

Karwij, carvon en biologische kiemremming van aardappelen

Resultaten en conclusies van 4 jaar
agrificatieonderzoek

Karwijonderzoekprogramma

Toepassingsonderzoek carvon 1990-1994

dlo



Karwij, carvon en biologische kiemremming van aardappelen

Resultaten en conclusies van 4 jaar
agrificatieonderzoek

Karwijonderzoekprogramma

Toepassingsonderzoek carvon 1990-1994

Dit rapport is uitgebracht onder verantwoordelijkheid van het Karwijplatform. In het platform zijn vertegenwoordigd: de fytopharmaceutische en geur- en smaakstoffenindustrie, het georganiseerde landbouwbedrijfsleven, de Karwijstudieclub, de Ministeries van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij en van Economische Zaken en de Provincie Groningen. Haar taak is het Ministerie van LNV te adviseren inzake de onderzoekrichting en de financiering van de jaarwerkplannen in het vierjarig Karwijonderzoekprogramma 1990-1994.

Karwijplatform - mei 1994

AB-DLO
W.J.M. Meijer, secretaris
Postbus 14
6700 AA Wageningen
Tel. 08370-75860
Fax. 08370-23110

Redactie : W.J.M. Meijer, AB-DLO
J. Oosterhaven, ATO-DLO
Uitgave : Dienst Landbouwkundig Onderzoek
Vormgeving: Ernst van Cleef
Druk : Grafisch Service Centrum Van Gils B.V., Wageningen

3700

Voorwoord

Vanaf het begin van de tachtiger jaren is door Groninger karwijtelers aandacht gevraagd voor publikaties over de biologische activiteiten van de etherische olie van karwijzaad. Die onderzoekresultaten waren ook opgemerkt door aardappel-onderzoekers van het voormalige IBVL, nu ATO-DLO, in verband met wensen in de maatschappij om de toepassing van chemische gewasbeschermingsmiddelen te beperken. Toen aan het einde van de tachtiger jaren, door middel van beleidsmaatregelen, capaciteit voor agrificatie-onderzoek werd vrijgemaakt, is in nauw overleg tussen de Groninger initiatiefnemers en DLO een onderzoekprogramma uitgewerkt, op basis van voorstudies van het Transferpunt van de Rijks Universiteit Groningen en van Drs. Nicolien Bottema-MacGillavry. Gelijktijdig is door een fytofarmaceutisch bedrijf samen met ATO-DLO een onderzoekprogramma opgezet om de toepassing van carvon als kiemremmingsmiddel voor aardappelen te ontwikkelen. In die beginfase is veel overtuigingskracht nodig geweest om de perspectieven duidelijk te maken en een plaats te verwerven binnen het geheel van het agrificatieonderzoek. Nu, ongeveer vijf jaar later staat deze optie aan het begin van commercialisatie. Dat illustreert eens te meer hoe moeilijk het is de kansen van innovatief onderzoek in een vroeg stadium in te schatten. Het pleit er tevens voor om de kansen van velerlei initiatieven op haalbaarheid te toetsen.

Door de brede opzet van de projecten zijn de onderzoekers geconfronteerd met het grootste deel van de karwijproduktiekolom en is er een unieke samenwerking ontstaan. De grote inzet en teamgeest van de betrokken onderzoekers en de programmacoördinator, maar ook de goede samenwerking in het Platform en het College van Deskundigen, kunnen als voorbeeld dienen bij de opzet van de toekomstige karwijketen. Naast dit samenvattende rapport is een uitgebreid eindverslag uitgebracht. De resultaten zijn of worden gepubliceerd in enkele tientallen wetenschappelijke publikaties en drie proefschriften.

Er is in 4 jaar veel bereikt, maar er moet ook nog veel gebeuren om de positieve resultaten van het onderzoek ten goede te laten komen aan alle partijen in de kolom. Met het Nationaal Karwijonderzoekprogramma is het onderzoek nog niet ten einde, maar er is een succesvol agrificatieproject binnen handbereik. Het uitzonderlijke karakter van karwij als agrificatiegewas moet ten volle benut worden. Door de verbouw van karwijzaad en door de inzet van carvon als kiemremmingsmiddel op aardappelen, kunnen de akkerbouwers in de toekomst op twee manieren profiteren van de nu behaalde resultaten.

K.C. Hamster
voorzitter Karwijplatform

Inhoudsopgave

Voorwoord	3	5.6	Vegetatieve instandhouding en vermeerdering van karwij (<i>Carum carvi</i> L.) W.J. Neervoort, W. Folkers en G. Huisjes (Prof. H.C. van Hall Instituut)	31	
1.	Karwij en carvon, traditionele toepassingen en nieuwe perspectieven	7			
2.	Doel en structuur van het onderzoek	10	5.7	Onderzoek naar de beperking van het optreden van en de schade door verbruiningsziekte in karwij A. Evenhuis (PAGV) en B. Verdam (IPO-DLO)	33
3.	Overzicht van de wetenschappelijke en toepasbare resultaten	13	5.8	Ecologie en biologische bestrijding van <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> in karwij B. Verdam, M. Gerlagh en H.M. van de Geijn (IPO-DLO)	35
4.	Conclusies en aanbevelingen	17	5.9	Biologie en bestrijding van de wollige karwijluis J.D. Prinsen en M.N.C.P. Buijsman (IPO-DLO)	38
5.	Onderzoekresultaten	19	5.10	Omzetting van carvon door micro-organismen J.N. Bottema-Mac Gillavry (Groningen Biotechnology Centre)	39
5.1	Talent, een natuurlijke kiemremmer voor aardappelen op basis van carvon P. Diepenhorst (B.V. LUXAN, Elst) en K.J. Hartmans (ATO-DLO)	19	5.11	Toepassingsmogelijkheden van S-(+)-carvon als chirale uitgangsstof in de synthese van enantiomeer zuivere geurstoffen, gewas-beschermingsmiddelen en tussenprodukten van de organische synthese A.A. Verstegen-Haaksma, H.J. Swarts, B.J.M. Jansen en A. de Groot (Vakgroep Organische Chemie, LUW)	41
5.2	Invloed van carvon op de spruitgroei van aardappelen en op de functionele en structurele eigenschappen van biologische membranen J. Oosterhaven (ATO-DLO) en B. Poolman (Vakgroep Microbiologie, RUG)	21	6.	Samenstelling Karwijplatform, College van Deskundigen en Projectenlijst	43
5.3	Toepassingen van carvon in de gewas- en voorraadbescherming W. Bakker, M. de Jonge, W. Folkers en D.G. Kuiper (Prof. H.C. van Hall Instituut)	23			
5.4	De invloed van gewasopbouw en omgevingsfactoren op de produktie en kwaliteit van karwijzaad H.J. Bouwmeester en W.J.M. Meijer (AB-DLO)	25			
5.5	Veredelingsonderzoek naar opbrengst, oogstzekerheid en kwaliteit van karwij (<i>Carum carvi</i> L.) H. Toxopeus en J.H. Lubberts (CPRO-DLO)	28			

1. Karwij en carvon, traditionele toepassingen en nieuwe perspectieven

Plant en gewas

Karwij behoort tot de familie van de schermbloemigen (*Umbelliferae*). De leden van die familie hebben gemeen dat de stengels, bladeren en meestal ook het zaad, aromatische stoffen of etherische olie bevatten. Daarom zijn soorten als dille, kervel, anijs, komijn, peen, peterselie, venkel en pastinaak al heel lang in cultuur gebracht. Tot deze familie behoren ook wilde planten als fluitekruid,

bereklaauw en engelwortel. Karwij was als specerij al van voor het begin van onze jaartelling bekend en is onder andere in Egyptische graftombes gevonden. In Noord-West Europa en ook in Nederland wordt karwij al meerdere eeuwen als gewas geteeld. De uit deze gebieden afkomstige karwij is tweejarig. De planten vormen in het eerste jaar een bladrozet en een penwortel. Wanneer de planten voldoende groeien en de doorsnede van de penwortel

1.
Anatomie van karwij.
A: blad; B: bloeischerm;
1 en 2: knop; 3: bloempje;
4: kroonblad; 5: stamper;
6: stuifmeelkorrels; 7:
stempel; 8: dwarsdoorsnede
stempel; 9: dwarsdoorsnede
vruchtbeginsel; 10: deel-
schermpje; 11: vrucht;
12: enkel 'zaad'; 13: dwars-
doorsnede 'zaad' (Uit:
Rosengarten, F., 1969. The
book of spices. Wynnewood:
Livingston, 489 pp).



minstens 6 mm is, zijn ze gevoelig voor inductie tot bloei door lage temperaturen gedurende herfst en winter, en vormen ze in het tweede jaar een stengel, bloeischermen en zaad (Fig. 1).

