, dat een centrale bouwsteen is voor de vorming van hormonen, bestanddelen van de celmembranen, ademhalingsketen enz. Het HMGR wordt verondersteld het sleutelenzym te zijn in de route en daarmee tevens snelheidbepalend te zijn. De hypothese dat S-carvon de HMGR-activiteit remt, is getoetst op een spruitsysteem en op de wondhelingsreactie van aardappelen.

Het effect van S-carvon op de groei en energiehuishouding van micro-organismen is bestudeerd in bacteriën met een verschillend metabolisme/fysiologie (anaeroob versus aeroob en gram⁺ versus gram⁻). Daarbij speelde de gedachte dat monoterpenen, die lipofiel van aard zijn, zich ophopen in de cytoplasmamembraan en daarmee de structuur en barrierefunctie van deze lipide-bilaag verstoren. Aangezien de cytoplasmamembraan een centrale rol speelt in het energiemetabolisme van de cel, zou S-carvon van directe invloed kunnen zijn op de energietoestand en daarmee samenhangend de levensvatbaarheid van micro-organismen. Deze hypothese is getoetst door effecten van S-carvon in vivo en in artificiele membraansystemen te bestuderen.

5.3 Methoden

Aardappelspruitgroei. Het is niet mogelijk om biochemische veranderingen aan

niet-gespruite aardappelen, ten gevolge van een S-carvon behandeling, te onderzoeken. Daarom is gebruik gemaakt van een spruitsysteem waarbij geïsoleerde knolstukjes, met precies een spruit, op een inert vochtig materiaal worden geplaatst. Nadat alle spruiten ongeveer dezelfde lengte hadden, is S-carvon toegediend, waarna op gezette tijdstippen monsters zijn genomen en geanalyseerd. Hierbij bleek het mogelijk de effecten van S-carvon op de spruitlengte-groei en de reversibiliteit ervan, alsmede biochemische veranderingen, te bestuderen.

Het tweede systeem wat gehanteerd is, waren verwonde aardappelknollen. Daarbij was het mogelijk om de effecten van S-carvon op de wondheling te onderzoeken (voor beschrijvingen van de exakte methoden wordt verwezen naar Oosterhaven et al. 1994).

De concentratie van S-carvon en van de bioconversie-producten, is in beide systemen bepaald middels (Oosterhaven et al. 1994). Enzymanalyses en overige biochemische technieken zijn uitgevoerd volgens Oosterhaven et al. (1993 en 1994).

Bacteriegroei. De effecten van S-carvon op biologische membranen zijn bestudeerd in proteoliposoom model membraansystemen. In deze proteoliposomen is het effect van S-carvon op de protonenpermeabiliteit en op de opbouw van een elektrochemische H^+ -gradient door het enzymstelsel cytochroom c oxidase bestudeerd. In vervolgstudies is het effect van S-carvon op enkele "energieparameters" van intacte organismen geanalyseerd (Lactococcus lactis, Streptococcus thermophilus en E. coli). Voor gedetailleerde materiaal en methoden wordt verwezen naar Sikkema et al. (1994).

5.4 Resultaten

S-carvon remt aardappelspruitgroei reversibel.

Toediening van S-carvon aan spruiten van aardappeloogstukjes, in een head-space-concentratie van ca. 10-15 $\mu\text{g/l}$, gaf al spoedig een spruitgroeiremming te zien (Fig. 1). Opheffing van de behandeling door verwijdering van S-carvon resulteerde in alle gevallen in een hergroei van de spruiten. Enkele dagen tot een week na verwijdering van S-carvon, leidde tot hergroei van de top of tot vertakking van de hoofdspruit en/of uitlopen van okselknoppen. Dit geeft aan dat de spruitgroeiremming reversibel is en dat de spruiten zich kunnen herstellen van een blootstelling aan S-carvon.

HMGR wordt geremd door S-carvon

Biochemische analyse van enkele processen in de spruit gaf aan dat de activiteit van het HMGR (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzym A reductase)

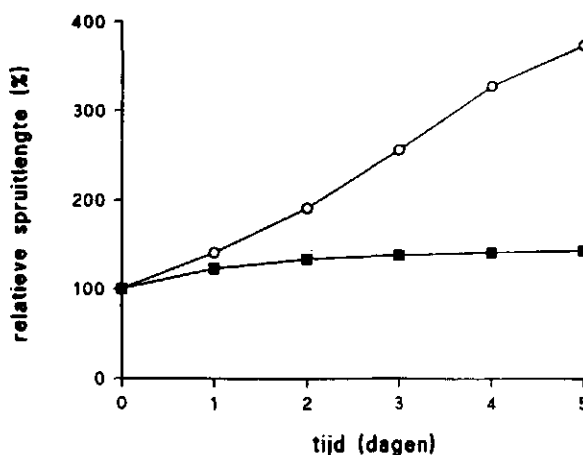


Fig. 1 Effect van S-carvon op de lengtegroei van aardappelspruiten. ○ = controle, ■ = S-carvon behandeld.

binnen 4 dagen gereduceerd was tot bijna nul in S-carvon-behandelde spruiten. Controle spruiten behielden over vier dagen dezelfde activiteit (Fig. 2). De aktiviteitsremming werd niet veroorzaakt door een direkte invloed van S-carvon op het HMGR, noch door een invloed op algemene translatieprocessen (Oosterhaven et al 1993). Ook de transcriptie van het HMGR op gennivo is niet door S-carvon beïnvloed omdat de hoeveelheid HMGR-mRNA na vier dagen in controle en S-carvon behandeld spruitweefsel gelijk was. Dit is onderzocht met specifieke DNA-probes van het aardappel-HMGR, die middels PCR-technieken zijn verkregen. De vraag rees of het HMGR inactief zou zijn door verminking van het eiwit of dat het eiwit niet meer gesynthetiseerd zou zijn. Om dat te onderzoeken zijn antilichamen tegen het HMGR opgewekt en uit Western Blot experimenten bleek dat het verlies aan activiteit samen ging met het verlies aan HMGR-signaal op Western Blots (Fig. 3). Hieruit volgt dat het eiwit niet meer aanwezig is of dat het niet meer door de antilichamen wordt herkend. Blijkbaar worden post-translationele processen van het HMGR door S-carvon beïnvloed. Aktiviteit van enkele enzymen uit de citroenzuurcyclus bleken niet door S-carvon beïnvloed te worden.

Bioconversie van S-carvon

S-carvon wordt door aardappelweefsel opgenomen en actief omgezet via dihydrocarvon tot vnl. neoisodihydrocarveol (Fig. 4). De concentratie aan S-carvon in het weefsel bedraagt maximaal 20 mg/kg versgewicht; dit komt overeen met ca. 0.1 mM. Dit is de globale concentratie, maar plaatselijk kan de concentratie hoger zijn. De omzetting van S-carvon verloopt stereospecifiek. Naast reductiereacties komen ook oxidaties voor; gehydroxyleerde carvonen zijn aangetoond in aardappelspruit- en knolweefsel. Met behulp van ¹³C-gelabeld S-carvon is aangetoond dat alle omzettingsprodukten inderdaad afkomstig zijn van S-carvon. Naast het vrije S-carvon en de omzettingsprodukten, bleek er nog een gebonden, wateroplosbare, vorm van S-carvon voor te komen (herkenbaar aan het voorkomen van meerdere

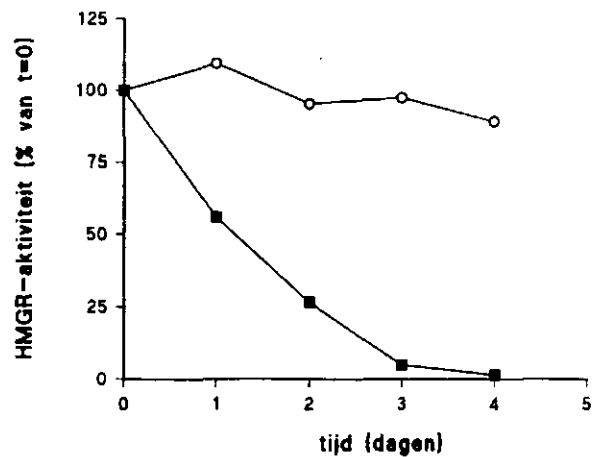


Fig. 2 Effect van S-carvon op de HMGR-aktiviteit in aardappelspruiten. O = controle, ■ = S-carvon behandeld.

Microsomal fraction

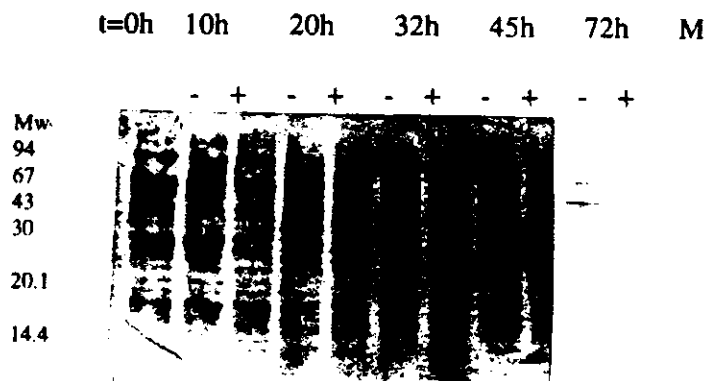


Fig. 3 S-carvon veroorzaakt de verdwijning van HMGR-eiwit in eiwitfracties van aardappelspruiten.

^{13}C -signalen in de regio van 110 ppm, het gebied waarbij ^{13}C -S-carvon een piek vertoont, in de waterige fase van geëxtraheerd aardappelweefsel; Fig. 5). Deze wateroplosbare component bevatte S-carvon welke na zure hydrolyse gesplitst werd in vrij carvon en een nog onbekende verbinding. Momenteel wordt nog gewerkt aan de opheldering van de structuur van deze verbinding

S-carvon remt de wondheling

Bij mechanische oogst worden aardappelen verwond. In de praktijk wordt derhalve een wondhelingsperiode aangehouden van ca. 2 weken waarbij de knollen herstellen van de verwonding. Een goede wondheling is van belang omdat wondweefsel een eenvoudige entree-mogelijkheid voor pathogenen is en omdat er (teveel) vochtverlies plaatsvindt.

Verwond aardappelweefsel vormde na 4 dagen een goed zichtbare suberinelaag en binnen 8 dagen een cambiumlaag: het wondvlak raakt verkurkt en de wond is geheeld. S-carvon vertraagde de suberi-

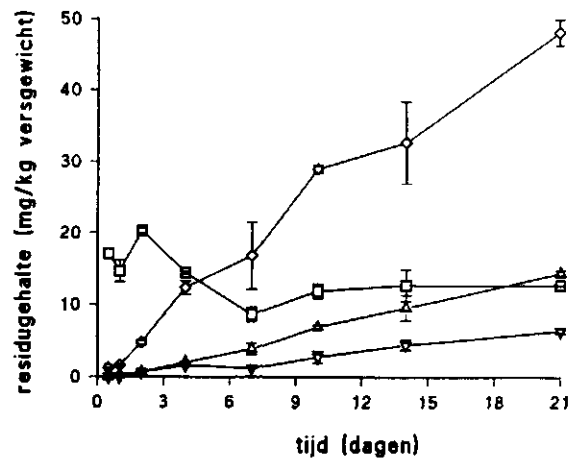


Fig. 4 Opname en bioconversie van S-carvon door aardappelknolweefsel. □ = S-carvon, Δ = dihydrocarvon, ▽ = isodihydrocarvon, ◇ = neoisodihydrocarveol.

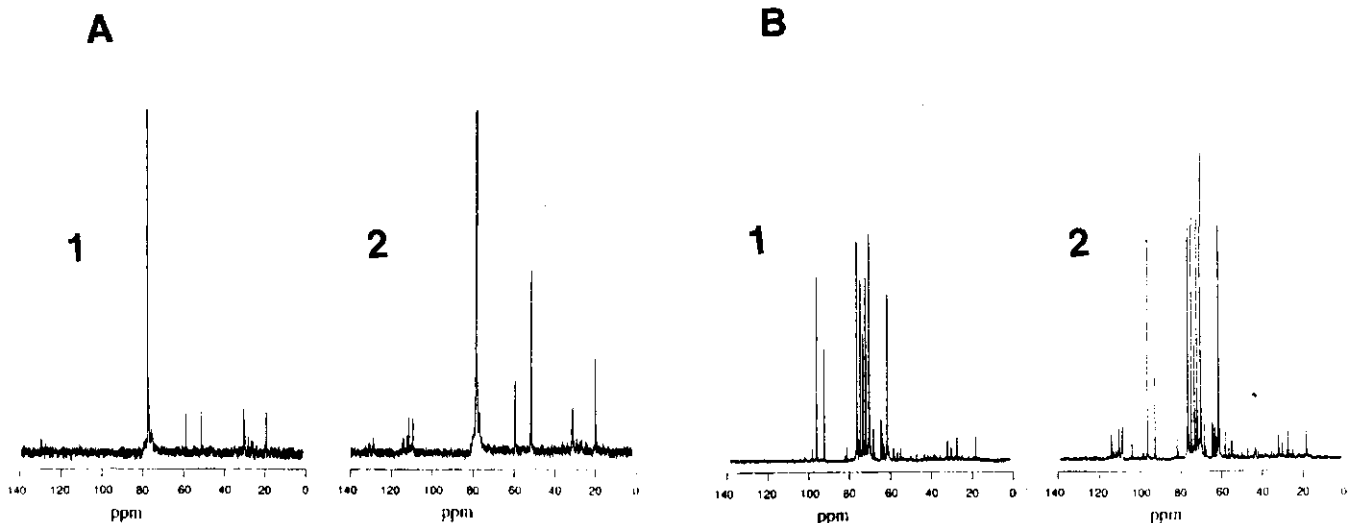


Fig. 5 ^{13}C -NMR spectrum van CHCl_3 -extracten (A) en van de waterige extracten (B) van S-carvon (1) en van ^{13}C -S-carvon (2) behandeld aardappelknolweefsel.

nevorming met ca. 10 dagen. De cambiumlaag echter, bleek ook na 21 dagen wondheling nog nauwelijks gevormd. De suberisatie was in vele gevallen verschillend van controle weefsel omdat de suberinelaag ca. 3 cellagen dieper ligt door een S-carvon behandeling.

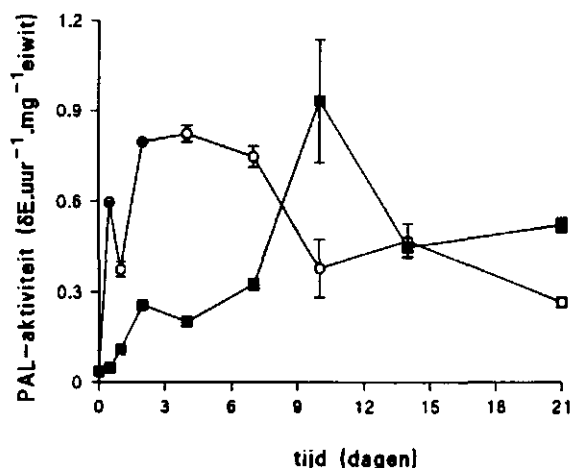


Fig. 6 Invloed van S-carvon op de PAL-activiteit in wondhelend aardappelweefsel. O = controle, ■ = S-carvon behandeld.

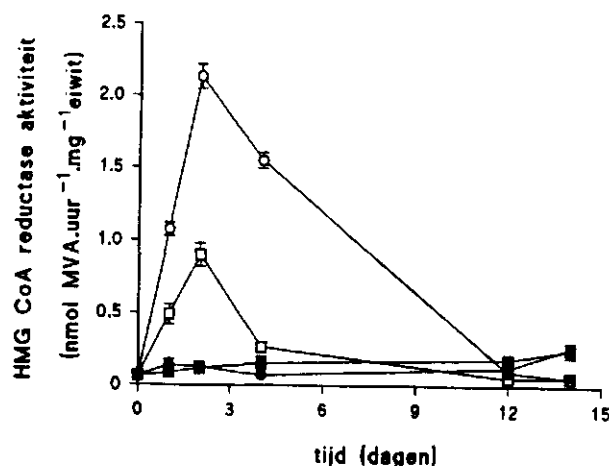


Fig. 7 HMGR-aktiviteit in organel- (open symbolen) en in microsoma- (dichte symbolen) frakties in controle (O) en in S-carvon (■) behandeld wondhelend aardappelweefsel.

De gevonden verschillen in suberisatie konden worden verklaard door een vertraagde aktiviteitsontwikkeling van phenylalanine ammonia lyase (PAL), een sleutelenzym in de vorming van suberine. De maximale aktiviteit van PAL in S-carvon behandeld wondweefsel lag 10 dagen na die van controle weefsel (Fig. 6).

HMGR werd door verwonding snel geïnduceerd in controle weefsel. S-carvon echter, blokkeerde de inductie: er was geen aktiviteitspiek (Fig. 7) en het HMGR was niet aantoonbaar middels Western Blotting technieken die gebruik maken van specifieke HMGR antilichamen.

Stressreacties in S-carvon behandeld weefsel

Zowel in aardappelspruiten als ook in verwond knolweefsel traden grote veranderingen op in de glutathion-huishouding tijdens de blootstelling aan S-carvon. Glutathion wordt verondersteld een rol te spelen bij de adaptatie van weefsel aan stressomstandigheden. Extreme temperaturen of xenobiotica, zoals bijv. herbicides, kunnen het glutathion metabolisme veranderen. Gereduceerd glutathion (GSH) is nodig om enzymen in de gereduceerde, i.e. de actieve, toestand te houden. Het gehalte aan geoxideerd glutathion (GSSG) mag niet te veel oplopen omdat bij te hoge GSSG-concentraties de eiwitsynthese geremd kan worden. Het enzym dat verantwoordelijk is voor de reductie van GSSG is het glutathion reductase (GR). Aardappelweefsel dat aan S-carvon was blootgesteld, vertoonde binnen 3 dagen een stijging van de concentraties GSH én GSSG (Fig. 8) en een verhoogde GR-aktiviteit (Fig. 9a)

Tevens werd het glutathion-S-transferase geïnduceerd door een S-carvon behan-

deling (Fig 9b). Dit enzymstelsel kan de koppeling tussen glutathion en xenobiotica katalyseren om zodoende de toxische werking van xenobiotica te verminderen. Wellicht wordt ook S-carvon op deze wijze onschadelijk gemaakt door het aardappelweefsel maar hier is nog geen sluitend bewijs voor: er is nog geen carvon-GSH conjugaat aangetoond.