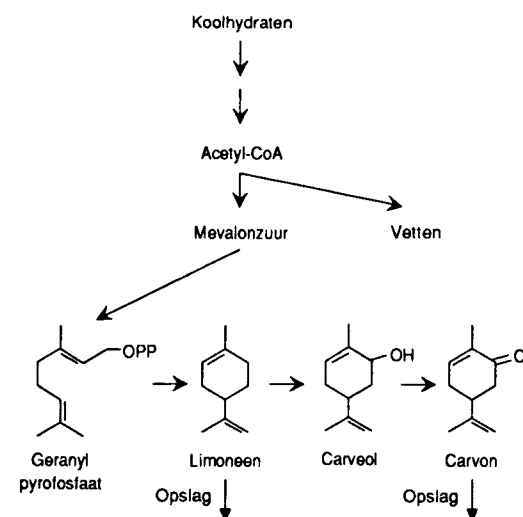
Om geen oogstjaar te missen wordt deze tweejarige karwij in Nederland onder een dekvrucht ingezaaid. Onder de dekvrucht, bijvoorbeeld een graan-gewas, erwten, bonen of blauwmaanzaad, kan de karwij kiemen maar niet veel groeien. De tijd en de omstandigheden na de oogst van de dekvrucht bepalen of de induceerbare plantgrootte wordt bereikt. In de Mediterrane gebieden komen éénjarige karwijtypen voor, genotypen die geen jeugdfase kennen en die geen, of slechts een geringe koudebehoefte hebben om te gaan bloeien. Eénjarige rassen worden nu ook in Nederland geïntroduceerd en een Nederlands ras is in ontwikkeling. Karwij is tot nu toe een typisch handels-gewas. De laatste decennia varieert het areaal, afhankelijk van de prijs, tussen enkele honderden en enkele duizenden ha. Ongeveer twee-derde daarvan ligt in Groningen en één-derde in Zuid-West Nederland.

De bloeistengels van karwij zijn vertakt in tweede-orde zijstengels, die afhankelijk van de plantdichtheid, weer vertakken in derde- en vierde-orde stengels. Het scherm van de bloeiwijze is opgebouwd uit circa 10 deelschermpjes die elk weer uit ongeveer 10 bloemen bestaan. Het scherm en de deelschermen bloeien van buiten naar binnen en de bestuiving kan zowel door insecten als door de wind gebeuren. Niet alle bloempjes kunnen een zaad vormen, want de binnenste deelschermpjes en de schermen van de laatste zijstengels bestaan vooral uit mannelijke bloempjes. Bevruchte bloempjes vormen een dubbele vrucht die bij de rijping uiteenvalt in twee deelvruchtjes. De etherische olie bevindt zich in de oliestriemen, kanaaltjes in de wand van de vruchtjes. De etherische olie wordt waarschijnlijk gesynthetiseerd in de cellen rondom de oliestriemen en daarin opgeslagen. De hoofdcomponenten zijn de monoterpenen carvon en limoneen (samen circa 97%). In jonge vruchtjes overheerst de limoneensynthese maar tijdens de zaadvorming neemt de carvonsynthese toe, zodat in rijpe

vruchtjes, gebruikelijk zaden genoemd, het carvonaandeel vaak iets hoger is.

Biosynthese van etherische olie

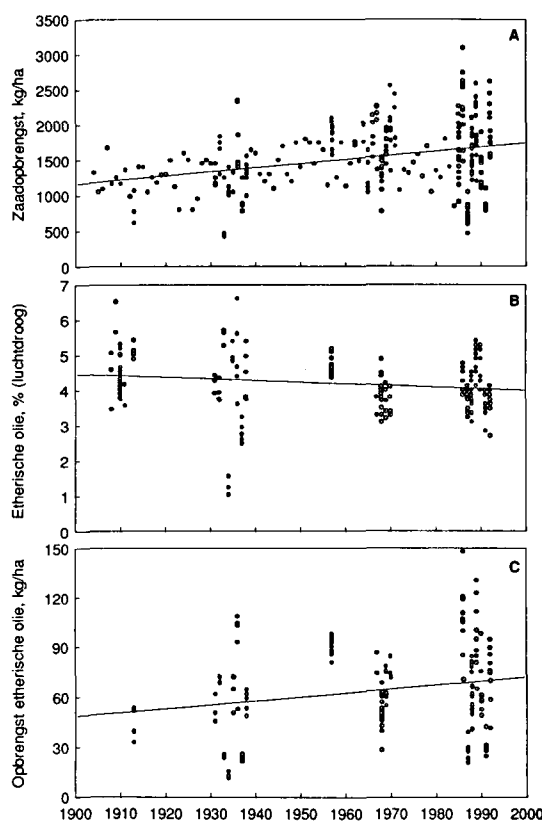
De synthese-route van de terpenen is in grote lijnen bekend. Startpunt van de biosynthese van carvon en limoneen is mevalonzuur (Fig. 2). De vorming van



2.

De synthaseroute van carvon en limoneen in karwij (hypothese H.J. Bouwmeester).

mevalonzuur uit koolhydraten volgt gedeeltelijk de synthaseroute voor, onder andere, de vette olie en dat suggereert concurrentie om substraat tussen de syntheses van beide olietypen. Het gehalte vette olie in karwijzaad ligt meestal rond 18 %. Het zaad bevat ongeveer 4 % etherische olie maar dat gehalte varieert aanzienlijk (Fig. 3). Carvon en limoneen behoren tot de zogenaamde secundaire plantestoffen. Dat is een zeer uiteenlopende reeks verbindingen zoals fenolen, alkaloiden, glycosiden en steroïden die gemeen hebben dat ze voor zover bekend, geen rol spelen in de groei- en ontwikkelingsprocessen van de planten. De synthese van die stoffen is energetisch kostbaar: de synthese van carvon en limoneen kost ongeveer evenveel primaire assimilaten als de synthese van vette olie. Omdat planten over het algemeen efficiënt zijn, wordt verondersteld dat deze secundaire plantestoffen geen restprodukten van het metabolisme zijn, maar een nuttige functie hebben. Dit temeer omdat voor de etherische oliën speciale opslagorganen worden aangelegd. Onder laboratorium-condities



3. Het verloop van de zaadopbrengst (A), het gehalte etherische olie (B) en etherische olie opbrengst (C) van karwijgewassen in Nederland in deze eeuw.

zijn een groot aantal biologische effecten gevonden zoals afwerende of aantrekkende activiteit voor insecten, remming van de groei van micro-organismen en kiemremming van zaden. Maar vanuit die kennis is nog niet duidelijk geworden wat de functie van de etherische olie in het zaad van karwij is, of geweest is, in het natuurlijke ecosysteem.

Toepassingen

De etherische olie geeft karwijzaad de kruidige geur en smaak, reden waarom het traditioneel gebruikt wordt als specerij. Het zaad wordt vooral in Midden en Oost Europa en in de Verenigde Staten toegepast, bijvoorbeeld in of op brood, in conserven en vleeswaren. Op kleine schaal wordt de olie via stoomdestillatie gewonnen en toegepast in drankjes en als geur- en smaakstof. Nieuwe perspectieven voor toepassingen zijn gebaseerd op de biologische effecten van de etherische olie en specifiek van carvon. Parallel aan de toegenomen vraag naar gewas- en produktbeschermingsmiddelen op basis van natuurstoffen, is tussen

1980 en 1990 het onderzoek naar de effecten van onder andere carvon en limoneen op planten en micro-organismen uitgebreid. De kiemremmende werking, specifiek bij aardappelen, kreeg bijzondere aandacht in Nederland omdat getwijfeld werd aan de toekomstige beschikbaarheid van de toegelaten chemische middelen voor dat doel. Voor een toenemend aantal landen bleek toepassing van die middelen ook niet meer mogelijk door de lage residu-tolerantie. Een natuurlijke kiemremmingsmiddel paste tevens in het streven van aardappelbedrijfsleven en overheid om de chemische middelen in de produktieketen te reduceren. Een laatste grond voor de belangstelling was de kleine, maar gestaag groeiende markt voor 'groene' aardappelen.

Naast kiemremming werden eind jaren tachtig, uit de veelzijdige effecten van de etherische karwijolie, ook de fungicide werking geselecteerd als optie met goede toepassingskansen. Opgemerkt is ook de beschermende werking tegen bacteriofaagbesmetting van bacteriecultures bij de zuivelbereiding. Tenslotte werden nieuwe toepassingskansen gezien in de geur-, smaakstoffen- en farmaceutische industrie op grond van de structuur van het carvon-molecuul. De etherische karwijolie bevat S-carvon, één van de twee stereo-isomeren van carvon. Bij de synthese van hoogwaardige chemische verbindingen is het zeer gewenst dat enantiomeer zuivere produkten verkregen worden, slechts het (meest) werkzame isomeer bevattend. Door uit te gaan van chirale grondstoffen kunnen dat soort hoogwaardige produkten gesynthetiseerd worden. Carvon uit karwij is zo'n chirale verbinding en is daarom een interessante grondstof voor verdere syntheses.

2. 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 carvonproductie 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 toepassings-technieken te ontwikkelen, de effecten op de produktkwaliteit 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 6 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 6 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 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 zaadopbrengsten gedurende deze eeuw en een gelijk-

gebleven 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 achterstand 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 produktie allereerst gericht op twee doelen:

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.



4.
Een karwijgewas in bloei.

- de stabiliteit van de zaad- en carvon- produktie 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

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 teeltermijning 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 schimmelziekte, 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.

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

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 uitgangsstof 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

3. Overzicht van de wetenschappelijke en toepasbare resultaten

Het geheel van onderzoekactiviteiten rond karwij en carvon in de afgelopen vier jaar omvatte een groot aantal disciplines, bestudeerde vragen op subcellulair tot gewasniveau 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 van het toepassingsonderzoek in het Luxan-ATO-DLO-programma zijn uiteraard cruciaal voor de realisatie van de nieuwe mogelijkheden. Het is daarom zeer waardevol dat dit overzicht kan beginnen met de bevindingen in dat programma. De resultaten in de projecten van het Karwijprogramma worden in dezelfde drie clusters samengevat die in de vorige paragraaf zijn gehanteerd.



5.

Kiemremming van aardappelen middels carvon op laboratoriumschaal (A) en op praktijkschaal (B).

Het toepassingsonderzoek

In proeven met aardappelbewaring op praktijkschaal is vastgesteld dat bij een juiste toepassing van carvon het effect op de kieming van aardappelen gelijk of beter is in vergelijking met de toegelaten chemische middelen (Fig. 5). Het onderzoek heeft geen negatieve nevenwerkingen gevonden: de geur en smaak bleken in sensorisch onderzoek niet verschillend van de gebruikelijke behandelingen en ook voor de aardappelverwerkende industrie belangrijke kwaliteitscriteria bleken niet beïnvloed te worden door de carvonbehandeling. Er is wel een positief neveneffect vastgesteld. De toepassing van carvon gaf een duidelijke remming van de ontwikkeling van enkele bewaarschimmels, onder andere van zilverscurft. Voor de toepassing bij pootaardappelen is zeer interessant dat de kiemremming door carvon reversibel is en dat het aantal ogen per knol dat kiemt, gestuurd kan worden. De toepassingstechniek bleek in praktijksituaties geen grote knelpunten op te leveren. De toelating van de eerste formulering onder de merknaam Talent wordt medio 1994 verwacht en in diverse landen bestaat grote belangstelling voor deze natuurlijke kiemremmer.

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 groeiemming 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 praktijk-situatie 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 'lekkende' membraan wordt de energiehuishouding van de micro-organismen ontregeld.

Het plantaardige productieproces

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 massa-selectie zijn uit een traditioneel, tweejarig karwijras populaties verkregen met een ongeveer 15 % hoger carvon-gehalte. 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 plant-regeneratie. 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, sclerotienrot 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.

Andere opties voor carvon

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 Ambrox^R. Ook zijn chirale tussenprodukten gesynthetiseerd die bruikbaar zijn in organische syntheses. Via publikatie van de resultaten worden de mogelijkheden van carvon in brede kring bekend.

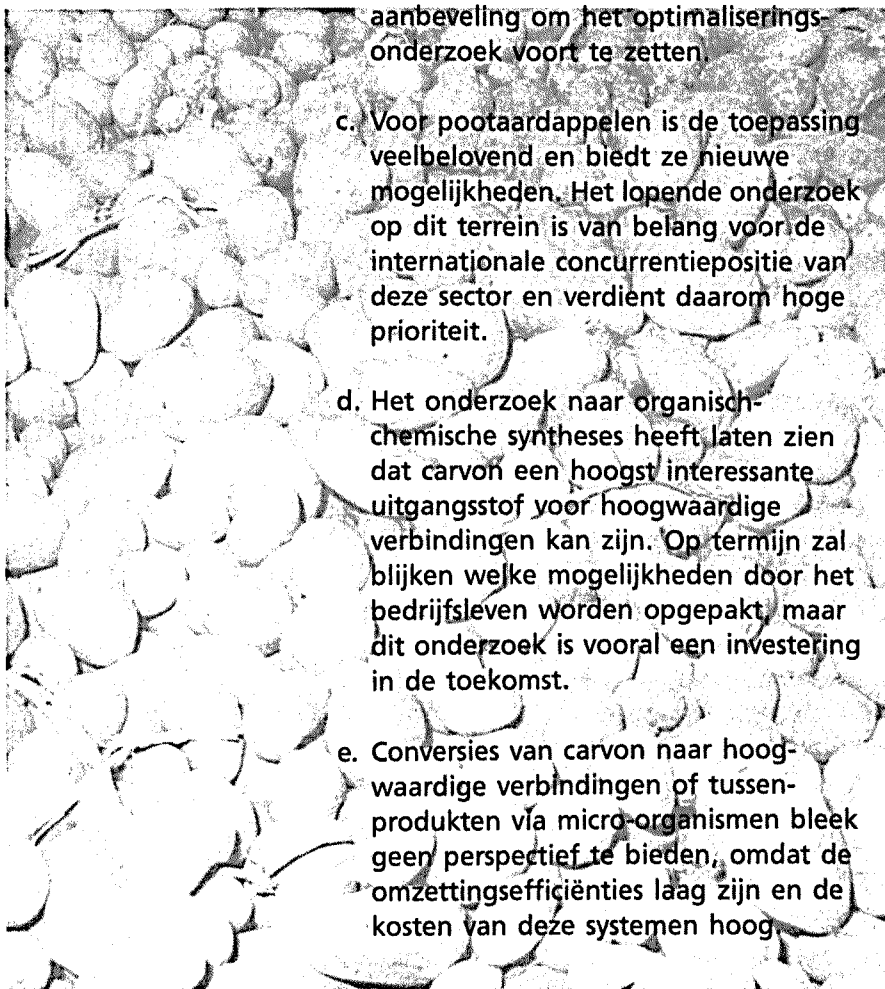
In een studie naar de haalbaarheid van bio-conversies van carvon naar hoogwaardige verbindingen zijn de activiteiten getoetst van een vijftal bacteriën en een schimmelsoort.

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 fytoxische effecten geconstateerd.

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 groei remmend 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 produkten 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 tussenprodukten 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 groei remming 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 produkten. De ontwikkeling van die toepassingen vergt gericht onderzoek.
- h. In het veredelingsonderzoek zijn de eerste stappen gezet naar een hoger carvongehalte. De ontwikkeling van vegetatieve vermeerderingstechnieken zal deze ontwikkeling aanmerkelijk versnellen. Een carvongehalte 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 karwij-carvonketen in Nederland.
- i. Het inzicht in de processen van zaadvorming en etherische oliesynthese 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 zaadproduktie in Oost-Europa en/of ruiltransacties met karwij waarbij de prijs niet doorslaggevend is. Dat betekent dat de sterke kanten van de Nederlandse grondstoffenproduktie 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-carvonproduktie.

De komende jaren moet gewerkt worden aan de ontwikkeling van die nieuwe keten. In de primaire sector moet de teelt toegespitst worden op carvonproduktie 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 produkten, 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. Onderzoeksresultaten

5.1 TALENT, een natuurlijke kiemremmer voor aardappelen op basis van carvon

P. Diepenhorst (B.V. LUXAN) en K.J. Hartmans (ATO-DLO)

Doel

In Nederland worden per jaar ca. 2 miljoen ton aardappelen bewaard, waarvan ca. 80% langdurig (> 6 maanden). Voor het behoud van de kwaliteit is kiemvrij bewaren essentieel, zowel voor tafel-aardappelen, als voor aardappelen die tot aardappelprodukten worden verwerkt. In West-Europa worden daartoe al vele jaren kiemremmers gebruikt, meestal op basis van CIPC en IPC.