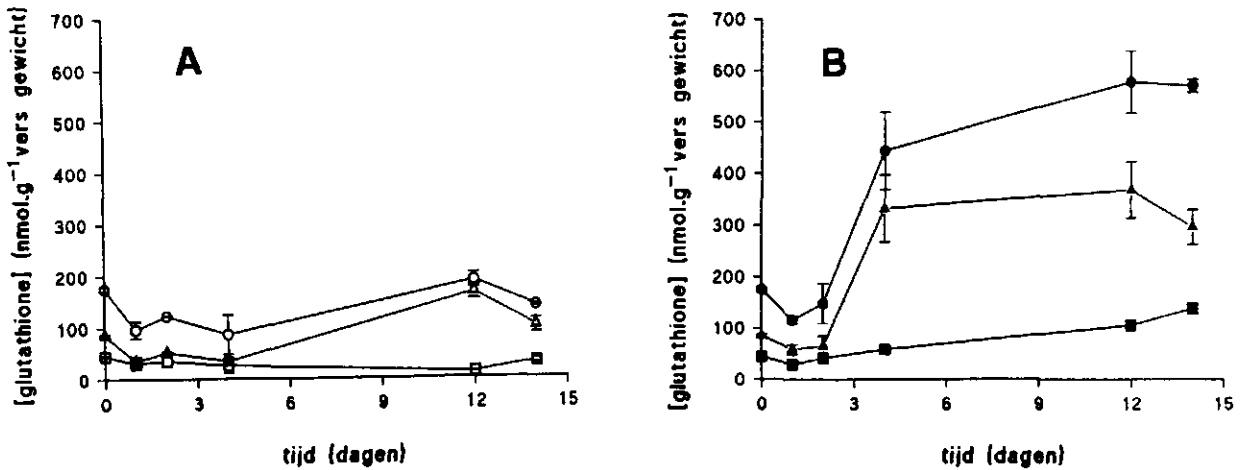


Fig. 8 Glutathion-huishouding in controle (A) en in S-carvon behandeld wondhelend aardappelweefsel (B); O, ● = totaal glutathion; Δ, ▲ = GSH; □, ■ = GSSG.

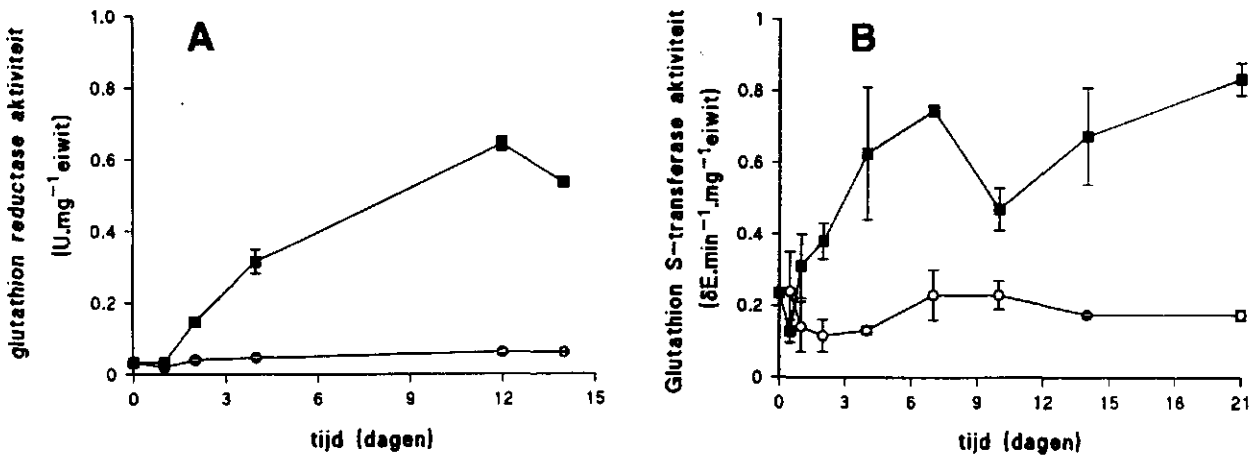


Fig. 9 Effekt van S-carvon op glutathion reductase (A) en op glutathion S-transferase activiteit (B). O = controle, ■ = S-carvon behandeld.

Bacteriegroei

De antimicrobiële werking van karwijolie wordt vnl. veroorzaakt door S-carvon en de meeste proeven zijn dan ook hiermee uitgevoerd. S-carvon is een lipofiele verbinding die in een liposoom/buffersysteem een partiticoëfficiënt van 26 heeft. Dit wil zeggen dat op gewichtsbasis 26 maal meer S-carvon aanwezig is in de

membraan dan in de bufferfase.

S-carvon bleek in het concentratiegebied van 1 tot 10 mM zowel de ΔpH als de $\Delta\psi$ component van de proton motive force te verlagen. Bij de verzadigingsconcentratie van S-carvon was de proton motive force het laagst en daarmee in overeenstemming, de protonen permeabiliteit het hoogst. In intacte bacteriën remde S-carvon de ademhaling van *E.coli* voor 50% bij 5 mM terwijl bij een concentratie van 7 mM de remming volledig was. Groeiproeven met *E. coli*, *Lactococcus lactis* en *Streptococcus thermophilus* toonde aan dat S-carvon de groei van al deze micro-organismen remde in hetzelfde concentratiegebied als waarin het van invloed was op de proton motive force en de ademhaling (Fig. 10 en 11). Anaeroob groeiende bacteriën bleken gevoeliger dan aerob groeiende bacteriën. Dit komt overeen met het grotere vermogen van een aerob groeiend organisme om een proton motive force op te bouwen en in stand te houden, en dus een verhoogde protonenpermeabiliteit tegen te gaan. Uit de experimenten bleek dat ook in intacte melkzuurbacteriën de toxiciteit van S-carvon primair een gevolg is van een verstoring van de integriteit (en functionaliteit) van de cytoplasmamembraan.

5.5 Conclusie

Het uit karwijzaad gewonnen S-carvon kan de groei van micro-organismen en de spruitvorming van aardappelen blokkeren. De groeiremming van bacteriën hangt samen met de effecten van S-carvon op de cytoplasmamembraan. Ophoping van S-carvon in membraansystemen verhoogt de protonenpermeabiliteit en verlaagt daarmee het energiegenererend vermogen van de cel.

De spruitgroeiremming is reversibel en blijkt gecorreleerd te zijn met veranderingen in de activiteit van het HMGR. Een S-carvon behandeling van spruitweefsel leidt tot de verdwijning van het enzym uit het weefsel en in wondhelend knolweefsel wordt de inductie van het HMGR geblokkeerd. Deze remming vindt al plaats binnen 1 dag na blootstelling van het weefsel aan S-carvon. Hoe de link S-carvon-HMGR

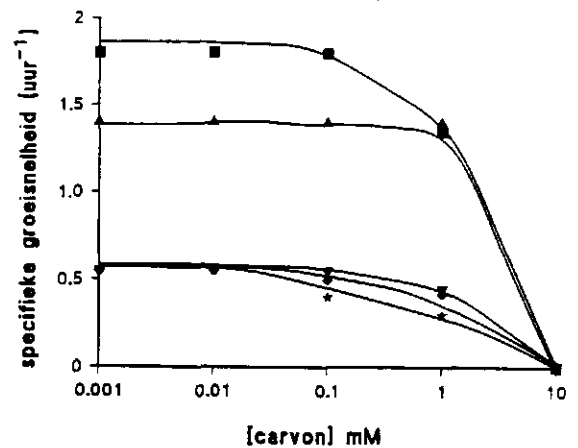


Fig. 10 Invloed van S-carvon op de groeisnelheid van *S. thermophilus* (■), *L. lactis* (▼), en *E. coli* (▲=aerob, ◆=anaeroob, ★=fermentatief).

proton motive force op te bouwen en in stand te houden, en dus een verhoogde protonenpermeabiliteit tegen te gaan. Uit de experimenten bleek dat ook in intacte melkzuurbacteriën de toxiciteit van S-carvon primair een gevolg is van een verstoring van de integriteit (en functionaliteit) van de cytoplasmamembraan.

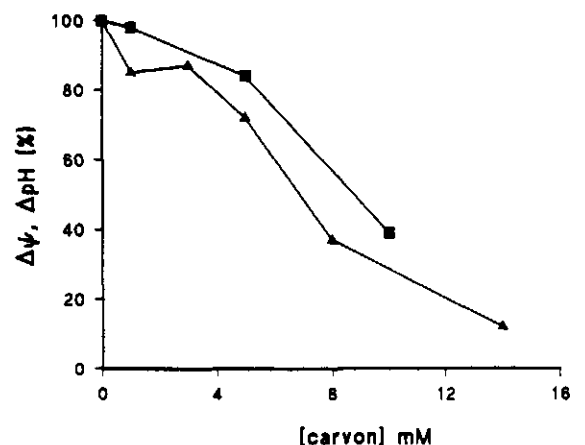


Fig. 11 Effect van S-carvon op $\Delta\psi$ (■) en ΔpH (▲) in een liposoommodel-systeem.

precies verloopt is uit het onderzoek (nog) niet naar voren gekomen.

S-carvon wordt door aardappelweefsel omgezet in vnl. gereduceerde verbindingen. Het weefsel kan zich aanpassen aan de blootstelling van S-carvon. Hierdoor is de groeiremming reversibel en wordt het remmende effect van S-carvon op de wondheling deels verminderd.

Literatuur:

Sikkema, J., De Bont, J.A.M. and Poolman, B. (1994) Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* In Press.

6. Publikaties

Oosterhaven, K. (1991a) Winning en werking van karwijolie. *De Aardappelwereld* 45(8):25-26

Oosterhaven, K., Hartmans, K.J. en Huizing, H.J. (1991b). Mogelijkheden voor de teelt van karwij in Nederland. *In: Agrificatieonderzoek in Nederland. Nieuw perspectief voor de akkerbouwer: producent voor andere markten.* Misset Doetinchem blz. 82-88.

Oosterhaven, K., Hartmans, K.J. and H.J. Huizing (1992). Potato sprouts as a model system to study the bioconversion of monoterpenes. *Abstractbook of NBC 20-21 February, Amsterdam.*

Oosterhaven, K., Hartmans, K.J. and H.J. Huizing (1992). Effect of S-carvone on potato sprout growth. *Abstract of lecture on the 23rd International Symposium on Essential Oils, Ayr Scotland, 9-12 September*

Hartmans, K.J., Diepenhorst, P., Oosterhaven, K. (1993) perspectieven van karvon als natuurlijke kiemremmer. *De Aardappelwereld* 47:5-9.

Oosterhaven, K., Hartmans, K.J. and Huizing, H.J. (1993) Inhibition of potato (*Solanum tuberosum*) sprout growth by S-carvone: reduction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase activity without effect on its mRNA level. *J. of Plant Physiol.* 141:463-469.

Oosterhaven, K., Hartmans, K.J., Plasman, H.H., Scheffer, J.J.C. and Van der Plas, L.H.W. (1994) Inhibitory effect of S-carvone on wound healing of potato tuber tissue. Submitted for publication.

Besteding personele capaciteit en materieel 1993. ATO-DLO

| <u>Personeel</u> | begroot mensdagen | gerealiseerd mensdagen |
|-----------------------------|----------------------|---------------------------|
| <u>eigen aandeel</u> | | |
| onderzoekleiding | - | 30 |
| assistentie | - | 160 |
| <u>programma-aandeel</u> | | |
| onderzoekleiding | 200 | 239 |
| assistentie | - | - |
| totaal personeel | 200 md | 429 md |
| 8.2 <u>Materieel</u> | begroot | gerealiseerd |
| <u>eigen aandeel</u> | - | 20.000 ¹⁾ |
| <u>programma aandeel</u> | 30.000 | 15.167 ²⁾ |
| totaal materieel | F 30.000 | F 35.167 |

Toelichting: ¹⁾ éénvierde deel van Gas Chromatograaf
 NMR-analyses
 kolommateriaal GC
²⁾ aanschaffingen 333,=
 reiskosten 2224,=
 O&D labbenodigdheden 7773,=
 overige kosten 4837,=

5.9 Onderzoek naar de toepassingsmogelijkheden van S(+)-carvon als chirale uitgangsstof in de synthese van enantiomeer zuivere geurstoffen, gewasbeschermingsmiddelen en tussenprodukten in de organische synthese

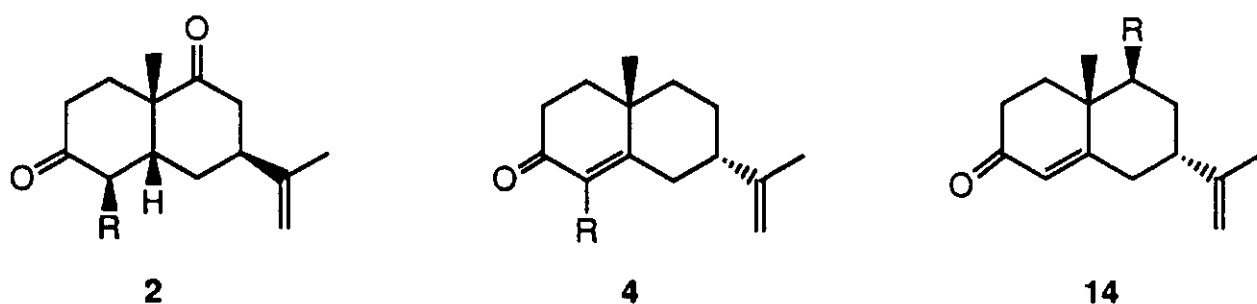
Projectverslag 1990-1994 Instelling: Organische Chemie, LUW

- 1. Projecttitel:** Onderzoek naar de toepassingsmogelijkheden van S-(+)-carvon als chirale uitgangsstof in de synthese van enantiomeer zuivere geurstoffen, gewasbeschermingsmiddelen en tussenprodukten in de organische synthese.
- 2. Projectleiding:** Prof. dr. Ae de Groot en Dr. B. J. M. Jansen
Medewerkers: Mw. Ir. A. A. Verstegen-Haaksma en Ing. H. J. Swarts
- 3. Samenwerking:** Quest International
- 4. Doelstelling:** Publiceren in wetenschappelijke tijdschriften om de mogelijkheden van S-(+)-carvon als chirale uitgangsstof in de organische synthese onder de aandacht te brengen. Op deze wijze zal een bijdrage geleverd worden aan betere afzetmogelijkheden voor S-(+)-carvon.
- 5. Onderzoeksverslag:**
- 5.1 Samenvatting
 - 5.2 Inleiding
 - 5.3 Methoden
 - 5.4 Resultaten
 - 5.5 Conclusie

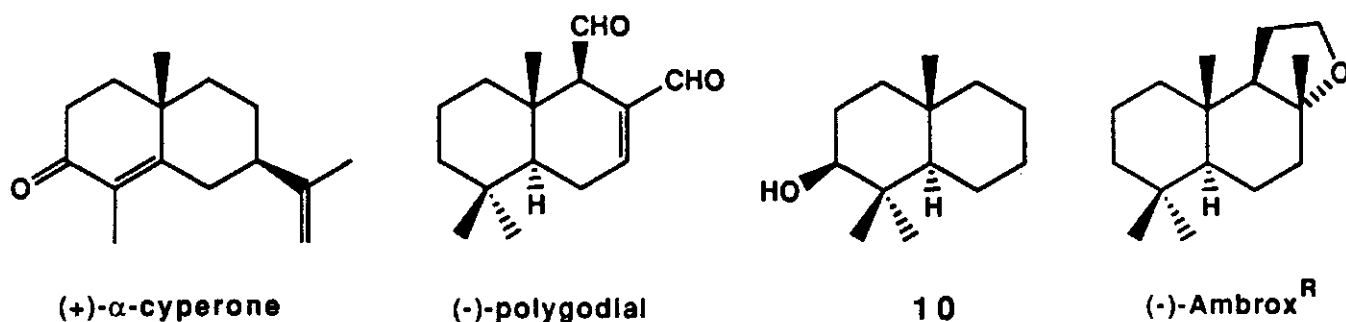
5.1 Samenvatting

Een aantal natuurproducten heeft een biologische werking die ze geschikt maken voor gebruik in medicijnen, in de gewasbescherming of in de geurstoffenindustrie. Wanneer door isolatie uit natuurlijk materiaal niet voldoende van het gewenste natuurproduct in handen te krijgen is, kan de synthese uitkomst bieden. Bij chirale verbindingen is het nodig de synthese uit te voeren met chirale hulpmiddelen, omdat anders ook het enantiomeer van de gewenste verbinding ontstaat. Eén mogelijkheid is de synthese uit te voeren met een ander chiraal natuurproduct als startmateriaal. S-(+)-Carvon, de hoofdcomponent van de karwijolie, is in dit onderzoek getest als uitgangsstof in de synthese van chirale verbindingen.

S-(+)-Carvon is met behulp van de Diels-Alder reactie en de Robinson annelering omgezet in de chirale tussenproducten **2**, **4** en **14**.



Het nut van deze chirale tussenproducten wordt aangetoond door de synthese van een aantal biologisch actieve verbindingen. Uit het Diels-Alder adduct **2** is (+)- α -cyperon gesynthetiseerd. Deze verbinding heeft een biologische activiteit tegen de malariaparasiet ($IC_{50} = 5.5 \mu\text{g/ml}$). Uit het Robinson anneleringsproduct **4** zijn (-)-polygodial en decalol **10** gemaakt. (-)-Polygodial is een bekend insect-antifeedant, dat gebruikt kan worden in de gewasbescherming. Decalol **10** heeft een remmende werking op de cholesterol biosynthese. De commercieel interessante geurstof (-)-Ambrox^R is op twee manieren gemaakt uit het Robinson anneleringsproduct **14**.