Door de invoering van milieubewuste teelt is er bij aardappelen een duidelijke behoefte aan de vervanging van de synthetische chemische kiemremmers door niet-chemische alternatieven. Ook de dalende trend in residutoleranties voor de huidige kiemremmers, waardoor export van met (C)IPC behandelde aardappelen of -produkten wordt bemoeilijkt, doet de behoefte toenemen.

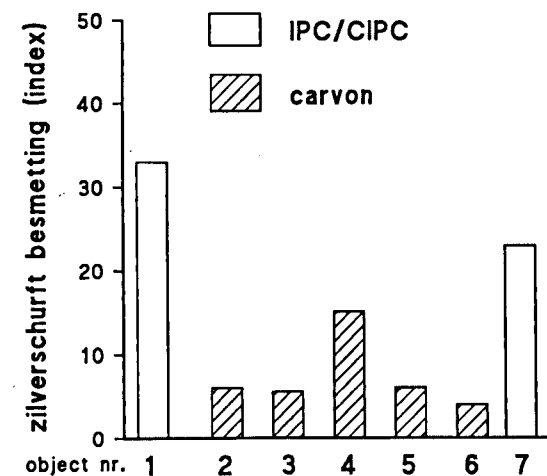
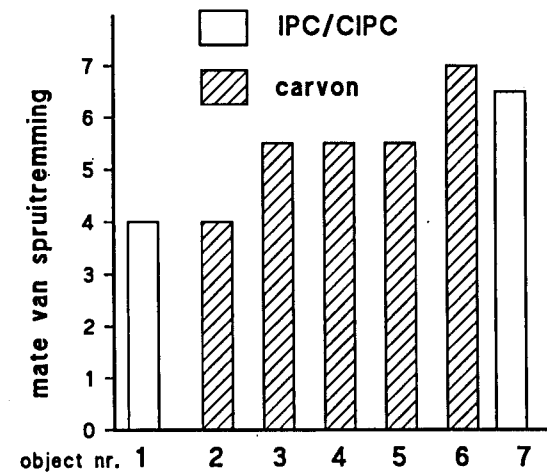
Door LUXAN wordt, in samenwerking met ATO-DLO, de toepassing ontwikkeld van natuurlijke kiemremmers op basis van carvon. Carvon is een bekende, en al generaties lang gebruikte smaakstof voor voedingsmiddelen en dranken, en kan o.a. worden verkregen uit de etherische olie van karwijzaad.

Resultaten

Samenvatting van 4 jaar praktijkonderzoek. Praktijkttoetsen van de afgelopen jaren bestonden uit de toepassing van carvon in bewaarplaatsen waarin tussen de 15 en 250 ton aardappelen werden bewaard. Hierbij is gebleken dat carvon kan worden toegediend met behulp van de bestaande doseringstechnieken. Het resultaat van een langdurige bewaring van aardappelen met carvon, is een effectieve kiemremming, die gelijkwaardig of beter is in vergelijking met de huidige kiemremmers (Fig. 6A).

Alle, voor aardappelen en hun verwerking belangrijke, kwaliteitseisen worden niet beïnvloed door carvon. De vorming van reducerende suikers in de loop van de bewaring wijkt niet af van de met (C)IPC behandelde partijen en derhalve zijn er geen negatieve effecten van een

carvon-bewaring op de bakkleurindex (Fig. 7). Ook het residuniveau van carvon op de aardappelen is laag (Fig 8). Het feit dat er enig residu op de knol aanwezig is en dat carvon een geur- en

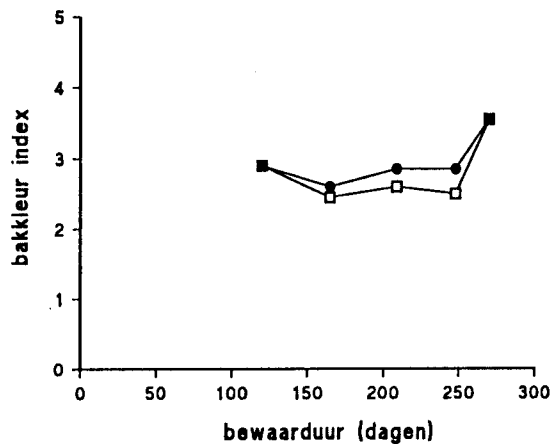


6.

Invloed van verschillende carvondoseringen (2 t/m 6) op het bewaarresultaat van aardappelen (A; 7 = uitstekende kiemremming, 0 = uiterst slechte kiemremming) en op de ontwikkeling van zilver schurft (B) in vergelijking met (C)IPC behandelde partijen (1 en 7).

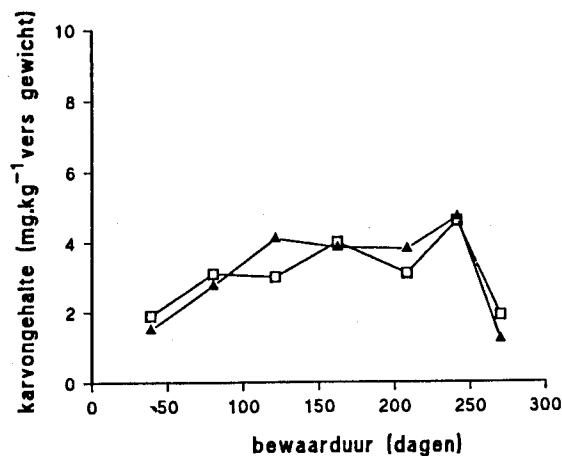
smaakstof is, zou aanleiding kunnen geven tot een negatieve smaakbeleving van de carvon-behandelde aardappelen. Uit sensorische analyses is gebleken dat er geen significante smaakverschillen te vinden zijn tussen aardappelen die behandeld zijn met carvon of met de huidige kiemremmers.

Behalve een effectieve kiemremming, heeft carvon een interessant neveneffect. Reeds aanwezige kiemen kunnen namelijk, bij voldoende hoge dosering, worden gedood (afgebrand). Anderzijds kan, bij lage dosering, de kieming van pootgoed



7.

Verloop van de bakkleur gedurende het bewaar-seizoen (● = (C)IPC, ■ = carvon)



8.

Residuniveau van carvon gedurende het bewaar-seizoen voor Bintje (□) en Agria (▲).

tijdelijk worden geremd, en dat is hoogst interessant voor de pootgoedbewaring.

Schimmelgroei. Een andere gunstige nevenwerking van carvon, is het onderdrukken van een aantal belangrijke bewaarziekten. Naast een remmende werking van carvon op de ontwikkeling van Phoma en droogrot (*Fusarium* sp.), is met name de aantasting van aardappelen door zilverschurft (*Helminthosporium solani*) veel geringer ten opzichte van (C)IPC behandelde aardappelen (Fig. 6B). Medio 1994 wordt de toelating verwacht voor de eerste formulering, ontwikkeld voor de 'fog'-toepassing onder de merknaam TALENT. Andere formuleringen zullen later volgen. Inmiddels is de ontwikkeling van carvon als kiemremmer ook in andere West-Europese landen

gestart. Er is internationaal octrooi aangevraagd op de toepassing van carvon.

Conclusie

Samenvattend kan worden gesteld dat op basis van het 4-jarige praktijkonderzoek is gebleken dat carvon als natuurlijke kiemremmer uitstekend toegepast kan worden voor het kiemvrij houden van aardappelen gedurende lange bewaarperioden waarbij het gebruik geen negatieve effecten op de kwaliteitseisen heeft. Daarnaast zijn de mogelijke toepassing van carvon als tijdelijke kiemremmer van pootgoed en de remmende effecten van carvon op de groei en ontwikkeling van enkele belangrijke bewaarpathogenen, belangrijke positieve uitkomsten van het onderzoek.

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

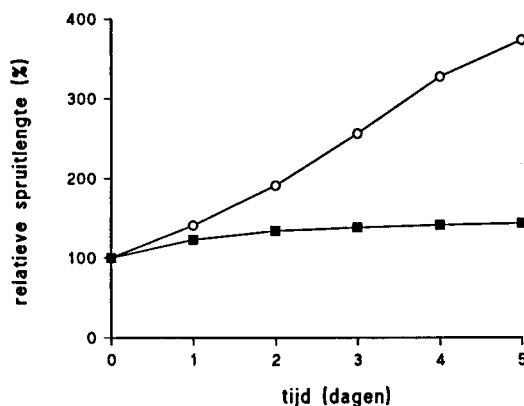
J. Oosterhaven (ATO-DLO) en B. Poolman (RUG)

Doel

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, -frequentie en -efficiëntie en over het mogelijke gebruik van S-carvon op andere produkten en organismen. In projecten bij ATO-DLO en RU Groningen zijn die vragen onderzocht.