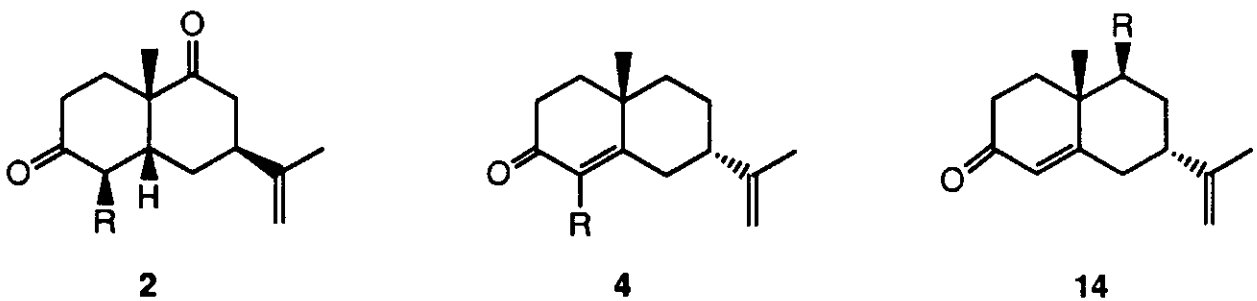


Of de biologisch actieve verbindingen werkelijk op commerciële schaal geproduceerd zullen worden, valt buiten het kader van dit onderzoek. Er is wel rekening gehouden met de mogelijkheid tot opschaling van de reacties, maar de interesse van de industrie voor de verbindingen is ook afhankelijk van factoren die niets met de produktiemogelijkheden te maken hebben. Het onderzoek naar de toepassingsmogelijkheden van S-(+)-carvon in de chirale synthese wordt gepubliceerd in zes wetenschappelijke artikelen in *Tetrahedron* en één artikel in *Industrial Crops and Products*.

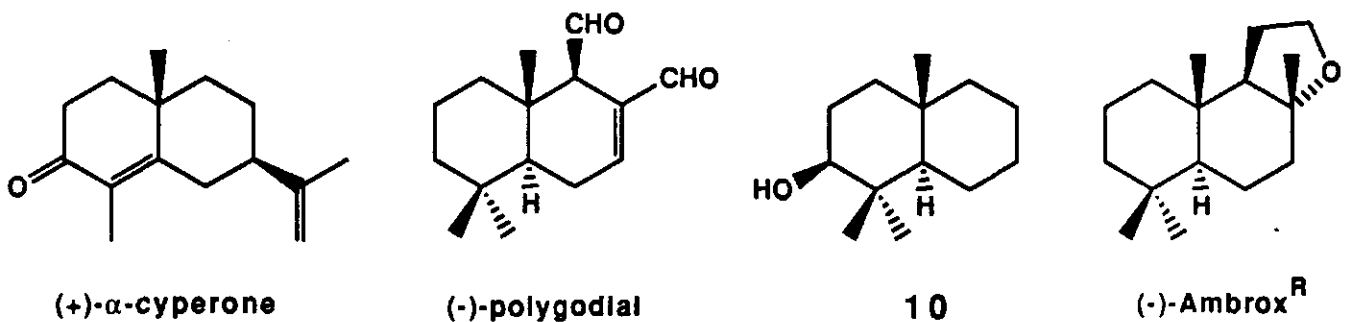
5.1 Samenvatting

Een aantal natuurproducten heeft een biologische werking die ze geschikt maken voor gebruik in medicijnen, in de gewasbescherming of in de geurstoffenindustrie. Wanneer door isolatie uit natuurlijk materiaal niet voldoende van het gewenste natuurproduct in handen te krijgen is, kan de synthese uitkomst bieden. Bij chirale verbindingen is het nodig de synthese uit te voeren met chirale hulpmiddelen, omdat anders ook het enantiomeer van de gewenste verbinding ontstaat. Eén mogelijkheid is de synthese uit te voeren met een ander chiraal natuurproduct als startmateriaal. S-(+)-Carvon, de hoofdcomponent van de karwijolie, is in dit onderzoek getest als uitgangsstof in de synthese van chirale verbindingen.

S-(+)-Carvon is met behulp van de Diels-Alder reactie en de Robinson annelering omgezet in de chirale tussenproducten 2, 4 en 14.



Het nut van deze chirale tussenproducten wordt aangetoond door de synthese van een aantal biologisch actieve verbindingen. Uit het Diels-Alder adduct 2 is (+)- α -cyperon gesynthetiseerd. Deze verbinding heeft een biologische activiteit tegen de malariaparasiet ($IC_{50} = 5.5 \mu\text{g/ml}$). Uit het Robinson anneleringsproduct 4 zijn (-)-polygodial en decalol 10 gemaakt. (-)-Polygodial is een bekend insect-antifeedant, dat gebruikt kan worden in de gewasbescherming. Decalol 10 heeft een remmende werking op de cholesterol biosynthese. De commercieel interessante geurstof (-)-Ambrox^R is op twee manieren gemaakt uit het Robinson anneleringsproduct 14.



Of de biologisch actieve verbindingen werkelijk op commerciële schaal geproduceerd zullen worden, valt buiten het kader van dit onderzoek. Er is wel rekening gehouden met de mogelijkheid tot opschaling van de reacties, maar de interesse van de industrie voor de verbindingen is ook afhankelijk van factoren die niets met de produktiemogelijkheden te maken hebben. Het onderzoek naar de toepassingsmogelijkheden van S-(+)-carvon in de chirale synthese wordt gepubliceerd in zes wetenschappelijke artikelen in *Tetrahedron* en één artikel in *Industrial Crops and Products*.

5.2 Inleiding

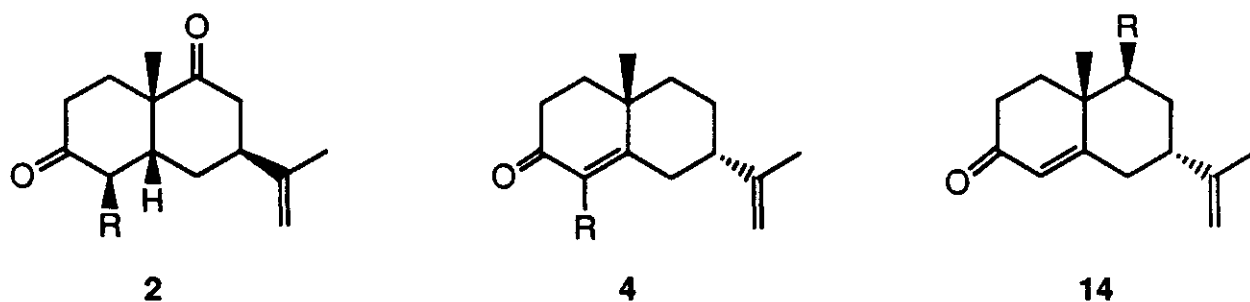
Een aantal natuurprodukten heeft een biologische werking die ze geschikt maken voor gebruik in medicijnen, in de gewasbescherming of in de geurstoffenindustrie. De hoeveelheid van deze biologisch actieve verbindingen die uit natuurlijk materiaal te isoleren is, is in sommige gevallen te gering voor een daadwerkelijke toepassing. De synthese van die verbindingen kan dan uitkomst bieden. Vrijwel al deze biologisch actieve natuurstoffen zijn chiraal. Een chirale verbinding wordt ook wel enantiomeer zuiver genoemd. Bij de synthese van een verbinding zonder chirale hulpmiddelen ontstaat een racemisch mengsel. Dit is een 1:1 mengsel van het gewenste enantiomeer en zijn spiegelbeeld. De biologische werking van de twee enantiomeren in het racemisch mengsel is vaak verschillend. Bij gebruik als medicijn mag het enantiomeer van de werkzame stof niet aanwezig zijn, omdat die bijwerkingen kan veroorzaken. Ook bij gewasbeschermingsmiddelen en geurstoffen wordt de voorkeur gegeven aan de enantiomeer zuivere verbindingen. Dit betekent dat bij een niet chirale synthese de gevormde enantiomeren via een vaak moeizame procedure gescheiden moeten worden. Daarom wordt de voorkeur gegeven aan een chirale of enantioselectieve synthese. Enantiomeer zuivere produkten kunnen gesynthetiseerd worden door uit te gaan van chiraal startmateriaal en S-(+)-carvon en R-(-)-carvon zijn hiervoor bijzonder geschikt.

S-(+)-carvon is de hoofdcomponent van de olie van karwijzaad, terwijl R-(-)-carvon uit spearmint geïsoleerd kan worden. R-(-)-carvon kan ook gemakkelijk gemaakt worden uit R-(+)-limoneen dat op grote schaal gewonnen wordt uit de afvalprodukten van citrusvruchten. Hierdoor is de prijs van R-(-)-carvon lager dan van S-(+)-carvon. Beide enantiomeren van carvon zijn vaak gebruikt als uitgangsstof in de enantioselectieve synthese van natuurprodukten. Voor een verbetering van de afzetmogelijkheden voor karwijolie is het nodig om syntheseroutes te ontwerpen voor produkten die alléén uitgaande van S-(+)-carvon leiden tot de natuurlijke, biologisch actieve enantiomeren. Daarnaast moet bij de keuze van reagentia en reactiecondities rekening gehouden worden met het feit dat voor commerciële toepassing van een verbinding, opschaling tot een industrieel productieproces mogelijk moet zijn. Dit betekent dat goedkope, gemakkelijk verkrijgbare reagentia gebruikt moeten worden en dat de reactieomstandigheden ook op grote schaal uitvoerbaar moeten zijn.

Niet alleen de de biologisch actieve eindprodukten tonen de geschiktheid van S-(+)-carvon als uitgangsstof in de chirale synthese aan. Ook de synthese van bekende chirale tussenprodukten van biologisch actieve verbindingen en nieuwe, hoog gefunctionaliseerde chirale verbindingen zal de aandacht vestigen op S-(+)-carvon als chiraal startmateriaal. Hierdoor mag verwacht worden dat meer onderzoeksgroepen gebruik gaan maken van deze uitgangsstof. Het vinden van nieuwe toepassingen voor S-(+)-carvon in de organische synthese zal hierdoor gestimuleerd worden, waardoor zowel op korte termijn als op langere termijn een grotere afzet van karwijolie gerealiseerd kan worden.

5.3 Methoden

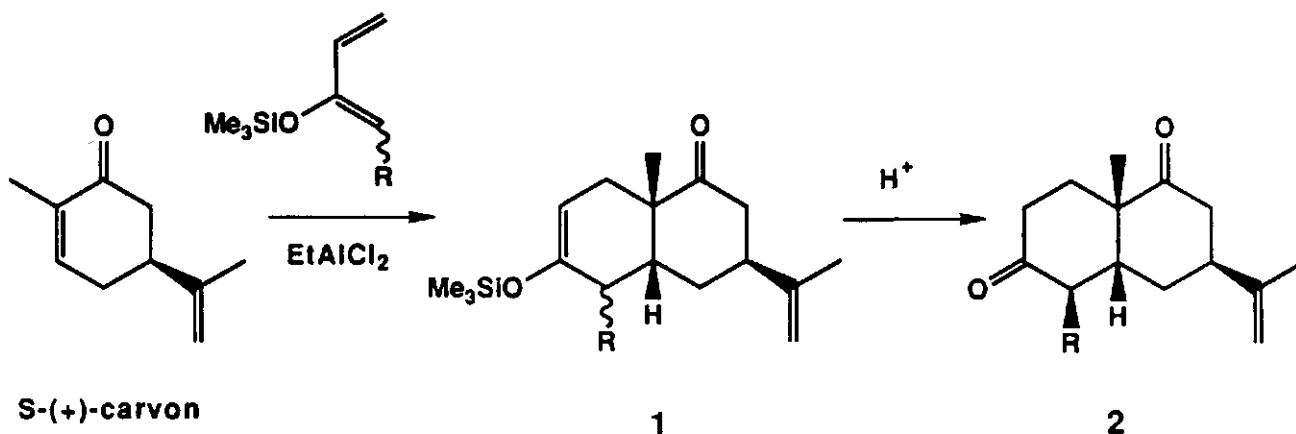
Met behulp van de Diels-Alder reactie² en de Robinson annelering^{1,3,4,5,6} wordt S-(+)-carvon omgezet in een aantal bicyclische chirale tussenproducten. Bij de Diels-Alder reactie van S-(+)-carvon met een silyloxydieen, ontstaat voornamelijk het bicyclische additieproduct **2** waarbij de angulaire methylgroep en de isopropenylgroep aan dezelfde kant (= *cis*) van het molekuul zitten. Bij de Robinson annelering ontstaat voornamelijk het produkt **4** waarbij de angulaire methylgroep *trans* staat ten opzichte van de isopropenylgroep. Door voorafgaand aan de Robinson annelering een substituent in te voeren bij carvon, ontstaat een meer gefunctionaliseerd decalone **14**. Dit decalone kan afhankelijk van de substituent R ook omgezet worden in andere verbindingen dan de bicyclische sesquiterpenen. Het nut van de chirale tussenproducten **2**, **4** en **14**, die via deze basisreacties verkregen worden, wordt vervolgens aangetoond door de synthese van een aantal biologisch actieve verbindingen.



5.4 Resultaten

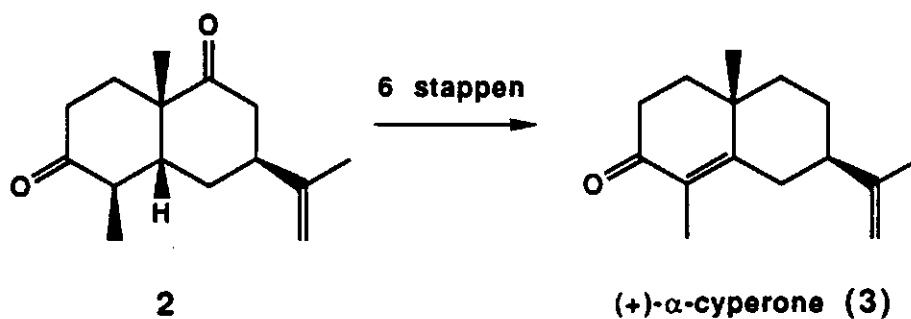
Bij de Diels-Alder reactie² van S-(+)-carvon met gesilyleerd methyl vinyl keton (R=H) of gesilyleerd ethyl vinyl keton (R=methyl), onder invloed van het Lewis zuur EtAlCl₂ ontstaat het anti-additie produkt **1** als hoofdprodukt (schema 1). Na toevoegen van zuur, desilyleert de verbinding waarna het gewenste produkt **2** in een opbrengst van 70 - 80% verkregen wordt.

Schema 1



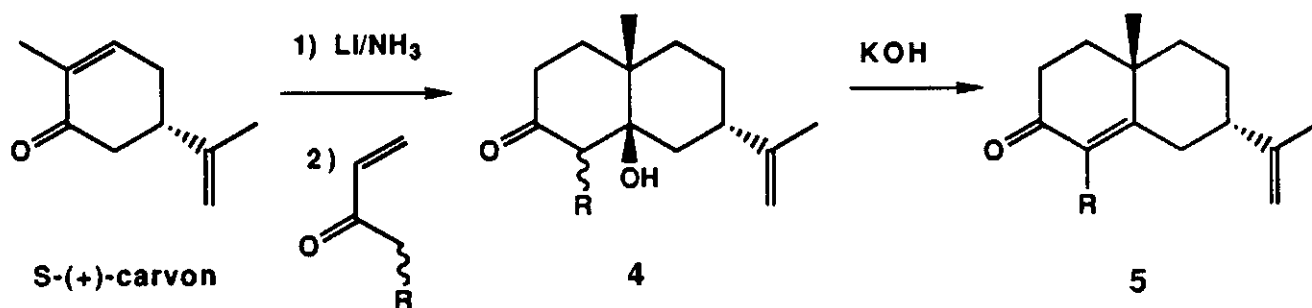
Het nut van het chirale tussenproduct **2** in de synthese wordt aangetoond door omzetting in het natuurproduct (+)- α -cyperon² (**3**) (schema 2). α -Cyperon kan in kleine hoeveelheden geïsoleerd worden uit de wortels van *Cyperus rotundus* L. Op deze wijze kan echter niet voldoende materiaal verkregen worden voor synthesedoelinden. Toch is α -cyperon al veel gebruikt als uitgangsstof in de synthese van andere sesquiterpenen. α -Cyperon is ook interessant, omdat het *in vitro* activiteit vertoont tegen de malariaparasiet⁷ (IC₅₀ = 5.5 μ g/ml). De synteseroute tot α -cyperon bestaat in totaal uit zeven reactiestappen en levert α -cyperon in 40% opbrengst uit S-(+)-carvon. Dit is een aanzienlijke verbetering ten opzichte van de synteseroutes die tot nu toe gebruikt werden.

Schema 2



Decalonen **5** met de isopropenyl- en de methylgroep in de *trans* positie, kunnen verkregen worden door een Robinson annelering¹ van dihydrocarvon met methyl vinyl keton (MVK, R=H) of ethyl vinyl keton (EVK, R=methyl) gevolgd door dehydratatie (schema 3). De overall opbrengst van de decalonen **5** uitgaande carvon ligt tussen de 35 en 55%.

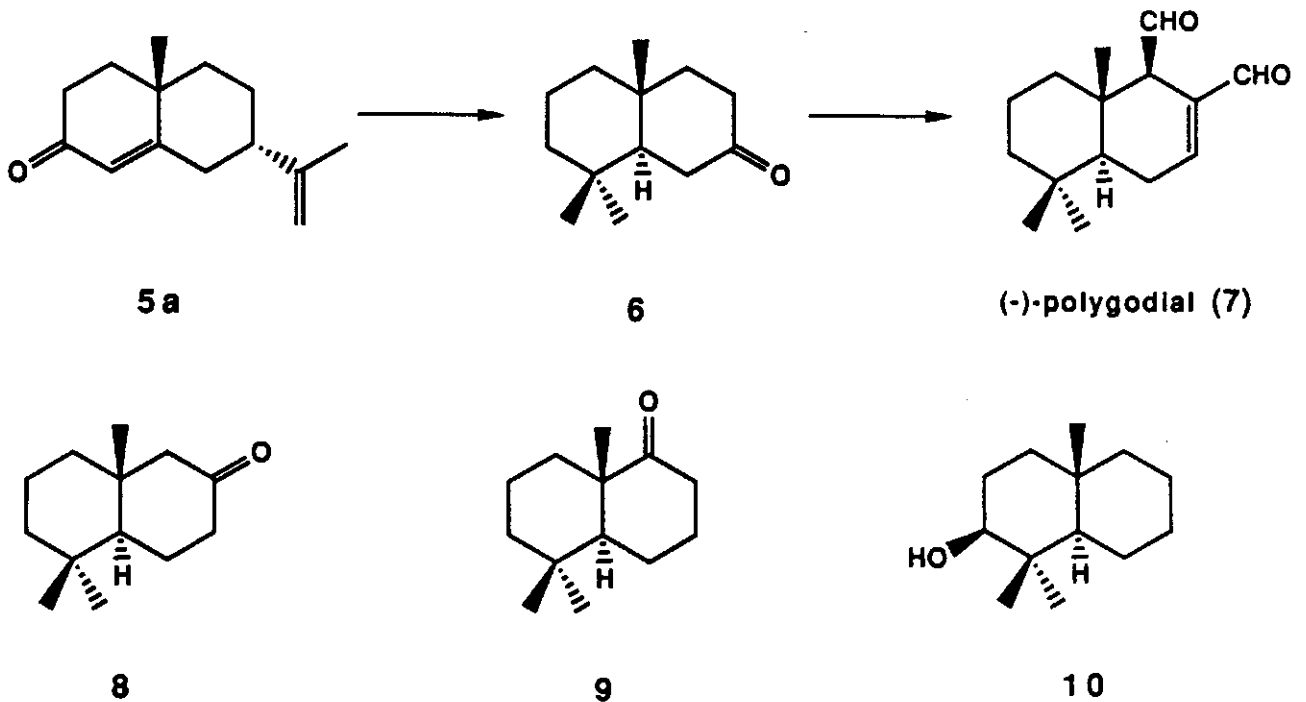
Schema 3



De producten die gemaakt zijn uit het Robinson anneleringsproduct **5a** staan in schema 4. Decalonen **5a** is in drie stappen omgezet in trimethyldecalon **6**¹. De racemische vorm van dit intermediair is door Jansen *et al.* eerder omgezet in het insect anti-feedant polygodial⁸. Door de chirale synthese van verbinding **6** kan (-)-polygodial nu dus ook enantioselectief gesynthetiseerd worden. Decalonen **5a** is ook geschikt voor omzetting in de decalonen **8** en **9**³; dit zijn belangrijke tussenproducten in de synthese van industrieel aantrekkelijke geurstoffen. De 1,2-carbonyl transpositie tot **8** is uitgevoerd in drie stappen in een opbrengst van 17% uit **5a**. De 1,3-carbonyl transpositie tot **9** is uitgevoerd in zes stappen in een opbrengst van 45% uit **5a**. Trimethyldecalol **10** is actief als remmer van de cholesterol

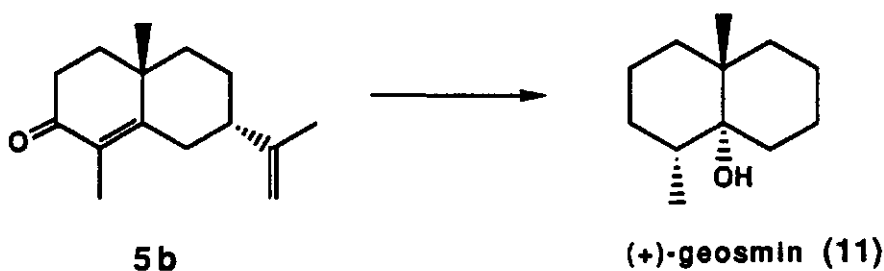
biosynthese⁹ en kan in een overall opbrengst van 37% gevormd worden uit decalon 5a³.

Schema 4



De synthese van (+)-geosmin (11) uit het Robinson annelingsproduct met EVK (5b) staat in schema 5³. Dit is het enantiomeer van het natuurlijk voorkomend (-)-geosmin, wat een aantrekkelijke geurstof is voor de industrie. Ook dit enantiomeer heeft zeer sterke geureigenschappen en is mogelijk ook geschikt voor gebruik in de geurstoffenindustrie.

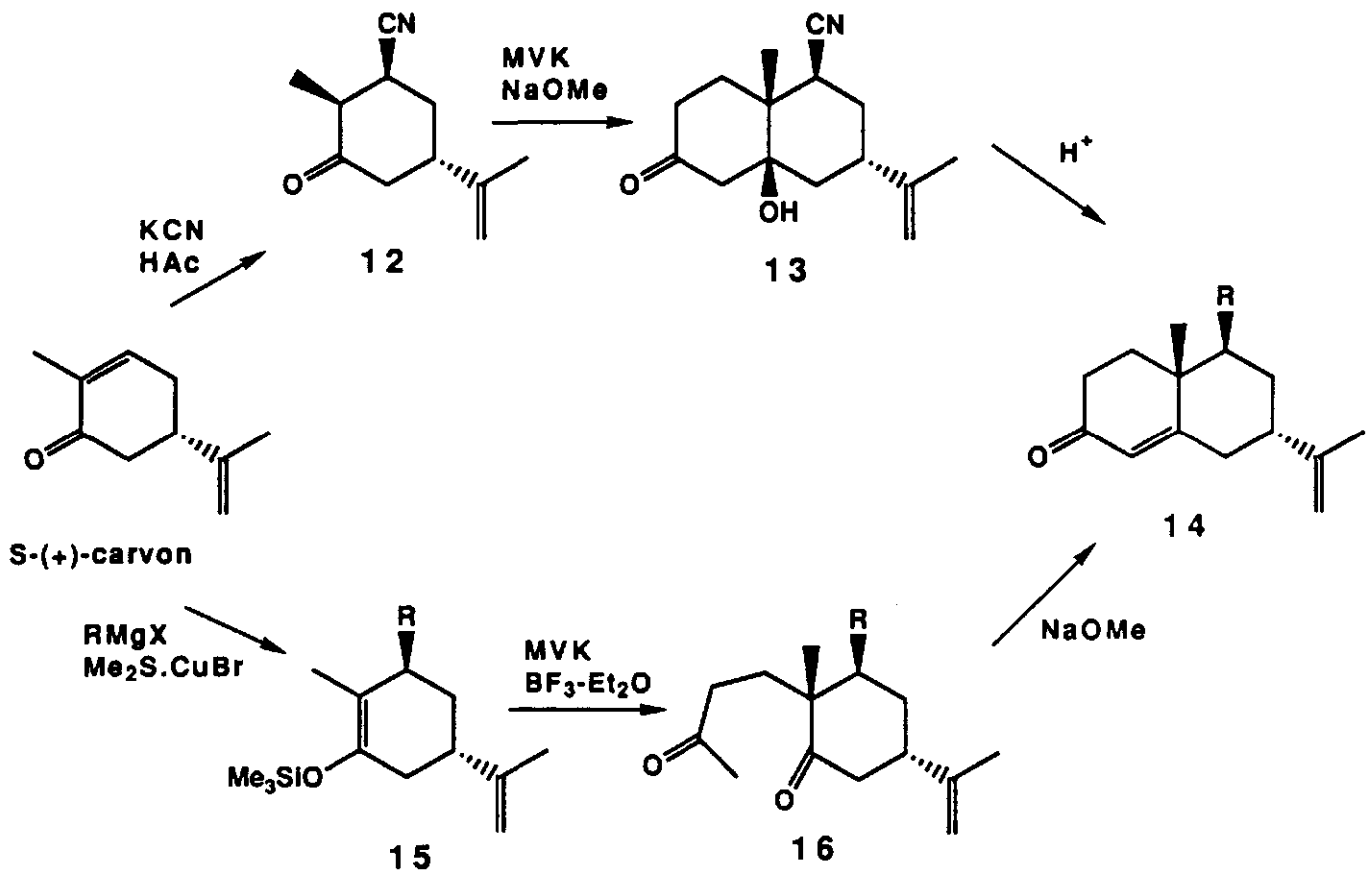
Schema 5



De geconjugeerde additie van een nucleofiel aan carvon, gevolgd door een annelering met MVK, staat beschreven in schema 6⁴. De additie van kaliumcyanide verloopt in hoge opbrengst tot cyaancarvon 12 en ook de daarop volgende Robinson annelering verloopt in hoge opbrengst en selectief tot hydroxyketon 13. De dehydratatie van verbinding 13 tot het gefunctionaliseerde decalone 14 verloopt goed onder katalytisch zure condities. De overall opbrengst van 14 uit S-(+)-carvon is 84%. Deze Robinson annelering verloopt dus veel beter dan de Robinson annelering van dihydrocarvon zoals in schema 3 is weergegeven. Bovendien ontstaat een decalon dat meer

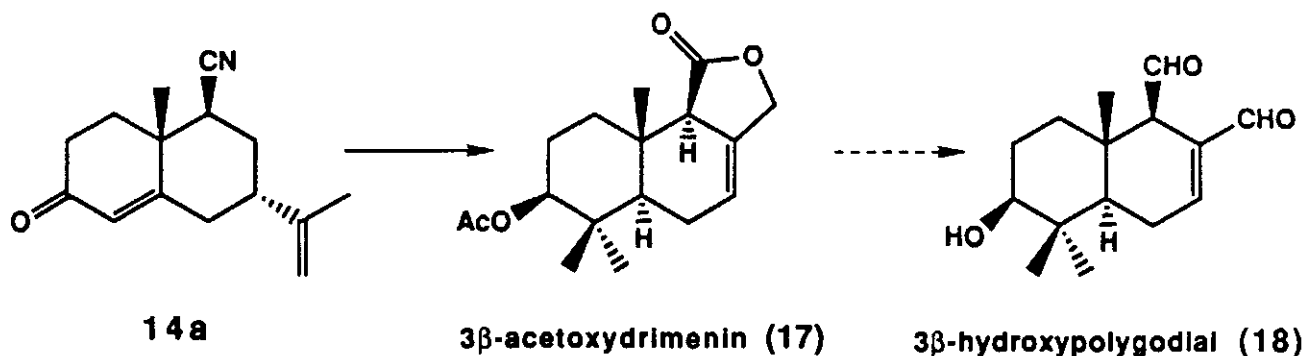
mogelijkheden biedt dan decalon **5**, omdat een extra substituent aanwezig is op de plaats waar bij biologisch actieve sesquiterpenen ook een substituent zit. De geconjugeerde additie van Grignard reagentia onder invloed van een kopercomplex ($\text{Me}_2\text{S}\cdot\text{CuBr}$) en trimethyl silyl chloride geeft de silyl enol ethers **15** in een opbrengst van 70 - 90% (schema 6, R = methyl, vinyl, allyl). Het diketon **16** wordt gevormd door een Michael additie van MVK in een opbrengst van 65 - 75%. Het gefunctionaliseerde decalone **14** met alkylsubstituenten (methyl, vinyl, allyl) wordt tenslotte in goede opbrengst gevormd door cyclisatie van de diketonen onder basische omstandigheden.

Schema 6



Intermediair **14a** is omgezet in het natuurproduct 3β -acetoxydrimenin⁶ (**17**) (schema 7). De biologische activiteit van deze verbinding is nog niet onderzocht, maar door deze synthese is **17** nu in voldoende mate beschikbaar voor verder onderzoek. De omzetting van verbinding **17** in 3β -hydroxypolygodial (**18**) is door tijdgebrek niet meer uitgevoerd. 3β -Hydroxypolygodial is wel interessant vanwege de antitumor activiteit van z'n dimethylacetaal tegen bepaalde kankerweefsels¹⁰.

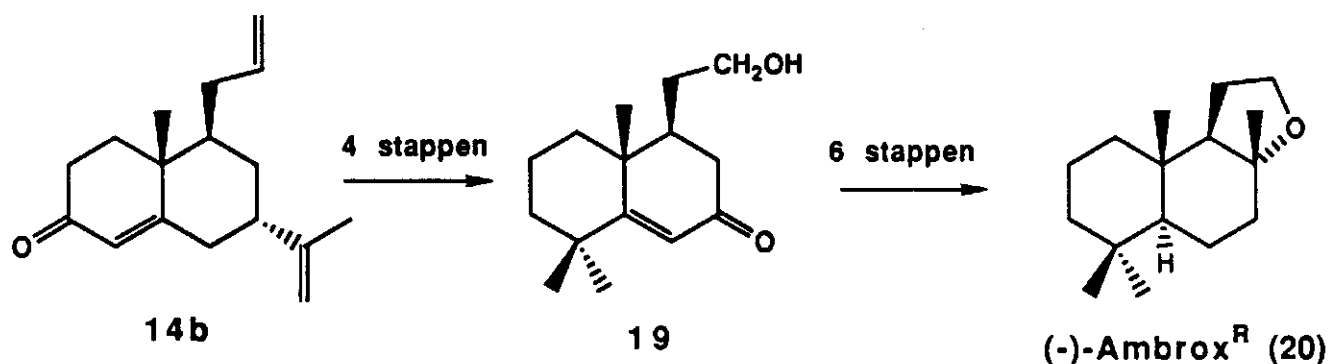
Schema 7



In schema 8 staat de omzetting van decalone **14b** in de commercieel interessante geurstof (-)-Ambrox^R (**20**)⁵. (-)-Ambrox^R wordt in de geurstoffen industrie gebruikt vanwege z'n sterke geureigenschappen, die sterk lijken op het natuurlijke ambergris. Ambergris is een complex mengsel van metabole afbraakproducten van de potvis (*Physeter macrocephalus L.*). Door het verbod op de walvisjacht is ambergris niet meer verkrijgbaar. (-)-Ambrox^R wordt op commerciële schaal gemaakt door omzetting van het natuurlijkproduct sclareol. Firmenich, een geurstoffenfirma uit Zwitserland en de belangrijkste producent van (-)-Ambrox^R, zoekt nog steeds naar nieuwe routes en uitgangsstoffen voor Ambrox^R, omdat sclareol slechts beperkt verkrijgbaar is.

Het hydroxyketon **19** wordt in vier reactiestappen gevormd uit **14b** in een opbrengst van 54%. Hydroxyketon **19** wordt vervolgens in een opbrengst van 35% in zes stappen omgezet in (-)-Ambrox^R (**20**) (schema 8).

Schema 8

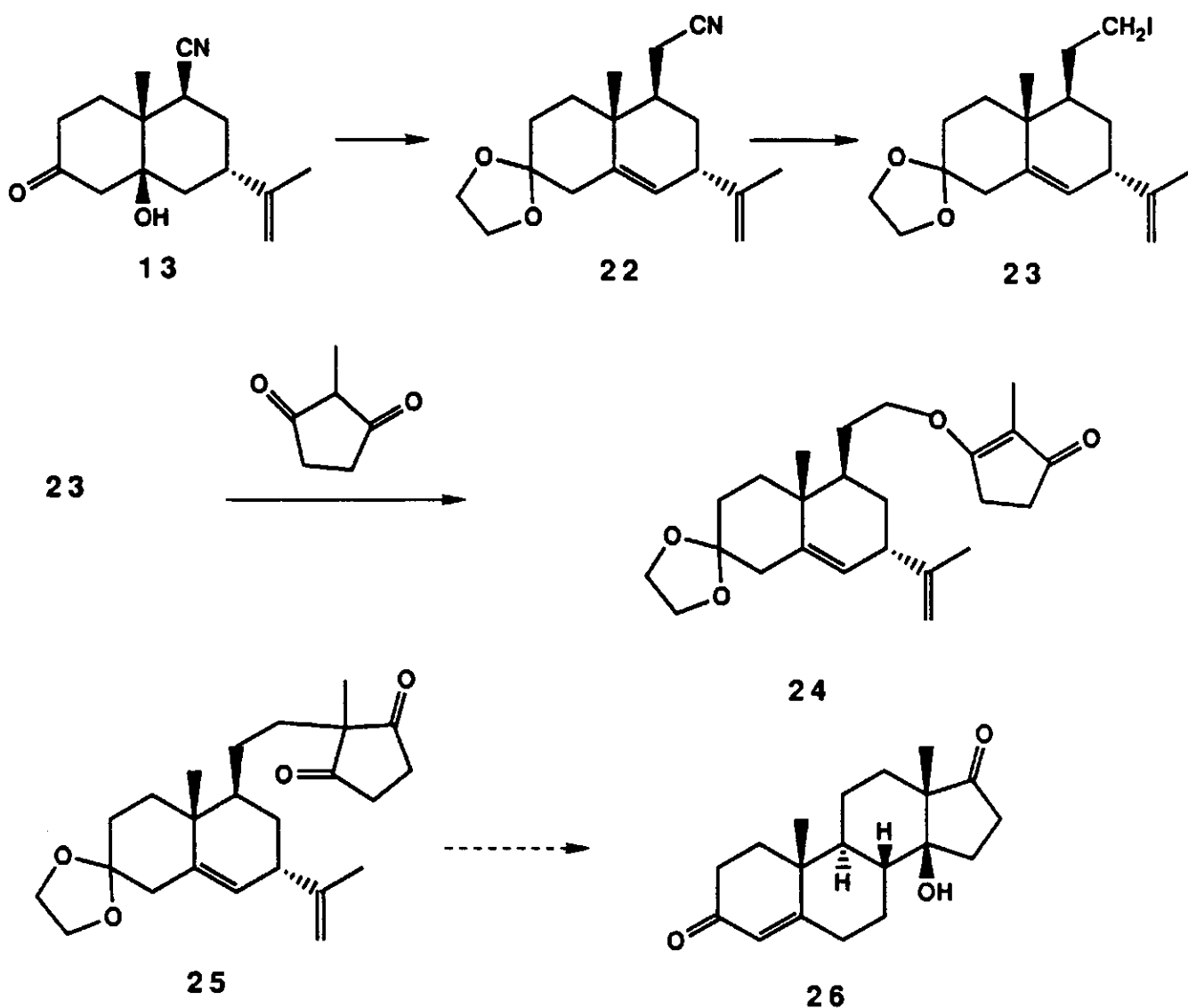


In schema 9 staat een benadering tot de synthese van steroïden met het Robinson anneleringsproduct **13** als startmateriaal. Na verlengen van de CN substituent in verbinding **13** tot verbinding **22** in vijf stappen in een overall opbrengst van 80%, wordt een goede vertrekkende groep geïntroduceerd, zodat verbinding **23** ontstaat. De alkylering van 2-methyl-1,3-cyclopentadion met **23** geeft echter alleen het O-gealkyleerde product **24** en niet het verwachte C-gealkyleerde product **25**. Hierdoor is de synthese van steroïden **26** via deze weg nog niet mogelijk.