Resultaten

Spruitgroei. Het effect van S-carvon op de spruiting van aardappelen is overtuigend: het kan de spruitvorming gedurende geruime tijd blokkeren (Fig. 5). In een (spruit)modelsysteem, waarbij een deel van de knol wordt geïsoleerd



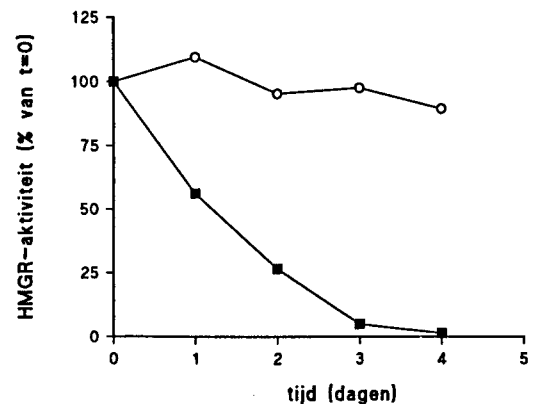
9.

Invloed van S-carvon op de lengtegroei van aardappelspruiten. O = controle, ■ = S-carvon behandeld.

waarop precies één spruit aanwezig is, is de invloed van S-carvon bestudeerd. Blootstelling van spruiten aan S-carvon geeft een spoedige remming van de lengtegroei, terwijl controle spruiten in dit systeem gedurende lange tijd doorgroeien (Fig. 9). S-carvon bevat een α -onverzadigde ketongroep en deze structuur blijkt een essentiële rol te spelen in het groeiremmingsproces. Ook de isopropenylgroep draagt bij aan het groeiremmingseffect. De spruitgroei-remming, veroorzaakt door S-carvon, is reversibel. Dit maakt het mogelijk S-carvon tevens te gebruiken als een tijdelijke

spruitgroeiremmer voor pootgoed.

De remming van de spruitlengtegroei is gecorreleerd met het activiteitsverlies 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 ademhalingsketen-componenten. In S-carvon behandelde spruiten is de HMGR-activiteit na drie dagen grotendeels en na vier dagen bijna geheel verdwenen (Fig. 10). Enzymen uit de citroenzuurcyclus, vertonen geen verschillen in activiteit in controle en in S-carvon behandelde spruiten. Gebruik van specifieke



10.

Invloed van S-carvon op de HMGR-activiteit in aardappelspruiten. O = controle, ■ = S-carvon behandeld.

antilichamen tegen het HMGR heeft aangetoond dat het activiteitsverlies 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.

Wondheling. 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

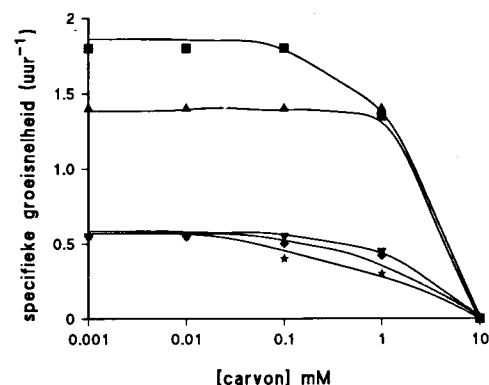
gewicht over de gehele periode aanwezig is, vindt er toch suberisatie plaats; m.a.w. het weefsel heeft zich aangepast aan de aanwezigheid van S-carvon. De uitgestelde suberisatie correleert met de activiteit van phenylalanine ammonia lyase (PAL), een enzym dat betrokken is bij de suberinevorming. Indien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

Detoxificatie. 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 stressomstandigheden. S-carvon wordt klaarblijkelijk door aardappelweefsel herkend als een xenobiotische, niet-planteigen, verbinding waaraan het weefsel zich weet aan te passen. S-carvon wordt omgezet door aardappelweefsel. Het voornaamste omzettingsproduct is neoisodihydrocarveol. Daarnaast komen nog andere, gereduceerde en geoxideerde verbindingen voor. Met ^{13}C -gelabeld S-carvon is aangetoond dat alle producten inderdaad omzettingsproducten van S-carvon zijn. Naast vrije carvon-afgeleide producten komen er ook wateroplosbare carvon-metabolieten voor. De identiteit van deze verbindingen is nog niet vastgesteld.

Antimicrobiële effecten. S-carvon heeft een antimicrobiële effect op o.a. melkzuurbacteriën in het concentratiegebied van 1 tot 10 mM (Fig. 11). 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.

Conclusie

De spruitremming wordt reversibel geremd door S-carvon, wat mogelijkheden biedt om carvon toe te passen als tijdelijk kiemremmingsmiddel voor pootgoed.



11.

Invloed van S-carvon op de groeisnelheid van *S. thermophilus* (■), *L. lactis* (▼) en *E. coli* (▲ = aerob-, ? = anaerob-, ★ = fermentatief-groeiend).

De groei van micro-organismen wordt geblokkeerd, bij relatief hoge concentraties, door interferentie van carvon met membraansystemen.

5.3 Toepassingen van carvon in de gewas- en voorraadbescherming

W. Bakker, M. de Jonge, W. Folkers en D.G. Kuiper (Prof. H.C. van Hall Instituut)

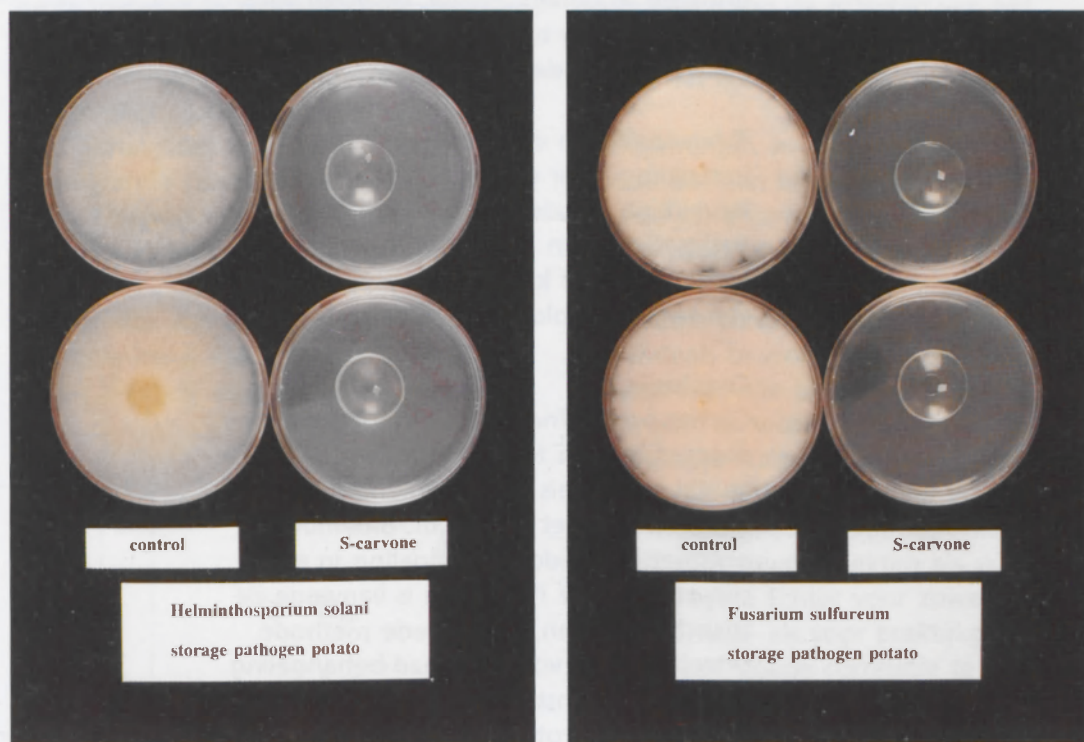
Doel

Van carvon is bekend dat het, afhankelijk van de gebruikte concentratie en toedieningsvorm, een groeiremmende, afwerende of dodende werking kan hebben op micro-organismen en schimmels. Doel van het onderzoek was mogelijke andere toepassingen van carvon t.b.v. gebruik in de gewas- en voorraadbescherming te toetsen. In het streven het gebruik van synthetische middelen te

het effect afhankelijk bleek van temperatuur en dosering.