Verbinding **22** is wel geschikt voor de synthese van hydroxyketon **19** en dus voor de synthese van (-)-Ambrox^R (**20**) (schema 8). Verbinding **22** kan in zes stappen omgezet worden in hydroxyketon

19 in een overall opbrengst van 47%. Voor een grootschalige toepassing is de route via **13** ook geschikter dan de kortere route via decalone **14b**. De geconjugeerde additie van Grignard reagentia en de erop volgende annelering kunnen namelijk maar in beperkte mate opgeschaald worden. De nitrillen **12** en **13** kristalliseren uit in het reactiemengsel, waardoor de zuivering ook op grote schaal probleemloos is.

Schema 9



5.2 Conclusies

S-(+)-Carvon is met behulp van de Diels-Alder reactie en de Robinson annelering omgezet in een aantal chirale tussenproducten. Het nut van deze tussenproducten is aangetoond door de synthese van een aantal biologisch actieve verbindingen. Of deze biologisch actieve eindproducten ooit op commerciële schaal gebruikt zullen worden, hangt af van de hoeveelheid onderzoek die nog nodig is voor een verbinding toegepast mag worden. Dit kan vooral bij gebruik als medicijn een lange periode

in beslag nemen en veel geld kosten. Daarnaast zijn de mogelijkheden tot opschaling van de reacties en de produktiekosten op grote schaal belangrijk. Over de opschalingsmogelijkheden zijn we vooral positief over de routes via de geconjugeerde CN additie gevolgd door de Robinson annelering tot het gefunctionaliseerde decalon **14a**.

De belangrijkste conclusie die getrokken kan worden is dat de aandacht voor S-(+)-carvon als chirale uitgangsstof in de synthese vergroot is. Het onderzoek naar de toepassing van S-(+)-carvon in de chirale synthese heeft voldoende stof opgeleverd voor zes publicaties in *Tetrahedron*. Daarnaast zal een meer op de toepassing gericht artikel verschijnen in *Industrial Crops and Products*.

6. Publicaties:

1. B. J. M. Jansen, J. A. Kreuger and Ae. de Groot, *Tetrahedron*, **1989**, *45*, 1447-1452. The conversion of (-)- and (+)-dihydrocarvone into chiral intermediates for the synthesis of (-)-polygodial, (-)-warburganal and (-)-muzigadial.
2. A. A. Haaksma; B. J. M. Jansen and Ae. de Groot, *Tetrahedron*, **1992**, *48*, 3121-3130. Lewis acid catalyzed Diels-Alder reactions of S-(+)-carvone with silyloxy dienes. Total synthesis of (+)- α -cyperone.
3. H. J. Swarts, A. A. Haaksma, B. J. M. Jansen and Ae. de Groot, *Tetrahedron*, **1992**, *48*, 5497-5508. The synthesis of chiral decalones, (-)-1,1,4a-trimethyl-2-decalol and (+)-geosmin from S-(+)-carvone (part 3).
4. A. A. Verstegen-Haaksma, H. J. Swarts, B. J. M. Jansen and Ae de Groot, *Tetrahedron* submitted. S-(+)-carvone as starting material in synthesis (part 4). Conjugate addition of cyanide and Grignard nucleophiles followed by annulation to functionalized decalones.
5. H. J. Swarts, A. A. Verstegen-Haaksma, B. J. M. Jansen and Ae de Groot, *in prep.* Total synthesis of drimane sesquiterpenes from S-(+)-carvone (part 5).
6. A. A. Verstegen-Haaksma, H. J. Swarts, B. J. M. Jansen and Ae de Groot, *in prep.* Total synthesis of (-)-Ambrox^R from S-(+)-carvone (part 6).
7. A. A. Haaksma and N. Bottema, *in prep.* S-(+)-carvone as starting material in the synthesis of fine chemicals.

Referenties

1. zie publicatie 1
2. zie publicatie 2
3. zie publicatie 3
4. zie publicatie 4
5. zie publicatie 6
6. zie publicatie 5
7. Weenen, H.; Nkunya, M. H. H.; Bray, D. H.; Mwasumbi, L. B.; Kinabo, L. S.; Kilimali, V. A. E. B. and Wijnberg, J. B. P. A. *Planta Med.* **1990**, *56*, 371

8. Jansen, B. J. M.; Sengers, H. W. J. M.; Bos, H. J. T. and de Groot, Ae. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 855
9. Chang, T. Y.; Schiavoni, J. R.; McCrae, K. R.; Nelson, J. A. and Spencer, T. A. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 11258.
10. Tozyo, T.; Yasuda, F.; Nakai, H. and Tada, H. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1992**, 1859.

8 Besteding personele capaciteit en materieel van 01/01/1993 - 01/01/1994

8.1 Personeel Begroot m d Gerealiseerd m d

Eigen aandeel

Onderzoekleiding

1 hoogleraar

6

6

1 UD-er schaal 11

12

12

Programma-aandeel

Onderzoekleiding

AIO

79530

216

79530

216

Assistentie

1 analist

78450

216

78450

216

Totaal personeel

157980

157980

8.2 Materieel (Belangrijke kostenposten aangeven + diversen materieel)

Eigen aandeel

kosten infrastructuur

15.000

15.000

Programma-aandeel

infrastructuur

10000

9600*

chemicaliën

20000

21309

diversen

1000

1000

Totaal materieel

46000

46909

Totaal project

203980

204889

* membraanpomp

8 Besteding personele capaciteit en materieel van 01/01/1994 - 01/04/1994

8.1 Personeel Begroot m d Gerealiseerd m d

Eigen aandeel

Onderzoekleiding

1 hoogleraar

1,5

1,5

1 UD-er schaal 11

3

3

Programma-aandeel

Onderzoekleiding

AIO

16.500

54

16.500

54

Assistentie

1 analist

16.500

54

16.500

54

Totaal personeel

33.000

33.000

8.2 Materieel (Belangrijke kostenposten aangeven + diversen materieel)

Eigen aandeel

kosten infrastructuur

3.750

3.750

Programma-aandeel

chemicaliën

5.000

5.000

diversen

500

500

Totaal materieel

9.250

9.250

Totaal project

42.250

42.250

5.10 Bioconversie van S(+)-carvon, een haalbaarheidsonderzoek

**BIOCONVERSIE VAN (+)-CARVON,
EEN HAALBAARHEIDSONDERZOEK.**

J.N. Bottema-Mac Gillavry



September 1991

**Groningen Biotechnology Centre
Eindverslag over de periode
1-5-1990 tot 1-5-1991**

RUG

PROJECTVERSLAG OVER DE PERIODE 1 MEI 1990 TOT 1 MEI 1991

GRONINGEN BIOTECHNOLOGY CENTRE

Projectleiding: Prof. dr B. Witholt
Nijenborgh 16
9747 AG GRONINGEN

Medewerker: J.N. Bottema-Mac Gillavry

1. Projecttitel: Onderzoek naar de toepasbaarheid van karwijolie als grondstof voor bio-conversies en de biosynthese van farmaca, gewasbeschermingsmiddelen en fijnchemicaliën.

2. Onderzoekverslag: 2.1 Vraagstelling
2.2 Samenvatting
2.3 Opzet van het onderzoek
2.4 Resultaten
2.5 Conclusies
2.6 Verder onderzoek

2.1 Vraagstelling:

(Zie voor verklaring van termen bijlage 2)

Dit project is opgezet als haalbaarheidsonderzoek, met als vraagstelling: is het mogelijk om componenten van karwijzaadolie door bacteriën om te laten zetten in meer hoogwaardige verbindingen, teneinde het economisch potentieel van het gewas te verhogen. Deze vraag werd gemotiveerd door de steeds toenemende aanscherping van eisen ten aanzien van zuiverheid van grondstoffen voor de industrie van farmaca, geur- en smaakstoffen en bestrijdingsmiddelen.

Voorals chirale stoffen zijn moeilijk zuiver te synthetiseren. Bij de chemische synthese ontstaan meestal racemische mengsels, waarvan de componenten moeilijk of slechts tegen hoge kosten zijn te scheiden. Van deze mengsels heeft meestal slechts één van de componenten de gewenste eigenschappen, de overige zijn hetzij inert, hebben totaal andere eigenschappen of zijn toxisch. Dit is al te zien aan carvon, het hoofdbestanddeel van karwijolie: (+)-carvon geeft de specifieke smaak en geur aan karwij, (-)-carvon heeft de muntsmaak en geur.

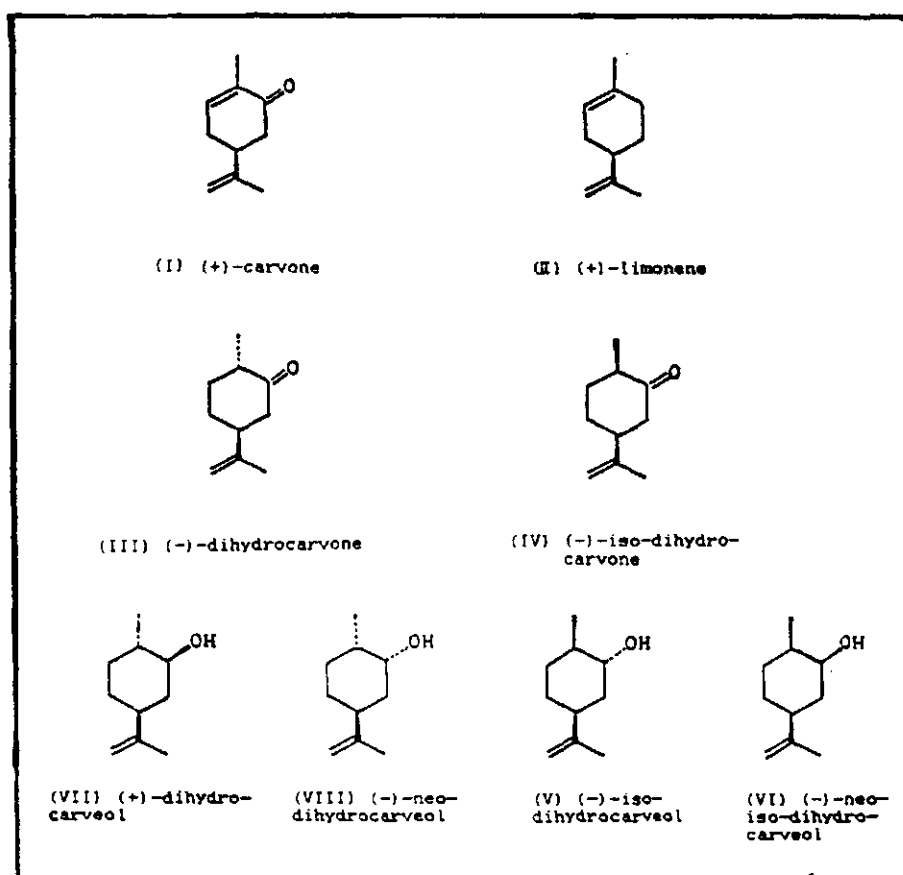
Biologische processen verlopen meestal specifieker dan chemische, zodat het soms mogelijk is stereoisomeren zuiver te verkrijgen met behulp van bio-katalyse. Wanneer dit niet het geval is, is het in veel gevallen mogelijk mutanten van micro-organismen te selecteren die wel specifiek één verbinding produceren en/of een verhoogde productie hebben.

2.2 Samenvatting:

Een aantal micro-organismen is gescreend op hun vermogen om (+)-carvon om te zetten. Omdat de micro-organismen in de meeste gevallen een tweede koolstofbron nodig hadden om carvon om te kunnen zetten, zijn de tests meestal in nutriënte bouillon uitgevoerd. Drie reductieproducten van carvon bleken tamelijk zuiver geproduceerd te kunnen worden.

De bacteriën produceerden hoofdzakelijk één van de twee dihydrocarvonen; één bacterie produceerde achtereenvolgens de beide dihydrocarvonen. Een geteste schimmel produceerde neo-iso-dihydrocarveol en kleine hoeveelheden van de beide carveolen. De schimmel verschilde hierdoor van de bacteriën. De productie van neo-iso-dihydrocarveol had een hoog rendement en is van belang doordat uit deze verbinding door middel van oxydatie iso-dihydrocarvon zuiver te bereiden is. Bij de andere conversies werd het gevormde dihydrocarvon steeds verontreinigd door geringe hoeveelheden van de stereoisomeer.

(+)-Limoneen is als substraat aan één micro-organisme toegevoegd. Deze verbinding werd door dit micro-organisme geheel afgebroken. Er trad geen conversie op.



Figuur 1 - Hoofdbestanddelen van karwij-olie, (+)-carvon en (+)-limoneen en de reductieproducten van (+)-carvon.

2.3 Opzet van het onderzoek:

(Romeinse cijfers verwijzen naar figuur 1)

2.3.1 Substraatkeuze

Karwijzaadolie bestaat voornamelijk uit (+)-carvon (I) en (+)-limoneen (II), die in min of meer gelijke hoeveelheid voorkomen. Daarnaast bevat de olie nog een groot aantal andere componenten in zeer geringe concentraties. Alle componenten van de olie zijn vluchtig. Ze behoren voor het merendeel tot de terpenoïden. Hoewel (+)-carvon ook in andere planten voorkomt, bijvoorbeeld in dille, is karwij de grootste natuurlijke bron van deze verbinding. (+)-Limoneen wordt in bulkhoeveelheden uit citrusafval geïsoleerd. Omdat (+)-carvon het meest specifieke bestanddeel is van karwijzaadolie, is deze component in eerste instantie uitgekozen als substraat.

2.3.2 Keuze van biokatalysatoren

Biokatalysatoren kunnen hele organismen zijn (bacteriën of schimmels), plantaardige of dierlijke cellen of afzonderlijke enzymen. Omdat het werken met bacteriën bepaalde voordelen heeft, is hiervoor gekozen. Een aantal bacteriën is geselecteerd, waarvan volgens literatuurgegevens kon worden aangenomen dat ze bestand zouden zijn tegen carvon en deze stof om zouden zetten.

Pseudomonas oleovorans GP01
Pseudomonas putida PpG1
Pseudomonas ovalis ATCC 31171
Pseudomonas mendocina ATCC 25411
Nocardia alba ATCC 43130
Nocardia rubra ATCC 15906
Corynebacterium hydrocarboclastus ATCC 15592
*Clostridium sp.*La 1 DSM 1460

Nocardia rubra was zeer sensitief voor carvon en is daarom verder niet gebruikt. De laatste twee bacteriën zijn niet getest wegens tijdgebrek.

Verder zijn twee bacteriesoorten getest, die zich als vrijwilliger meldden, door als verontreiniging op te treden in culturen met een hoge carvon concentratie, namelijk een niet nader geïdentificeerde monococ en een als *Staphylococcus epidermidis* gedetermineerde coc.

Tevens is een schimmel, *Trichoderma pseudokoningii* getest, die bij het onderzoek naar enzymatische ontsluiting van karwijzaad bij het ATO in Wageningen is gebruikt, maar voor dat doel niet geschikt bleek, omdat hij carvon omzette.

2.3.3 Werkwijze

De tests werden uitgevoerd in batch-cultures in 250 of 500 ml schudkolven of serumflessen, volgens de één- of de twee-fasen methode.

Twee-fasen methode: bij de twee-fasen methode werd zoveel substraat toegevoegd (10-20%), dat dit een aparte organische fase vormde, drijvend op de waterlaag. De micro-organismen bevonden zich in de waterfase. Het voordeel van deze methode is dat het substraataanbod constant blijft en dat eventueel toxische, apolaire stoffen door de organische fase aan de waterfase worden onttrokken.

Eén-fase methode: bij deze methode werd een hoeveelheid substraat toegevoegd die zo gering was, dat het zich geheel met de waterlaag mengde en zich geen tweede fase vormde. In de literatuur wordt de oplosbaarheid van carvon vermeld als 1.32 g/l (8,8 mM) in water en 8 mM in bouillon. Aangezien bovendien de meeste geteste bacteriën in bouillon zich niet vermenigvuldigden bij carvonconcentraties boven 7 mM, is carvon steeds toegevoegd in concentraties variërend van 1-6 mM.

Co-substraat: sommige micro-organismen waren uitsluitend in staat carvon om te zetten in aanwezigheid van een tweede koolstofbron, het co-substraat. Van de twee als co-substraat geteste verbindingen, citraat en ethanol, bleek ethanol het beste te voldoen. De meeste tests werden uitgevoerd in nutriënte bouillon, waarin voldoende co-substraat aanwezig was.

Verdamping: door het verdampen van carvon en ethanol was het aanvankelijk moeilijk, om de uitgangskonzentratie van deze stoffen op het gewenste niveau te krijgen. Dit probleem werd opgelost door de gasfase boven de vloeistof te verzadigen met damp van de vluchtige substraten. Hiertoe werd een milliliter van elk van deze stoffen in een buisje in de kolf geplaatst.

2.3.4 Identificatie van de producten

Identificatie van de producten was aanvankelijk een probleem, omdat het moeilijk was de betreffende stoffen zuiver te verkrijgen. De producten werden daarom geanalyseerd aan de hand van de analyse van karwijzaadolie door T.C.J. Luyendijk (1986). Door dezelfde gaschromatografische techniek toe te passen, konden de chromatogrammen worden vergeleken en de pieken worden geïdentificeerd. Deze identificatie werd vervolgens gecontroleerd met behulp van massaspectrometrie. Met massaspectrometrie konden echter geen stereoïsomeren worden onderscheiden. In de tweede helft van de onderzoeksperiode werden tamelijk zuivere monsters van de verschillende stoffen geschonken door de vakgroep Organische Chemie van de Landbouwniversiteit Wageningen. Met behulp van deze monsters kon de identificatie ook van de stereoïsomeren gaschromatografisch bevestigd worden.

2.3.5 Analysemethoden

Gaschromatografie (GC): de voor de identificatie gebruikte gaschromatografische methode voldeed tevens goed voor de analyse van de monsters, aangezien alle gevormde producten (ook stereoisomeren) met deze methode werden onderscheiden. Een CP wax 52 CB kolom werd gebruikt met een vlamionisatiedetector (FID). Voor de identificatie van de componenten werd een temperatuurprogramma van 45-220°C toegepast. Voor verdere analyses werd dit programma sterk ingekort.

Te analyseren monsters van de waterfase werden voorafgaand aan de analyse geëxtraheerd met een gelijk volume pentaan/ether (1:1); monsters van de organische fase werden verdund met hetzelfde extractiemiddel.

Kwantificering: gevonden waarden werden betrokken op een interne standaard (2-octanol). Pas na het verkrijgen van zuivere monsters konden van alle betrokken verbindingen responsfactoren bepaald worden. Aangezien deze factoren slechts weinig afweken van de responsfactor van carvon, is deze gebruikt voor de berekening van alle concentraties bij het ontbreken van de andere factoren.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC):

Om monsters van de waterfase direct, zonder voorafgaande extractie, te kunnen analyseren werd een HPLC methode ontwikkeld. Reversed phase analyse op een nitrosil C₁₈ kolom met als eluens acetonitril/water (1:1) gaf een goede scheiding van carvon, dihydrocarvon en carveol. Dihydrocarveol werd niet van carvon gescheiden. Omdat de stereoisomeren niet met deze methode gescheiden konden worden is de methode echter verder niet toegepast.

Detectie vond plaats met een UV-detector bij 212 nm (zie onder). Hoewel veel organische stoffen sterk absorberen bij deze golflengte, verschilde hun retentietijd op de gebruikte kolom zo sterk van die van carvon en conversieproducten dat ze de analyse niet verstoorden.

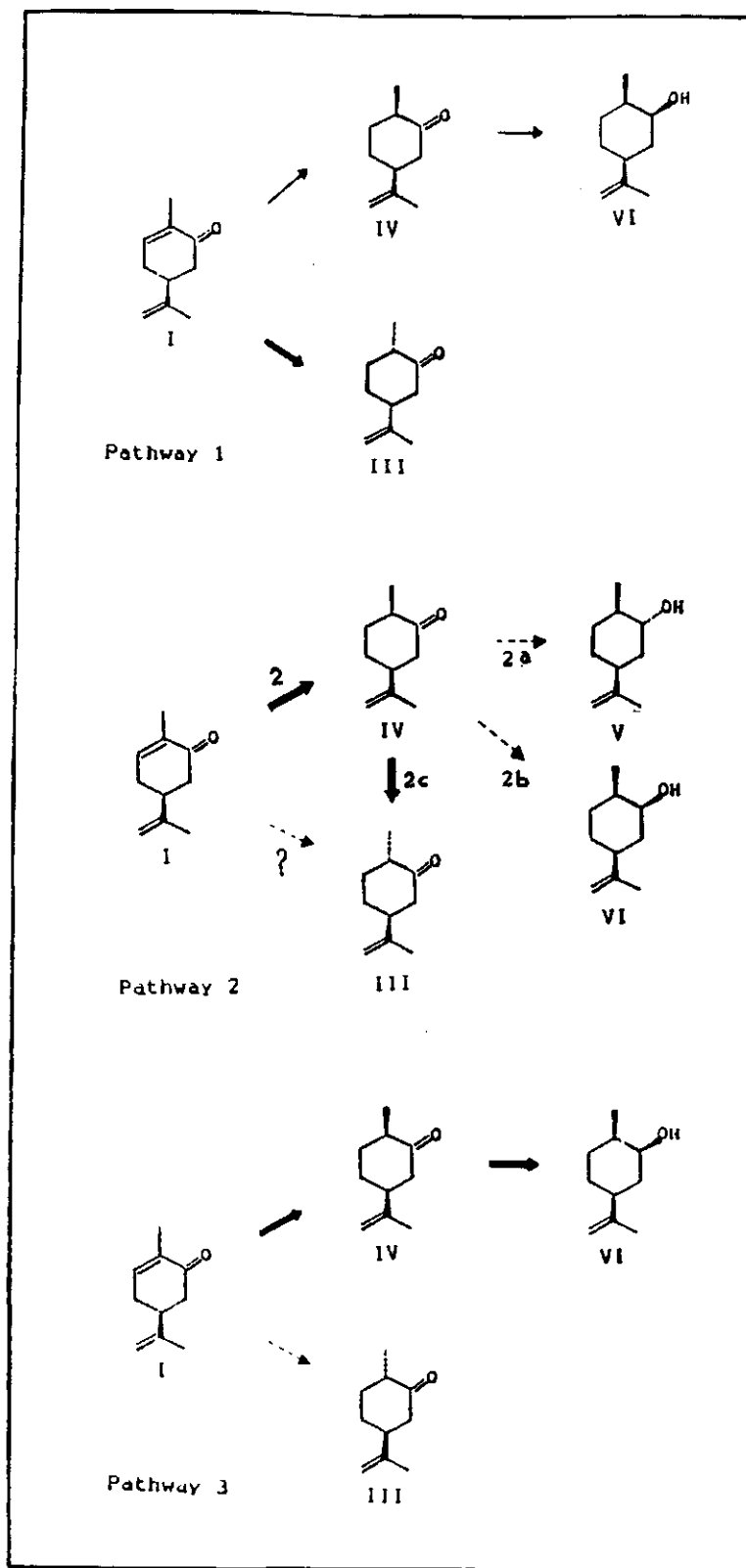
UV-absorptiespectra: van de betreffende stoffen werd eerst het UV-absorptiespectrum bepaald (Bijlage 1). Deze stoffen hebben geen absorptiebanden, maar wel absorptiemaxima. In de literatuur werden maxima vermeld bij ca 235-250 nm. Dit bleken echter lokale maxima te zijn; de geteste stoffen hadden sterkere maxima bij lagere golflengten. Voor de detectie van alle betreffende stoffen bleek een golflengte van 212 nm goed te voldoen.

2.4 Resultaten:

2.4.1 Eén-fase systemen

2.4.1.1 Bioconversieroutes

(+)-Carvon kon door alle geteste micro-organismen worden getransformeerd. Tot nu toe is alleen reductieve conversie gevonden. Deze verliep bij de verschillende micro-organismen via verschillende routes, maar steeds in één tot twee stappen (Figuur 2).



Figuur 2 - De verschillende bio-conversie routes.
 Route 1 produceert voornamelijk dihydrocarvon (III).
 Route 2 produceert aanvankelijk iso-dihydrocarvon (IV). Dit wordt omgezet in III (2c), in VI (weinig, 2b) en in V (nog minder, 2a)
 Route 3 produceert voornamelijk neo-iso-dihydrocarveol (VI).

In de eerste stap werd de dubbele band in de ring verzadigd. Hierbij ontstond een dihydrocarvon. In de tweede stap werd de carbonylgroep van dihydrocarvon gereduceerd, waardoor een dihydrocarveol gevormd werd.

Bij elke reductiestap werd een nieuw chiraal centrum aan het molecuul toegevoegd. In theorie zouden hierdoor uit (+)-carvon twee dihydrocarvonen en vier dihydrocarveolen kunnen ontstaan. In de praktijk bleken inderdaad beide dihydrocarvonen, echter slechts twee van de dihydrocarveolen te ontstaan, namelijk de beide iso-dihydrocarveolen V en VI.

De bacteriën volgden route 1 of 2.

Via route 1 werd voornamelijk dihydrocarvon (III) gevormd. Daarnaast konden al of niet uiterst kleine hoeveelheden iso-dihydrocarvon (IV) en neo-iso-dihydrocarveol (VI) worden gevormd. De bacteriën die deze route volgden hadden een zeer geringe productie.

Route 2 is gecompliceerder. De bacteriën die deze route volgden, produceerden in de eerste stap iso-dihydrocarvon (IV) en vervolgens minder snel of met een grotere lagtime dihydrocarvon (III), mogelijk direct uit carvon (route 2) of indirect door isomerisatie van IV (route 2c). In sommige gevallen werd IV verder gereduceerd waarbij iso-dihydrocarveol (V, route 2a) of neo-iso-dihydrocarveol (VI, route 2b) ontstonden, echter steeds in zeer minieme hoeveelheden.

De enige geteste schimmel die carvon omzette volgde route 3. Hierbij werden aanvankelijk de producten III, IV en VI in gelijke concentraties gesynthetiseerd. Na 1 dag begon echter de synthese van neo-iso-dihydrocarveol (VI) te domineren. Gepaard hieraan vond een geringe synthese van trans- en cis-carveol plaats, door directe reductie van de carbonylgroep, waarbij de dubbele band in de ring intact bleef. De concentraties van de overige stoffen namen tegelijkertijd af, zodat na 4 dagen de concentratie van VI sterk overheerste. Deze schimmel was het enige organisme dat deze route volgde en een dihydrocarveol als voornaamste product had.

Tabel 1 geeft een overzicht van de door de verschillende micro-organismen gevolgde bioconversieroutes en hun belangrijkste producten.

| Organisme | product | route |
|--------------------------|------------------------|-------|
| <i>P. ovalis</i> | dihydrocarvon | 1 |
| <i>Monococ</i> | dihydrocarvon | 1 |
| <i>Monococ</i> | dihydrocarvon + | |
| + <i>S. epidermidis</i> | iso-dihydrocarvon | 1+2 |
| <i>S. epidermidis</i> | iso-dihydrocarvon | 2 |
| <i>N. alba</i> | iso-dihydrocarvon + | |
| | dihydrocarvon | 2c+2b |
| <i>P. oleovorans</i> | iso-dihydrocarvon | 2a+2b |
| <i>T. pseudokoningii</i> | neo-iso-dihydrocarveol | 3 |

2.4.1.2 Opbrengst:

De opbrengst van een product is afhankelijk van de aanvangsconcentratie van het substraat, de productiesnelheid, de lengte van de productieperiode en de afbraak- of omzettingssnelheid.

Specifieke activiteit: de specifieke activiteit, het aantal μmol product dat per minuut wordt gevormd door een gram cellen (drooggewicht) is een maat voor de productiesnelheid. De celmassa werd indirect bepaald door meting van de optische dichtheid van bacteriesuspensies bij 450 nm. Deze bepaling kon niet worden uitgevoerd bij *Trychoderma*, daar de cellen van deze schimmel in de vorm van bolletjes of linten geassocieerd bleven. Daarom is voor alle conversies eveneens de productie per minuut per liter weergegeven (Tabel 2).

Nocardia alba had de hoogste specifieke activiteit, gevolgd door *Trychoderma pseudokoningii* en *P. oleovorans* GPO₁.

Tabel 2

| Organisme | Product | Max. spec. act | | Opbrengst | |
|------------------------------|---------|------------------------------------|-------------------------------------|---------------|------------------|
| | | $\mu\text{mol}/\text{min}$ gram | $\mu\text{mol}/\text{min}$ liter | netto mg/l | rende- ment % |
| <i>P. ovalis</i> | III | 0,1 | 0,1 | 79 | 8 |
| | IV | 0,08 | 0,07 | 3 | 0,3 |
| <i>Monococ</i> | III | 0,08 | 0,2 | 109 | 11 |
| | IV | 0,02 | 0,09 | 20 | 2 |
| <i>Monococ + S. epiderm.</i> | III | 0,03 | 0,09 | 335 | 34 |
| | IV | 0,01 | 0,03 | 117 | 12 |
| <i>S. epidermidis</i> | III | 0,02 | 0,03 | 31 | 0,3 |
| | IV | 0,3 | 0,3 | 164 | 18 |
| <i>N. alba</i> | III | 0,7 | 0,4 | 197 | 22 |
| | IV | 3,5 | 1,5 | 226 | 25 |
| | VI | 0,04 | 0,03 | 73 | 8 |
| <i>P. oleovorans</i> | III | 0,07 | 0,04 | 85 | 10 |
| | IV | 1,3 | 0,5 | 287 | 33 |
| <i>T. pseudokoningii</i> | III | - | 0,4 | 79 | 28 |
| | IV | - | 0,3 | 51 | 18 |
| | VI | - | 0,7 | 202 | 71 |
| | tc | - | 0,08 | 13,5 | 5 |
| | cc | - | 0,09 | 8,5 | 3 |

III=dihydrocarvon; IV=iso-dihydrocarvon; VI=neo-iso-dihydrocarvon; tc=trans-carveol; cc=cis-carveol;

Rendement: het rendement van een product is berekend door de netto opbrengst (maximaal bereikte concentratie) van het product te betrekken op de beginconcentratie van het substraat.

T. pseudokoningii had het hoogste rendement bij de productie van neo-iso-dihydrocarveol (VI). De aanvangsconcentratie van carvon kon bij deze schimmel echter ten hoogste 0,3 g/l (2 mM) zijn, waardoor ook de netto-opbrengst slechts 0,2 g/l was. De overige geteste micro-organismen konden carvon omzetten bij een beginconcentratie van 0,9 g/l (6 mM). Hun netto opbrengsten lagen in het algemeen niet veel hoger dan bij *Trychoderma*, daar hun rendement aanmerkelijk geringer was.

De hoogste netto opbrengst (0,34 g/l) had de mengcultuur van monococcon met *S. epidermidis* bij de productie van dihydrocarvon (III). De netto opbrengsten van deze micro-organismen afzonderlijk waren respectievelijk 0,1 g/l en 0,03 g/l. Er was dus waarschijnlijk sprake van synergisme bij de productie van dihydrocarvon. Dit was niet het geval bij de productie van iso-dihydrocarvon (IV). Hiervoor was *S. epidermidis* blijkbaar uitsluitend verantwoordelijk.

2.4.1.3 Productie van dihydrocarvonen

Dihydrocarvon (III):

De geteste bacteriën die route 1 volgden produceerden voornamelijk dihydrocarvon. Het rendement was echter zeer laag (figuur 3). De mengcultuur van *Monococ* met *Staphylococcus epidermidis* had een hoge opbrengst aan dihydrocarvon, maar bevatte door de actie van *S. epidermidis* tevens een hoge hoeveelheid iso-dihydrocarvon. De tot nu toe geteste bacteriën die route 1 volgden waren daardoor niet geschikt voor de productie van dihydrocarvon.

Iso-dihydrocarvon (IV):

De productie van iso-dihydrocarvon (de cis-isomeer) ging steeds gepaard met een geringe productie van dihydrocarvon, de trans-isomeer (figuren 4 en 5). Dit verschijnsel kan op verschillende manieren verklaard worden.

1- dihydrocarvon ontstond door conversie van carvon, met een lagere specifieke activiteit dan iso-dihydrocarvon.

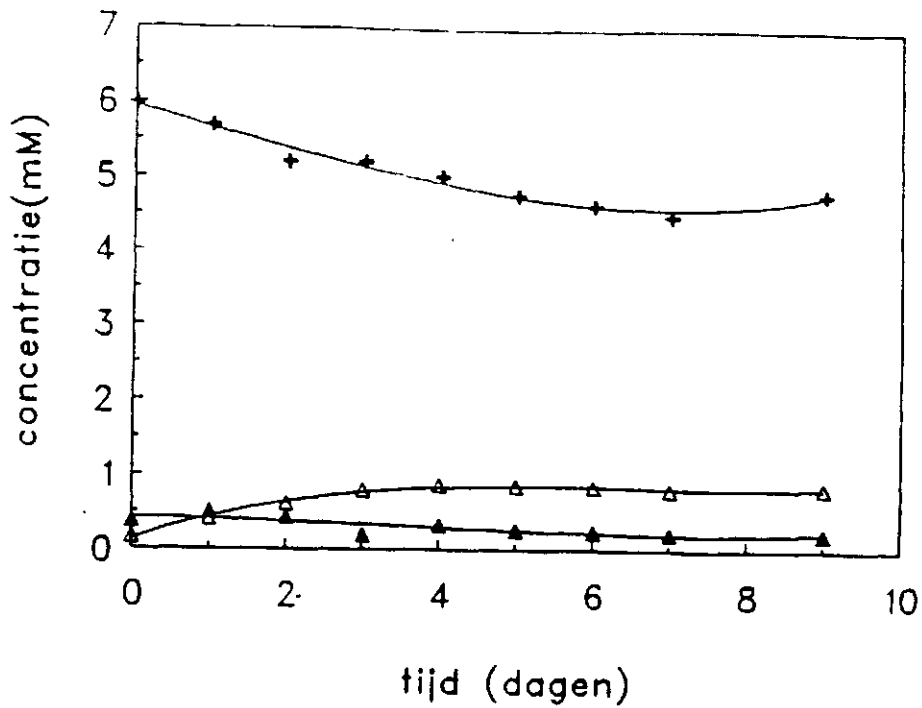
2- er trad spontane isomerisatie op:

iso-dihydrocarvon → dihydrocarvon.

In karwijzaadolie wordt steeds een vaste verhouding van deze isomeren gevonden (d/i=3). De transvorm lijkt hierdoor stabiel te zijn dan de cis-vorm. Mogelijk zal daarom het gevormde iso-dihydrocarvon trachten een meer stabiele toestand aan te nemen, door isomerisatie naar de transvorm.