Figuur 12 toont het schimmelgroei-remmend effect van S-carvon op *Helminthosporium solani* (zilverschorft) en op *Fusarium sulfureum* (droogrot) in *in vitro* experimenten.

Kiemplanten. Ook werd het effect van carvon op de kieming van zaden, kiemplanten en bloembollen bepaald. Zaden



12.

Invloed van S-carvon op de myceliumgroei van *Helminthosporium solani* (A) en *Fusarium sulfureum* (B).

beperken, lijkt carvon een goed middel, aangezien het een natuurlijk produkt is, dat gemakkelijk afgebroken wordt en voor zover bekend, geen schadelijke residuën geeft. Ook heeft het een zeer lage toxiciteit voor warmbloedigen.

Resultaten

Schimmelgroei. Het effect van carvon is getoetst op enkele pathogene bewaar-schimmels (o.a. *Fusarium culmorum*, *Pythium ultimum* en *Rhizoctonia solani*) met het oog op mogelijke toepassing van carvon bij de zaaizaad- en bloembolontsmetting. Carvon werd in een aantal formuleringen, waaronder slow-release formuleringen, getest. In alle gevallen remde carvon de myceliumgroei van de schimmels waarbij de mate van

van haver, mosterd en tuinkers, en de kiemplanten van deze soorten, zijn behandeld met verdunde carvon-oplossingen. Wanneer vervluchtiging voorkomen werd, werden enkele weken na behandeling toxische verschijnselen waargenomen.

Behandeling van leliebollen met carvon in de gasfase gedurende maximaal 7½ uur gaf nog geen toxische effecten. Bloembollen (tulp en lelie), voor het poten gedompeld in een carvonbad, toonden een slechte opkomst en groei-vertraging.

Gezien de toxische invloed van carvon is het niet mogelijk om carvon middels dompeling te gebruiken als ontsmetter van zaaizaad en bloembollen.

Insekten. Voor eventuele toepassing bij de voorraadbescherming werd onderzoek naar het effect van carvon op voorraad-insekten geïnitieerd. Deze insekten zijn wereldwijd een grote plaag waartegen vaak chemische middelen worden ingezet. In graanvoorraden bijvoorbeeld, is de graanklander een belangrijk probleem-insekt. De graanklander bleek slecht bestand te zijn tegen een carvon-behandeling. Graanklanders werden op tarwe geplaatst en blootgesteld aan verschillende carvonformuleringen. Een cyclodextrine slow-release formulering van carvon bleek binnen 10 dagen alle insekten te doden. Echter, de vorm van carvondosering bleek erg belangrijk voor het insekten dodende resultaat.

Tarweopslag. In een potproef is de bestrijding door carvon van tarweopslag in veldbeemd voor de zaadteelt onderzocht. Geen van de bespuitingen verhinderde de kieming en ontwikkeling van tarwe in voldoende mate.

Conclusies

Carvon heeft afhankelijk van de gebruikte concentratie en toedieningsvorm bij een aantal schimmels een remmend effect op de groei van het mycelium. Bloembol-ontsmetting middels dompeling in een carvonbad vòòr het poten is vanwege de toxische effecten geen goede methode. Ditzelfde geldt voor zaaizaad-behandeling met carvonoplossingen.

Vanwege de grote vluchtigheid en adsorptie aan organische stof heeft toepassing van carvon in de getoetste formuleringen geen zin bij behandelingen in het open veld.

Toepassing van carvon in de gasfase bij produkten in rust zal gezocht moeten worden in een langdurende behandeling bij lage concentratie, waarbij een goede verdeling van de carvondamp en het effect van carvon op de sporen van ziektekiemen van groot belang is.

Toepassing bij de voorraadbescherming biedt perspectief, temeer daar voor het gebruik van synthetische middelen op voedselprodukten in W. Europa een ontmoedigingsbeleid wordt gevoerd, waardoor natuurlijke produkten een kans krijgen zich te bewijzen.

5.4 De invloed van gewasopbouw en omgevingsfactoren op de produktie en kwaliteit van karwijzaad

H.J. Bouwmeester en W.J.M. Meijer (AB-DLO)

Doel

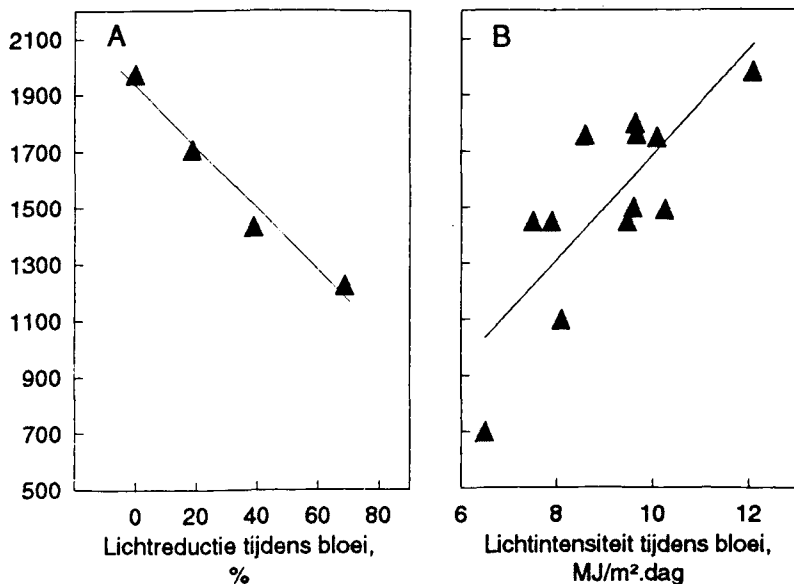
Om een rendabele teelt van karwij in Nederland mogelijk te maken is het, naast het vinden van nieuwe toepassingen voor het produkt, nodig te komen tot een hoog en stabiel opbrengstniveau. Als de nieuwe toepassingen met name carvon betreffen geldt dit vooral voor de carvonopbrengst. De grootste problemen voor de Nederlandse karwijteelt zijn de grote variaties in de zaadopbrengsten en het etherische-oliegehalte. De variërende zaadopbrengsten en oliegehaltes zorgen samen voor sterk wisselende etherische-olieopbrengsten en daarmee voor fluctuerende carvonopbrengsten. Het project beoogde te bepalen welke factoren verantwoordelijk zijn voor de fluctuaties in zaadopbrengst en etherische-oliegehalte. Aan de hand van metingen van gehalten in de loop van deze eeuw is een dalende tendens gesuggereerd.

Resultaten

De variaties in zaadopbrengst en etherische-oliegehalte bleken uit een analyse van literatuur- en praktijkgegevens zowel (1) tussen bedrijven als (2) tussen jaren op te treden. Dit geeft aan dat respectievelijk teeltgebonden parameters (1) én weersfactoren (2) een rol spelen bij het ontstaan van die fluctuaties. Het AB-DLO onderzoek heeft zich vooral op de invloed en het mechanisme van de effecten van het weer gericht. De teeltgebonden factoren zijn bij het PAGV in onderzoek.

Zaadopbrengst. In het onderzoek is vastgesteld dat een belangrijke verklaring voor de sterk variabele zaadopbrengsten is dat - vooral in de hogere schermordes - een wisselend deel van de bloemetjes een zaadje vormt. Dit verschijnsel blijkt grotendeels te worden veroorzaakt doordat niet alle bloemetjes volledig (mannelijk én vrouwelijk) zijn en dus geen zaadje kunnen vormen. Bestuiving is weliswaar belangrijk, maar blijkt onder veldomstandigheden niet beperkend te zijn doordat zowel insecten als wind er aan bijdragen. Echter voor zowel experimentele- als voor praktijkgegevens blijkt er een goede correlatie te bestaan tussen de hoeveelheid licht tijdens de bloei en de zaadzetting en daarmee de zaadopbrengst (Fig. 13). De opbrengstderving onder invloed van lichtreductie bleek in de experimenten te worden veroorzaakt door een vermindering van het aantal zaden, waarschijnlijk doordat bestoven, volledige bloemetjes door gebrek aan licht, en daardoor aan assimilaten, waren geaborteerd. De omstandigheden vóór de bloei lijken - uiteraard binnen bepaalde grenzen - veel minder invloed te hebben op de zaadopbrengst. Onderzoek waarbij planten in diverse stadia werden gelabeld met behulp van ^{13}C - CO_2 liet zien dat onder optimale omstandigheden 80-90% van de koolstof in het zaad afkomstig is van na de bloei gefixeerde CO_2 . Dit zou kunnen betekenen dat de omstandigheden na de bloei een sterk effect hebben op de zaadopbrengst. Echter, een lichtreductie tot zelfs 90% vanaf het einde van de bloei tot de oogst had slechts een gering negatief

Zaadopbrengst, kg/ha



Relatie tussen de hoeveelheid licht tijdens de bloei en de zaadopbrengst.