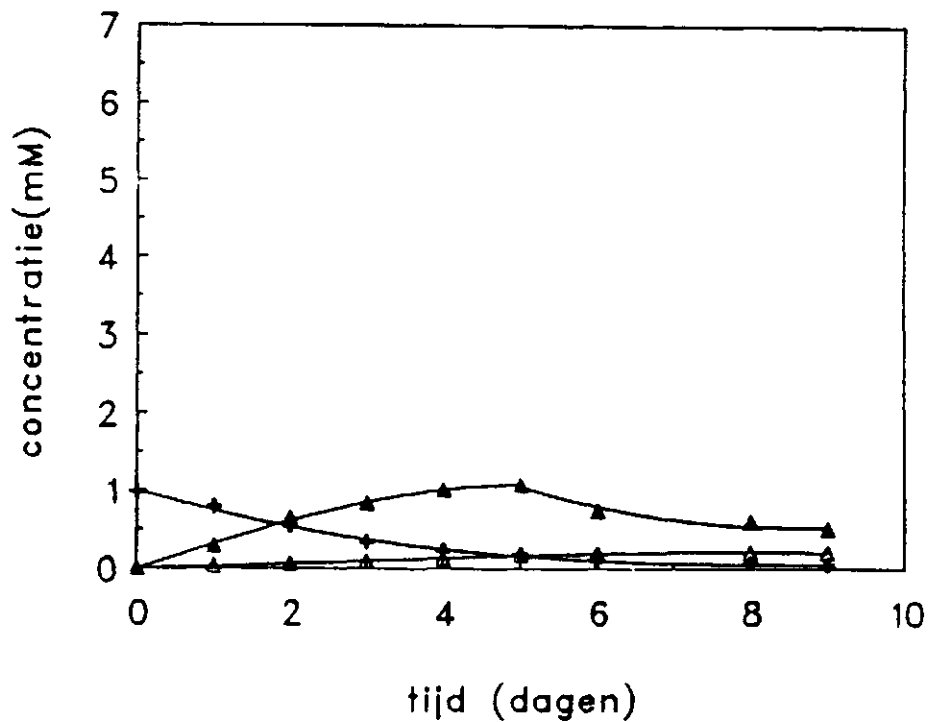
Door het ontbreken van zuiver iso-dihydrocarvon kon niet gecontroleerd worden of dit proces inderdaad optrad.

3- het gevormde iso-dihydrocarvon induceerde een isomerase, dat de omzetting naar dihydrocarvon bewerkstelligde.



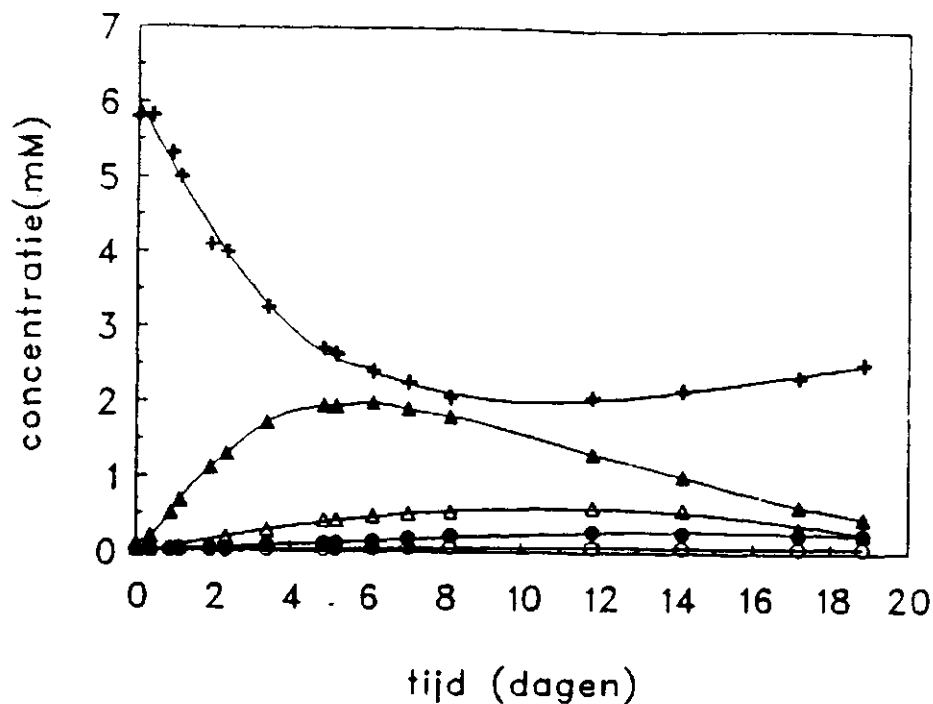
Figuur 3 - Route 1: Monococ.
 Conversie van 6 mM (+)-carvon in bouillon.

+ (+)-carvon; Δ (-)-dihydrocarvon; ▲ (-)-iso-dihydrocarvon;



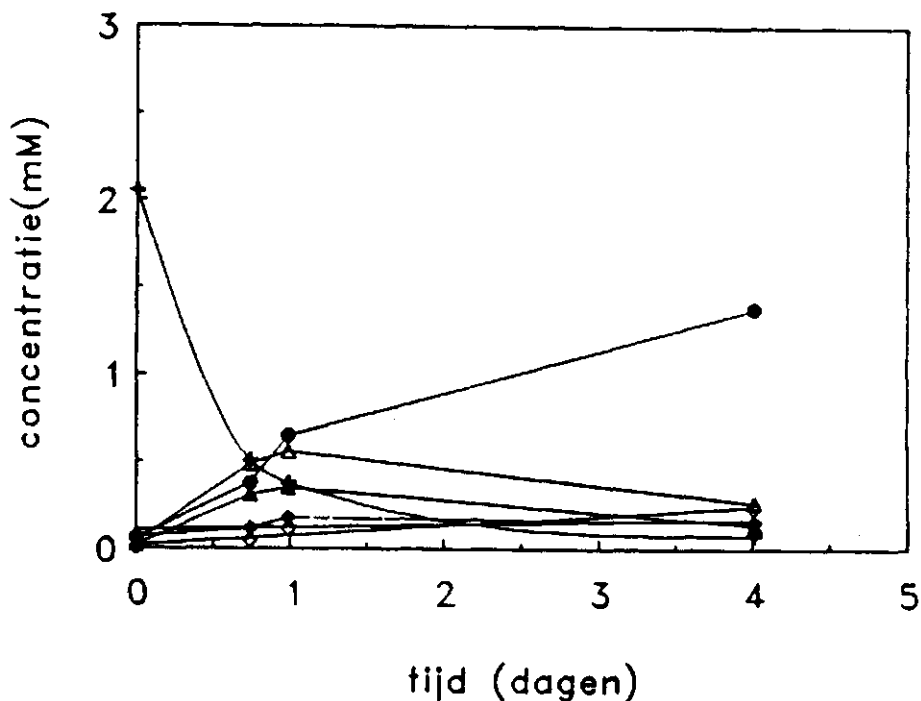
Figuur 4 - Route 2: Staphylococcus epidermidis.
 Conversie van 6 mM carvon in bouillon.

+ (+)-carvon; Δ (-)-dihydrocarvon; ▲ (-)-iso-dihydrocarvon;



Figuur 5 - Route 2: *Pseudomonas oleovorans* GPol.
 Conversie van 6 mM carvon in bouillon.

+ (+)-carvon; Δ (-)-dihydrocarvon; ▲ (-)-iso-dihydrocarvon;
 ○ (-)-iso-dihydrocarveol; ● (-)-neo-iso-dihydrocarveol;



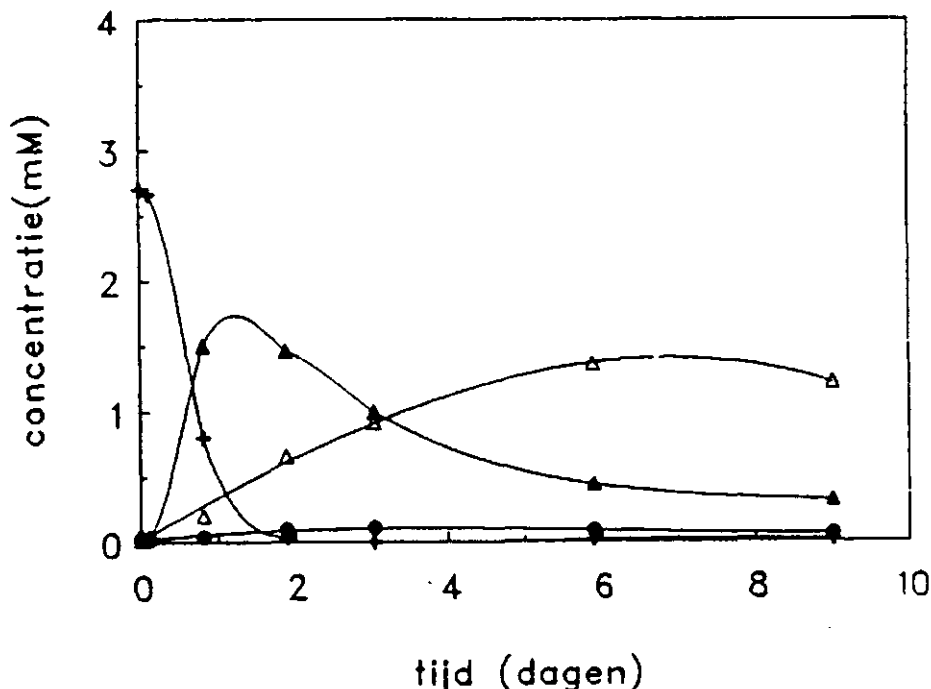
Figuur 6 - Route 3: *Trychoderma pseudokoningii*.
 Conversie van 2 mM carvon in bouillon.

+ (+)-carvon; Δ (-)-dihydrocarvon; ▲ (-)-iso-dihydrocarvon;
 ● (-)-neo-iso-dihydrocarveol; ◇ trans-carveol; ◆ cis-carveol;

De meeste experimenten lieten niet toe hierover een uitspraak te doen. Een uitzondering vormde de conversie van 6 mM carvon door *Nocardia alba* (Figuur 7). Binnen 40 uur werd hierbij carvon vrijwel geheel omgezet en werd de maximale concentratie van iso-dihydrocarvon bereikt. Hierna ging een afname van iso-dihydrocarvon gepaard met een toename van dihydrocarvon, tot een maximum waarde die vrijwel gelijk was aan die van iso-dihydrocarvon. Aangezien er geen carvon meer beschikbaar was, moest iso-dihydrocarvon wel het substraat zijn voor de vorming van dihydrocarvon.

Daar iso-dihydrocarvon vrijwel volledig in de trans-isomeer werd omgezet, kon er geen sprake zijn van spontane isomerie. Hieruit kan geconcludeerd worden dat er inderdaad sprake was van een isomerase.

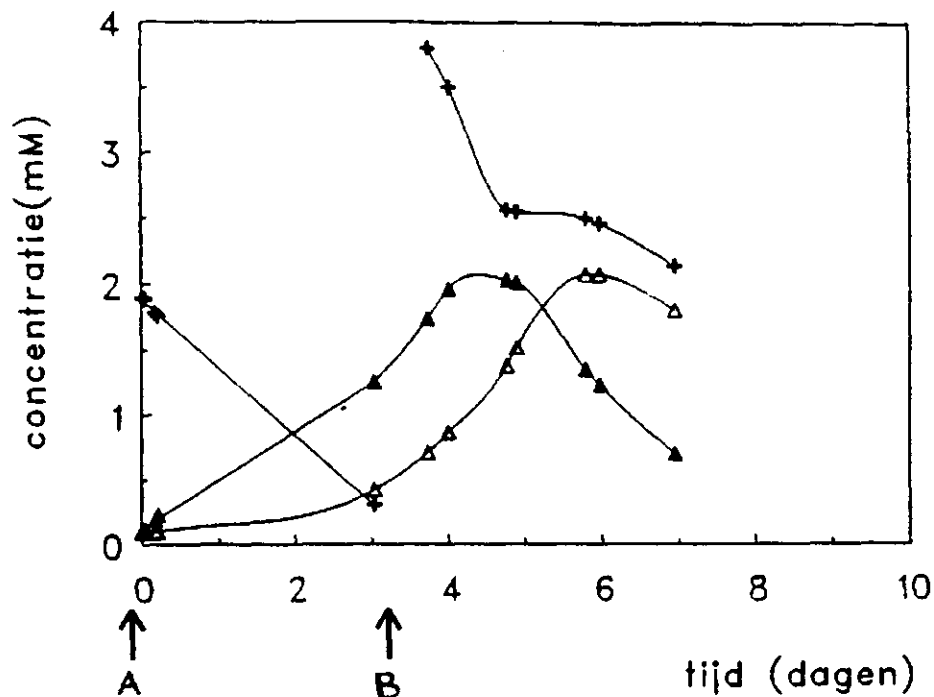
In een tweede experiment werd aannemelijk gemaakt dat het tweede enzym geïnduceerd moest worden. Hierin werd *Nocardia alba* eerst geïncubeerd met 3 mM carvon. Na ca 70 uur was het substraat grotendeels verbruikt en was er drie maal zoveel iso-dihydrocarvon als dihydrocarvon aanwezig. Na opnieuw toevoegen van 4 mM carvon verdubbelde de snelheid van de dihydrocarvonsynthese (Figuur 8).



Figuur 7 - *Nocardia alba*.

Conversie van 6 mM carvon in bouillon via route 2. De omzetting van carvon in iso-dihydrocarvon werd gevolgd door isomerisatie van iso-dihydrocarvon in dihydrocarvon.

+ (+)-carvon; Δ (-)-dihydrocarvon; ▲ (-)-iso-dihydrocarvon;
● (-)-neo-iso-dihydrocarveol;



Figuur 8 - *Nocardia alba*. Carvon werd tweemaal toegevoegd: aan het begin van het experiment (A) en na 70 uur (B).

+ (+)-carvon; Δ (-)-dihydrocarvon; ▲ (-)-iso-dihydrocarvon;

Productinhibitie: in experimenten met *N. alba* en *P. oleovorans* GP01 stopte de conversie van carvon nadat de iso-dihydrocarvonconcentratie 2 mM had bereikt. Bij lagere productconcentraties werd dit niet geconstateerd. Blijkbaar was er bij deze experimenten sprake van productinhibitie.

2.4.1.4. Productie van dihydrocarveolen

Door de geteste micro-organismen werd overwegend neo-iso-dihydrocarveol (VI) gevormd. Iso-dihydrocarveol (V) ontstond niet of nauwelijks. Getuige het ontbreken van de beide trans-dihydrocarveolen, dihydrocarveol (VII) en neo-dihydrocarveol (VIII), waren de geteste organismen geen van alle in staat om trans-dihydrocarvon om te zetten en bleek spontane isomerisatie naar de trans-vorm bij dihydrocarveol niet aan de orde te zijn.

2.4.2 Twee-fasen systemen

Organische apolaire stoffen zijn dikwijls toxisch. Dit is ook met carvon het geval. Een groot aantal publicaties maakt melding van de bactericide en fungicide werking van deze verbinding.

Toxische verbindingen kunnen toch in twee-fasen systemen worden toegepast wanneer ze zeer hydrofoob zijn, dat wil zeggen zeer slecht oplosbaar zijn in water. De oplosbaarheid van carvon is volgens de literatuur 1.32 g/l in water. Dit komt overeen met ca 8 mM. Deze oplosbaarheid is blijkbaar te hoog voor het functioneren van carvon als substraat in een twee-fasen systeem.

In alle met (+)-carvon geteste twee-fasen systemen werd geen bioconversie waargenomen. De systemen met *Pseudomonas oleovorans*, *P. putida* en *P. ovalis* (10% carvon v/v) en met *Staphylococcus epidermidis* (20 % carvon v/v) werden gedurende enkele maanden gevolgd. In geen van beide fasen veranderde de terpenoïd samenstelling, hoewel steeds viable cells aanwezig waren: bij *P. oleovorans* en *P. putida* na twee maanden nog ca 70% van de begintoestand). Onder de fasencontrast microscoop waren inclusies te zien in het cytoplasma van de bacteriën. Dit wijst erop dat het substraat in ieder geval door de cellen was opgenomen.

2.5 Conclusie

2.5.1. **Producten:** uit (+)-carvon kan door middel van bio-conversie een zestal chirale verbindingen worden verkregen:

- * (-)-dihydrocarvon
- * (-)-isodihydrocarvon
- * (-)-neo-iso-dihydrocarveol
- * (-)-iso-dihydrocarveol
- * trans-carveol
- * cis-carveol

Van de laatste drie producten werden zulke geringe hoeveelheden geproduceerd, dat ze verder niet besproken worden.

Welke verbinding wordt geproduceerd hangt in de eerste plaats af van de gebruikte biokatalysator.

Bacteriën bleken voornamelijk dihydrocarvonen te produceren. De enige geteste schimmel die carvon omzette, produceerde als hoofdproduct één van de vier dihydrocarveolen en weinig van de beide carveolen (trans en cis).

De geteste organismen produceerden in het algemeen slechts één van beide dihydrocarvonen. Een uitzondering vormden *Nocardia alba* en de mengcultuur van monococ en staphylococ. In de mengcultuur was elke soort waarschijnlijk verantwoordelijk voor de aanmaak van één van de twee isomeren, *N. alba* bezat waarschijnlijk een isomerase dat de cis-isomeer in de trans-vorm omzette.

Geen van de geteste micro-organismen produceerde één van beide trans-dihydrocarveolen. In theorie zouden deze door reductie van (trans)-dihydrocarvon gevormd kunnen worden. De micro-organismen waren blijkbaar niet in staat deze reactie uit te voeren. Hierdoor was dihydrocarvon stabiel dan de cis-isomeer. Van de beide isodihydrocarveolen werd voornamelijk neo-iso-dihydrocarveol gevormd, met alle zijgroepen cis ten opzichte van elkaar. Er werd bij dit product geen isomerie naar één van de trans-isomeren geconstateerd.

Trychoderma pseudokoningii produceerde bovendien als enige zeer geringe hoeveelheden van beide carveolen.

2.5.2 Opbrengst:

Hoeveel product per volume-eenheid wordt gevormd is afhankelijk van een groot aantal factoren. De beschikbare tijd was niet toereikend om de rol te bestuderen die deze factoren spelen bij de conversie van (+)-carvon.

Een zeer belangrijke factor was echter de tolerantie van de biokatalysator voor carvon. Deze bepaalde immers de aanvangsconcentratie van carvon en daardoor tevens de maximale hoeveelheid product die kon worden gevormd.

Deze tolerantiegrens lag voor alle geteste organismen bij 7 mM (1,1 g/l) of lager. Bij *T. pseudokoningii* vond bij meer dan 2 mM al geen conversie van carvon meer plaats.

Hierdoor zal in batchcultures de opbrengst van conversieproducten nooit hoger dan ca 1 g/l kunnen zijn.

Dit probleem zal ondervangen kunnen worden door de conversies in continu-cultures uit te voeren. In een dergelijk systeem kan het substraat continu gedoseerd worden toegevoegd.