A) éénjarige karwij - veldexperiment 1992.

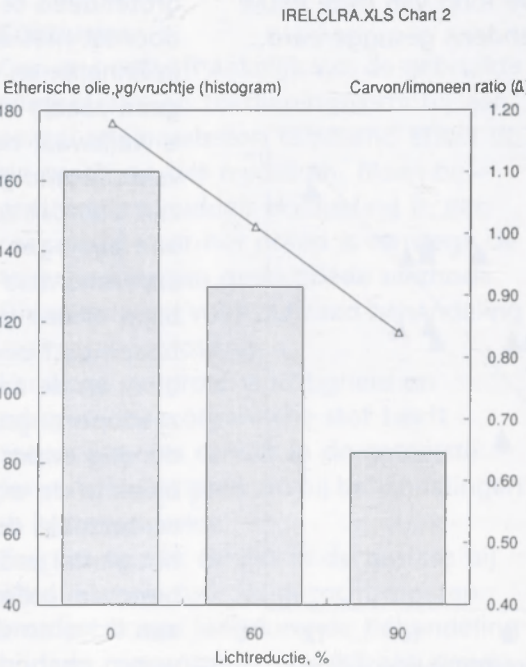
B) tweejarige karwij - gegevens praktijk 1961-64, 1987-93.

Er is gezocht naar de achtergronden van die cijfers en de eventuele trend. Begrip van de regulatie van het totale etherische-oliegehalte en inzicht in de sturing van het carvongehalte is van belang voor een optimale teelt van karwij.

effect op de opbrengst. De beschikbaarheid van assimilaten tijdens de bloei (=zaadzetting) blijkt dus het belangrijkste te zijn. Als de zaden eenmaal zijn aangelegd, zijn er voldoende koolhydraten beschikbaar voor de vulling, hetzij uit actuele fotosynthese hetzij uit opgeslagen reserves.

Etherische-oliegehalte. Bij onderzoek naar de regulatie van het etherische-oliegehalte is het van belang te weten of het gehalte wellicht door morfologische eigenschappen wordt beperkt. Berekeningen met gegevens uit de literatuur suggereren dat de grootte van de olie-opslagorganen geen morfologische restrictie is voor een hoger gehalte. De hoeveelheid etherische olie die zich bij de oogst in het zaadje bevindt is de resultante van synthese en verliezen. Met behulp van zogenaamde headspace-metingen is aangetoond dat de verliezen door vervluchtiging van etherische olie tijdens de teelt niet erg groot zijn (<2%), maar in samenwerking met het PAGV

dan bij tweejarige karwij, blijkt de hoeveelheid olie per zaadje niet lager te zijn. In vergelijking met tweejarige karwij steekt het éénjarige type relatief meer energie in andere componenten van het zaad dan in etherische olie. In een reeks experimenten is aangetoond dat de assimilatenbeschikbaarheid van belang is voor de vorming van etherische olie. Zo gaf verwijderen van concurrerende schermen een stijging en lichtreductie een vermindering van de olievorming in de (overblijvende) zaden (Fig. 14). Met behulp van *in vitro* experimenten werd aangetoond dat een vergroting van het sucrose-aanbod de carvon- en limoneen-vorming stimuleert (Fig. 15). Naast een effect op de totale hoeveelheid blijkt in beide experimenten ook dat het assimilatenaanbod de verhouding tussen carvon en limoneen beïnvloedt. Hoe hoger het assimilatenaanbod is hoe hoger de carvon/limoneen ratio (Fig. 14). Om de veronderstelde negatieve trend in het etherische-oliegehalte over deze eeuw



14. Effect van lichtreductie van begin bloei tot oogst op het gehalte etherische olie en de carvon/limoneen verhouding.

bleek dat beschadigingen als gevolg van het dorsen tot verliezen door vervluchtiging van circa 10-15% kunnen leiden. De vorming van etherische olie is het sterkst in jonge vruchtjes en is na enkele weken al vrijwel compleet. Hoewel het gehalte (% van zaadgewicht) in het zaad van éénjarige karwij in het algemeen lager is



15. Semi *in vitro* systeem voor bestudering van het effect van sucrose op de productie en samenstelling van de etherische olie.

te toetsen werden de via stoomdestillatie bepaalde gehalten van zaadmonsters van praktijkpercelen uit recente jaren vergeleken met een gaschromatografische bepaling op het AB-DLO. Dit liet zien dat de negatieve trend in het etherische-oliegehalte samenhangt met de minder volledige stoomdestillatiemethode die de

laatste jaren is gebruikt. Het ongewoon hoge carvongehalte in de via stoomdestillatie gemeten monsters geeft aan dat niet alle limoneen, maar wel alle carvon is overgedestilleerd. Na het uitvoeren van een op dit feit gebaseerde correctie bleek de dalende trend niet aanwezig te zijn.

Conclusies en suggesties

Licht speelt een belangrijke rol bij de zaadvorming en de synthese van etherische olie. Ten eerste is er een positieve correlatie tussen de hoeveelheid licht (assimilatenbeschikbaarheid) en de zaadzetting/zaadopbrengst. Ten tweede leidt een grotere assimilatenbeschikbaarheid tot hogere gehalten etherische olie. Naast een effect op de totale hoeveelheid etherische olie blijkt bij een verhoogd assimilatenaanbod ook de verhouding tussen carvon en limoneen gunstiger te worden.

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 het beschikbare licht effectiever benutten. 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 zou de grootte van die bloemblaadjes gereduceerd kunnen worden. 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. Omdat een deel van de etherische-olievorming ook al tijdens de bloei plaatsheeft zou een verkleining van de bloemblaadjes wellicht ook kunnen leiden tot een hoger etherische-oliegehalte met mogelijk

bovendien een betere kwaliteit. Het feit dat de verhouding tussen carvon en limoneen 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 kunnen aandragen.

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

H. Toxopeus en J.H. Lubberts, CPRO-DLO

Doel

Het onderzoek beoogde het opbouwen van kennis, vaardigheden en plantmateriaal nodig voor het ontwikkelen van nieuwe, goed aangepaste karwijtypen en rassen met een hoog rendement aan carvon. Hierbij stond de gedachte centraal om het gehalte van carvon in het zaad aanzienlijk te verhogen in combinatie met minstens het zaadopbrengend vermogen van bestaande rassen.

Resultaten

Meetmethoden. Een belangrijke voorwaarde voor succes van dit onderzoek was de beschikbaarheid van een snelle,

ontwikkeld, die momenteel op effectiviteit getest wordt. Met deze methode zal het mogelijk worden resistente rassen te ontwikkelen.

Massaselectie in tweejarige karwij. Het recurrente divergente massaselectie-onderzoek in het 'Oldambtster' landras (RDMO) had als doel na te gaan in hoeverre traditionele winterkarwij met herhaalde massaselectie te selecteren is in populaties met hoge en met lage gehalten (divergent). Uitgangsmateriaal was het traditionele Noord-Hollands landras van loszadige winterkarwij zoals dat in het Oldambt al vele jaren wordt geteeld. Na drie generaties



16.

Het kruisen van karwijgenotypen in de kas.

voldoende accurate en niet destructieve bepalmethode van carvon- en limoneergehalten in kleine monsters (ca. 2 g) karwijzaad. Nabij-infrarood spectrometrie (NIR) bleek voor dit doel goed toepasbaar. De beschikbare apparatuur is geijkt met gaschromatografisch bepaalde gehalten van speciaal geselecteerde reeksen monsters uit de jaren 1990 t/m 1994. Voor verbruiningsziekte is, gezamenlijk met IPO-DLO en PAGV, een resistentie toets

selectie werden populaties verkregen die in opbrengstvergelijkende veldproeven gemiddeld een carvongehalte van 2.4% lieten zien, hetgeen significant hoger is dan de 2.1% van de uitgangspopulatie. Voorts bleken de selecties een even hoge zaadopbrengst te geven als de standaardrassen (tabel I). De populaties met verhoogd carvongehalte staan aan de basis van een proefras van het type loszadige winterkarwij.