Een andere belangrijke factor is productinhibitie. Dit lijkt vooral bij de productie van iso-dihydrocarvon een rol te spelen. Hierdoor zou in batchcultures maximaal 2 mM (0,4 g/l) kunnen worden geproduceerd.

2.5.3. Zuiverheid van de producten:

Wanneer dihydrocarvon (III) als belangrijkste product werd gevormd, was de opbrengst zeer laag. In de mengculture, die een relatief hoge opbrengst van III had, werd daarnaast tamelijk veel IV gevormd. Hierdoor waren bacteriën die route 1 volgden niet geschikt voor de productie van dihydrocarvon.

De productie van iso-dihydrocarvon (IV) werd steeds begeleid door een geringere productie van dihydrocarvon (III). Bovendien werd IV door een aantal bacteriën omgezet in neo-iso-dihydrocarveol (VI). Hierdoor kwam iso-dihydrocarvon eigenlijk niet zuiver voor. Op den duur werd iso-dihydrocarvon echter geleidelijk door dihydrocarvon (III) vervangen, zodat III uiteindelijk overheerste en tamelijk zuiver aanwezig was. Hierdoor waren de bacteriën die route 2 volgden wel geschikt voor de productie van dihydrocarvon (III). Dit speelde het sterkst bij de conversie door *N. alba*.

Neo-iso-dihydrocarveol (VI) werd door *T. pseudokoningii* met een hoog rendement geproduceerd. De concentratie van de andere verbindingen nam af tijdens de synthese van VI zodat deze verbinding na 5 dagen tamelijk zuiver aanwezig was.

Voor de productie van een stereoisomeer zuiver product bieden derhalve *Nocardia alba* en *Trychoderma pseudokoningii* de meeste

perspectieven, de eerste voor de productie van dihydrocarvon (III), de tweede voor de productie van neo-iso-dihydrocarveol (VI) en iso-dihydrocarvon (IV), dat gemakkelijk door oxydatie uit VI gesynthetiseerd kan worden.

2.5.4 Andere bronnen van de gevormde producten:

De drie producten van (+)-carvon conversie komen in uiterst geringe concentraties voor in plantaardige oliën. Er is echter geen specifieke producent voor deze verbindingen, waardoor ze moeilijk zuiver uit natuurlijke bronnen te verkrijgen zijn.

Chemisch zijn de verbindingen gemakkelijk te synthetiseren tot racemische mengsels, bijvoorbeeld uit (+)-carvon. Het is echter moeilijk en kostbaar om de componenten isomeer zuiver uit deze mengsels te isoleren.

2.5.5 Afzetmogelijkheden:

Toeleveringsbedrijven: tot nu is alleen Fluka benaderd, via Perstorp Analytical BV. (Oud-Beijerland). Fluka is zeer geïnteresseerd in deze stoffen.

* Gewenste zuiverheid: 95%

* Afzet: ca 1 kg per jaar

* Prijs: SF 2000.-

Geur- en smaakstoffen industrie: de geproduceerde verbindingen hebben een specifieke geur, waardoor ze toepassing vinden in de geurstoffenindustrie.

Voor de gepolste bedrijven mag de prijs als grondstof maximaal f 100.- tot 300.- per kg zijn. Het is niet mogelijk de producten voor deze prijs door middel van bioconversie te leveren, aangezien de prijs van (+)-carvon momenteel f 65.- per kg bedraagt. Het is voorlopig voor deze industrie blijkbaar nog niet van belang om de producten stereoïsoomeer zuiver toe te passen.

Farmaceutische industrie: bij de toepassing van farmaca is isomere zuiverheid tegenwoordig echter wel essentieel. Aangezien de gevormde producten 2, respectievelijk 3 chirale centra bezitten, zouden ze een goede grondstof kunnen zijn voor de chemische synthese van chirale farmaca. Hierover moet nog contact worden opgenomen met de farmaceutische industrie.

Bestrijdingsmiddelen: over de biologische activiteit van de gevormde producten is weinig bekend. Er zijn echter aanwijzingen dat ze een even sterke of sterkere activiteit hebben dan (+)-carvon. De kiemremmende werking bij aardappels van dihydrocarvon (III) is althans even groot als die van carvon. Als onderdeel van het karwijprogramma wordt op de Prof. van Hall-school te Groningen het effect van deze stoffen op een aantal schimmels onderzocht.

2.6 Verder onderzoek

In dit haalbaarheidsonderzoek is uitsluitend getracht een antwoord te geven op de volgende vragen:

- * is het mogelijk (+)-carvon om te zetten in andere producten?
- * welke producten?
- * wat is hun opbrengst?
- * wat zijn de meest geschikte bio-katalysatoren?

Een aantal vragen is echter nog niet beantwoord, zoals de vraag of de gevormde producten toegepast of afgezet kunnen worden. Hiernaar zal verder onderzoek gedaan moeten worden.

De gevonden opbrengsten zijn te laag voor een productieproces. Er is beduidend meer onderzoek nodig om het bio-conversie proces te optimaliseren en de producties te verhogen.

Het beste leent zich hiervoor de conversie in continu cultures, aangezien hierbij zowel het substraataanbod als een groot aantal andere parameters beter geregeld en bestudeerd kunnen worden. Bovendien wordt in continu cultures het medium voortdurend ververs, waardoor het gevormde (eventueel toxische) product steeds wordt afgevoerd.

Eveneens verdient het aanbeveling te trachten een systeem te ontwikkelen, waardoor toch van de voordelen van een twee-fasen systeem gebruik gemaakt kan worden. Gedacht wordt aan het toepassen van een tweede hydrofobe component, waardoor een gunstiger verdeling van substraat en producten over de beide fasen bereikt zou kunnen worden.

Het gedrag van de micro-organismen ten aanzien van limoneen is nog nauwelijks bestudeerd. Bij toepassing van carvon, bijvoorbeeld als kiemremmingsmiddel bij aardappels, zullen er niet onaanzienlijke hoeveelheden limoneen overblijven. Het zou de moeite waard kunnen zijn te onderzoeken of dit in meerwaardige verbindingen omgezet zou kunnen worden.

"KARWIJ", TER VERBETERING VAN KARWIJ ALS AKKERBOUWGEWAS EN TER INTRODUCTIE VAN NIEUWE AFZETMOEGLIJKHEDEN.

bedragen x f 1000,-

| | | | | BEGROTING | | | | | | REALISATIE | | | | | | |
|--|------------------|------------|--|------------------------------------|------|------|------|------|---------------|--|------|------|------|------|------|---------------|
| OMSCHRIJVINGEN MATERIEEL | | | | MATERIELE KOSTEN | | | | | | MATERIEEL | | | | | | |
| Instelling | toewijzingsbrief | briefdatum | betreft | 1989 | 1990 | 1991 | 1992 | 1993 | totaal kosten | 1989 | 1990 | 1991 | 1992 | 1993 | 1994 | totaal kosten |
| Diversen | | | | | | | | | | | | | | | | |
| LUW | CDLO/90246 | 15-01-90 | Synthese enantiomeer zuivere geurstof. | | 62 | 62 | 62 | 62 | 248 | 248 | | | | | | 248 |
| RAHG | CDLO/90244 | 15-01-90 | Vegetatieve instandh. en vermeerdering | | 53 | 53 | 53 | 53 | 212 | | | 53 | 53 | 48 | 58 | 212 |
| | DLO/925813 | 03-07-92 | Salariskosten Folkers | | | | | | | | | | | -17 | -42 | -59 |
| RUG-GBC | CDLO/90239 | 15-01-90 | Toepasbaarheid karwijolie als grondstof | | 110 | | | | 110 | | | 91 | 19 | | | 110 |
| RUG-Micro | CDLO/90236 | 15-01-90 | Karwijolie: eigenschappen biol.membr. | | 110 | | | | 110 | 88 | | | | 22 | | 110 |
| CABO | DLO/931368 | 15-02-93 | SKE-opstelling extractie carvonvinympoelun | | | | | | | | | | | 8 | 5 | 13 |
| | | | Declaraties voorzitter karwijplatform | | | | | | | 4 | 3 | 9 | 6 | | | 22 |
| Landbouwkundig kader | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CABO | CDLO/90256 | 15-01-90 | Invloed omgevingsfactoren | 38 | 22 | 30 | 30 | | 120 | 38 | 22 | 30 | 30 | | | 120 |
| CPO | CDLO/90256 | 15-01-90 | Veredelingstechnisch onderzoek | 35 | 35 | 35 | 35 | | 140 | 35 | 35 | 35 | 35 | | | 140 |
| IPO | CDLO/90250 | 15-01-90 | Biol. en bestrijding karwijolie | 40 | 20 | 20 | | | 80 | 40 | 20 | 20 | | | | 80 |
| IPO | CDLO/90247 | 15-01-90 | Biol. bestrijding S. Sclerotiorum | 40 | 20 | 20 | | | 80 | 40 | 20 | 20 | | | | 80 |
| PAGV | DWT/90439 | 20-03-90 | Verbetering oogstzekerheid | | 20 | 20 | 20 | 20 | 80 | | | | | | | 0 |
| Agrotechnologisch kader | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ATO | CDLO/90248 | 15-01-90 | Ontsluiting van carvon | | 140 | 30 | 30 | 30 | 230 | 140 | 30 | 30 | 30 | | | 230 |
| TOTAAL MATERIELE KOSTEN (excl. PAGV) | | | | 153 | 572 | 250 | 210 | 145 | 1330 | 541 | 219 | 282 | 176 | 67 | 21 | 1308 |
| | | | | BEGROTING | | | | | | REALISATIE | | | | | | |
| OMSCHRIJVINGEN PERSONEEL | | | | PERSONELE KOSTEN (k/f 80 per (pl)) | | | | | | PERSONEEL OP BASIS AANSTELLINGEN EN k/f 80 PER FORMATEPLAATS | | | | | | |
| Instelling | toewijzingsbrief | briefdatum | betreft | 1989 | 1990 | 1991 | 1992 | 1993 | totaal kosten | 1989 | 1990 | 1991 | 1992 | 1993 | 1994 | totaal kosten |
| Diversen | | | | | | | | | | | | | | | | |
| LUW | CDLO/90246 | 15-01-90 | Synthese enantiomeer zuivere geurstof. | | 120 | 120 | 120 | 120 | 480 | 360 | | | | | 120 | 480 |
| RAHG | CDLO/90244 | 15-01-90 | Vegetatieve instandh. en vermeerdering | zie materieel | | | | | 0 | zie materieel | | | | | | 0 |
| RUG-GBC | CDLO/90239 | 15-01-90 | Toepasbaarheid karwijolie als grondstof | zie materieel | | | | | 0 | zie materieel | | | | | | 0 |
| RUG-Micro | CDLO/90236 | 15-01-90 | Karwijolie: eigenschappen biol.membr. | zie materieel | | | | | 0 | zie materieel | | | | | | 0 |
| Landbouwkundig kader | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CABO | CDLO/90256 | 15-01-90 | Invloed omgevingsfactoren | 60 | 60 | 60 | 60 | | 240 | 5 | 60 | 60 | 60 | 45 | 10 | 240 |
| CPO | CDLO/90256 | 15-01-90 | Veredelingstechnisch onderzoek | 108 | 108 | 108 | 108 | | 432 | 37 | 110 | 110 | 110 | 110 | 74 | 441 |
| | DLO/925813 | 03-07-92 | Folkers | | | | | | | 20 | 48 | | | | | 68 |
| IPO | CDLO/90250 | 15-01-90 | Biol. en bestrijding karwijolie | 48 | 48 | 48 | 48 | | 192 | 30 | 50 | 50 | 51 | 21 | | 202 |
| IPO | CDLO/90247 | 15-01-91 | Biol. bestrijding S. Sclerotiorum | 48 | 48 | 48 | 48 | | 192 | 32 | 50 | 50 | 51 | 17 | | 200 |
| PAGV | DWT/90439 | 20-03-90 | Verbetering oogstzekerheid | 48 | 48 | 48 | 48 | | 192 | | | | | | | 0 |
| Agrotechnologisch kader | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ATO | CDLO/90248 | 15-01-90 | Ontsluiting van carvon | 60 | 60 | 60 | 60 | | 240 | 10 | 60 | 60 | 60 | 60 | | 250 |
| TOTAAL PERSONELE KOSTEN (excl. PAGV) | | | | 0 | 444 | 444 | 444 | 444 | 1776 | 375 | 219 | 330 | 350 | 365 | 242 | 1881 |
| TOTAAL UITPUTTING (excl. PAGV) | | | | 153 | 1018 | 894 | 664 | 590 | 3108 | 916 | 438 | 612 | 526 | 432 | 263 | 3187 |
| ADDITIONELE GELODEN (CDLO/902413) IN MINDERING PAGV (PERB. + MAT) | | | | | | | | | | 1400 | 800 | 700 | 500 | | | 3400 |
| | | | | | | | | | | 88 | 88 | 88 | 88 | | | 272 |
| GEKORRIGEERDE ADDITIONELE FINANCIERING | | | | | | | | | | 1332 | 732 | 632 | 432 | | | 3128 |
| SALDO REALISATIE / ADDITIONELE FINANCIERING | | | | | | | | | | 418 | 284 | 20 | -44 | -432 | -282 | -58 |

N.B.

* In de totaaltellingen worden de toekeringen aan PAGV buiten beschouwing gelaten. Het PAGV ontvangt deze via de directe AT

7. Samenstelling Karwijplatform, College van Deskundigen en Projectenlijst

Karwijplatform

K.C. Hamster, voorzitter
Akkerbouwer

Ir. W.J.M. Meijer, secretaris
DLO-Instituut voor Agrobiologisch en Bodemvruchtbaarheidsonderzoek (AB-DLO)

Ir. P.J. Bouwmeister
Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij, Directie Industrie en Handel

Ing. W. Brandsma
Provincie Groningen, Afd. Sociaal-Economische Zaken

Dr. H. Breteler
Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO), Afd. Onderzoekstrategie

Ir. J.W. Dieleman
Ministerie van Economische Zaken, DG-IR Eenheid Regionaal Stimuleringsbeleid

Ir. D.A. Donner
Nederlands Graan Centrum

H.A. Hamster
Vereniging KARVO

Dr. N.C.M. Laane
Quest International

D.K. Mensinga
Vereniging KARVO

Ir. J.J.G.W. Ottenheim
Landbouwschap

Dr.ir. J.M.P. Papenhuyzen
Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij, Directie Wetenschap en Kennisoverdracht

Ir. A.W. Vermazeren
Nefyto

Ir. C.M.M. van Winden
Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij, Directie Akker-en Tuinbouw

College van Deskundigen

Dr.ir. C. Mastenbroek
NVZP

Drs. K.G. de Noord
voorheen Avebe

Prof. dr. J.C. Zadoks
Landbouw Universiteit Wageningen, Vakgroep Fytopathologie

Programmacoördinator en secretaris van het Karwijplatform

Ir. W.J.M. Meijer
DLO-Instituut voor Agrobiologisch en Bodemvruchtbaarheidsonderzoek (AB-DLO)

Projecten in het Karwijprogramma

Dr.ir. H.J. Bouwmeester, ir. W.J.M. Meijer, H. Smid, J.A.R. Davies, ir. I.F. Kappers,
J. van Strien
DLO-Instituut voor Agrobiologisch en Bodemvruchtbaarheidsonderzoek (AB-DLO)
De invloed van gewasopbouw en omgevingsfactoren op de produktie en kwaliteit van
karwijzaad.

Drs. J. Oosterhaven, dr. H.J. Huizing, drs. K.J. Hartmans, T.C. de Rijk
DLO- Instituut voor Agrotechnologisch Onderzoek (ATO-DLO)
Karwij en verwerkingstechnologie: een onderzoek naar de ontsluiting van carvon uit
karwijzaad en de kiemremmende werking ervan bij de bewaring van aardappelen.

Ir. H. Toxopeus, J.H. Lubberts
DLO-Centrum voor Plantenveredelings- en Reproductieonderzoek (CPRO-DLO)
Veredelingsonderzoek naar opbrengst, oogstzekerheid en kwaliteit van karwij
(*Carum carvi* L.)

Dr.ir. M. Gerlagh, ing. B. Verdam, H.M. van de Geijn
DLO- Instituut voor Planteziektenkundig Onderzoek (IPO-DLO)
Ecologie en biologische bestrijding van *Sclerotinia sclerotiorum* in karwij.

J.D. Prinsen, M.N.C.P. Buijsman

DLO-Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek (IPO-DLO)

Biologie en de bestrijding van de wollige karwijluis.

Ir. A.A. Verstegen-Haaksma, prof.dr. Ae. de Groot, drs. B.J.M. Jansen, ing. H.J. Swarts

Landbouw Universiteit Wageningen, Laboratorium voor Organische Chemie

Onderzoek naar de toepassingsmogelijkheden van carvon als chirale uitgangsstof in de synthese van enantiomeer zuivere geurstoffen, gewasbeschermingsmiddelen en tussenprodukten van de organische synthese.

Ir. A. Evenhuis, ing. B. Verdam, ing. J.W.N. Wander, ing. H.W.G Floot

Proefstation voor de Akkerbouw en Groenteteelt in de Vollegrond.

Onderzoek naar de beperking van het optreden van en de schade door verbruiningsziekte in karwij.

Dr.ir. W. Bakker, ir. W.J. Neervoort, ing. G.Huisjes, W. Folkers

Prof. H.C. van Hall Instituut

Vegetatieve instandhouding en vermeerdering van karwij.

Dr.ir. W. Bakker, ir.M. de Jonge, W. Folkers, ing. D. Kuiper

Prof. H.C. van Hall Instituut

De biologische activiteit van carvon.

Dr. B. Poolman, prof.dr. W.N. Konings, B. Nieuwenhuis

Rijksuniversiteit Groningen, Laboratorium voor Microbiologie

Invloed van karwijolie en haar componenten op functionele en structurele eigenschappen van biologische membranen.

Drs. J.N. Bottema-Mac Gillavry, prof. dr. B. Witholt

Rijksuniversiteit Groningen, Groningen Biotechnology Centre

Onderzoek naar de toepasbaarheid van karwij-olie als grondstof voor bioconversies en de biosynthese van farmaca, gewasbeschermingsmiddelen en fijnchemicaliën.