Tabel I. Opbrengst en gehalten van RDMO-selecties en standaardrassen in de opbrengst-proef 1992/'93 op CPRO-DLO proefboerderij 'de prof Broekemahoeve' bij Lelystad.

selecties	gehalten		opbrengst	
	carvon	limoneen	zaad (ton/ha)	carvon (kg/ha)
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	2.7	54
CARV H 89	2.2	2.2	2.6	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
Uitgangspopulatie Oldambster	2.1	2.1	1.87	39
Standaard rassen				
Volhouden	2.1	2.1	2.22	47
Bleija	2.1	1.8	2.29	48
LSD ¹⁾	0.2	0.3	0.42	11
CV ²⁾	6%	7%	11%	14%

EO = etherische olie; CARV = carvon; H = hoog, en L = laag; 89 = 1989 het jaar van de oogst van de 2e generatie massaselectie, 91 = 1991 de oogst van de 3e generatie.

¹⁾ LSD: het kleinste nog significante verschil

²⁾ CV : coëfficiënt van variatie

Vastzadigheid. Bij het beoordelen van een aantal buitenlandse tweejarige, winterkarwij-accessies bleek weinig of geen meerwaarde te bestaan ten opzichte van de Nederlandse rassen. De meesten zijn waarschijnlijk nateelt van dit Nederlandse materiaal. Het belang van zaadvastheid voor opbrengst-stabiliteit werd nog eens duidelijk gedemonstreerd: in een loszadig gewas kan de helft van de opbrengst verloren gaan door een week te laat oogsten. Een vastzadig 'hoog carvon' ras wordt ontwikkeld.

Tetraploïde karwij. De recente vooruitgang in fertiliteit van het in de jaren '70 uit het vastzadige ras 'Bleija' gecreëerde tetraploïde materiaal geeft aan dat het mogelijk moet zijn om binnen afzienbare tijd dit grootzadige type met hoge gehalten, voor teelt ter beschikking te hebben. Interessant is het verschijnsel van de loze vruchtjes die aan de planten blijven zitten. In deze vruchtjes is het embryo niet uitgegroeid. Ze bestaan slechts uit de vruchtwanden waarin zich de met etherische olie gevulde kanaaltjes bevinden. In loze vruchtjes kan, als

gevolg van het geringe eigen gewicht, het gehalte carvon oplopen tot 10%, ten opzichte van 2.1% in gewoon zaad. Gezocht wordt naar mogelijkheden om het verschijnsel van de loze vruchtjes te benutten.

Eénjarige karwij. Het in 1986 geëvalueerde genetische materiaal omvatte éénjarige accessies, in die tijd nog een verrassing. In de volgende jaren werd een ras van dit nieuwe gewas zomerkarwij ontwikkeld: Karzo, dat naar verwachting in 1995 in de rassenlijst zal worden opgenomen. Het is een gemakkelijk te telen oogstzeker vastzadig ras met een mooi groot zaad, echter de gehalten zijn laag. In tegenstelling tot hetgeen was gevonden bij winterkarwij bleek het zomerkarwij-materiaal waar Karzo uit voortkomt een geringe genetische variatie voor etherische olie-, en carvongehalten te hebben.

Kruisingsprodukten. Kruising van winter- en zomerkarwij heeft éénjarig materiaal opgeleverd van waaruit een proefras van zomerkarwij is ontwikkeld dat de landbouwkundige waarde van Karzo

combineert met aanzienlijk hogere gehalten. Voorts kon, uit ditzelfde uitgangsmateriaal, een nieuw wintertype worden ontwikkeld, voor zaai medio augustus en oogst einde juli het volgende jaar (Fig. 16).

Weefselkweek. Gebleken is dat met de nieuwe *in vitro* weefselkweekmethode van en door 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 zg. polycrossen van hooggehaltige, streng geselecteerde klonen. Verwacht wordt dat dergelijke rassen een gehalte van ca. 3% carvon zullen hebben in combinatie met minstens het huidige gemiddelde zaadopbrengstvermogen van 2-3 t/ha.

Conclusies

- Er is een non-destructieve methode ontwikkeld voor het snel en betrouwbaar bepalen van gehalten carvon en limoneen aan kleine hoeveelheden zaad.
- Van traditionele winterkarwij is raswaardig materiaal van het loszadige type met verhoogd carvongehalte in praktijkonderzoek. Soortgelijk materiaal van het *vastzadige* type is in ontwikkeling; hierin neemt het tetraploïde materiaal een bijzondere plaats in.
- Uit de kruising van éénjarige met tweejarige typen is ondermeer een materiaal voortgekomen, dat bij zaai in medio augustus (zonder dekvrucht) toch in het volgende jaar bloeit en rijp zaad produceert eind juli.
- Een ras van zomerkarwij is ontwikkeld waarmee karwij in meer rotaties kan worden ingepast, en het kan 'in het jaar van de markt' worden geteeld. Raswaardig materiaal van een nieuw ras met hogere gehalten is in het stadium van praktijkonderzoek.

Zwaartepunten van het toekomstige onderzoek:

- Het bestuderen, selecteren en groeperen in polycross, alsmede de instandhouding en vermeerdering van 'hoog-carvon' klonen.
- Het toetsen van twee of drie generaties nakomelingschappen van de verschillende polycrossen om te onderzoeken in hoeverre de superieure inhoudseigenschappen

zich blijvend manifesteren.

- Het ontwikkelen van een praktische methode voor genetische transformatie van karwij.

5.6 Vegetatieve instandhouding en vermeerdering van karwij (*Carum carvi* L.)

W.J. Neervoort, W.Folkers en G. Huisjes, Prof. H.C. van Hall Instituut

Doel

In de periode 1990-1993 werd op het Prof. H.C. van Hall Instituut te Groningen onderzoek verricht naar de mogelijkheden van *in vitro* weefselkweek van karwij (*Carum carvi* L.). Het belangrijkste doel was: de ontwikkeling van een effectieve methode om karwij, in een zo laat mogelijk stadium van de plantontwikkeling, vegetatief te vermeerderen. Onder deze voorwaarde is een goede fenotypische beoordeling van individuele planten mogelijk en kunnen, via de vegetatieve vermeerdering, hoogwaardige geniteurs met elkaar worden gekruist, zonder dat ongewenst stuifmeel aan het bevruchttingsproces kan deelnemen. Middels vegetatieve vermeerdering zal de veredeling van een kruisbevruchter zoals karwij, sneller en efficiënter kunnen plaatsvinden, vooral voor eigenschappen die pas na de bloei tot uiting komen.

Resultaten

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 respectievelijk 5, 15 en 90%, indien de explantaten afkomstig waren van planten uit de kas. Met materiaal verzameld in het veld dient rekening te worden gehouden met een verhoogde kans op inwendige infecties en een terugval van de scheutinductie met 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 ca. 4 weken kunnen worden afgehard. Figuur 17 toont adventieve scheutvorming uit bloemschermpjes van karwij op Gamborg B5 medium met NAA en BA (A) en de volledig geregenereerde *in vitro* plantjes op bewortelingsmedium MS10 zonder hormonen (B).



17.

Carum carvi L. A. Adventieve scheutvorming uit bloemschermpjes van karwij op Gamborg B5 medium met NAA en BA. B. Volledig geregenereerde *in vitro* plantjes op bewortelingsmedium MS10 zonder hormonen.

Ten behoeve van het CPRO-veredelingsprogramma werden 220 geniteurs, afkomstig uit diverse selecties van diploïde en tetraploïde 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 gekloneerd. De fenotypische expressie van klonen

afkomstig van dezelfde geniteurs bleek zeer uniform, in tegenstelling tot de fenotypische expressie van klonen afkomstig van verschillende geniteurs.

Conclusies

Een bruikbare methode is ontwikkeld om karwij, in een relatief laat stadium van de plantontwikkeling, *in vitro* in stand te houden en te vermeerderen. Vooral explantaten, afkomstig uit jonge bloeiwijzen, zijn vanwege hun regeneratievermogen geschikt voor weefselkweekdoeleinden.

Adventieve scheutvorming kan het best geïnduceerd worden op een Gamborg B5 medium in aanwezigheid van de hormonen NAA en BA; de verdere vermeerdering en beworteling op een hormoonvrij MS10 medium. De resultaten van de *in vitro* vermeerdering van zomerkarwij en winterkarwij zijn vergelijkbaar. Tevens lijkt de *in vitro* vermeerdering geen invloed te hebben op de genetische stabiliteit.

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

A. Evenhuis (PAGV) en B. Verdam (IPO-DLO)

Inleiding

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 de ziekte, veroorzaakt door *Mycocentrospora acerina*. De ecologische 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.

Resultaten

In de eerste jaren werd de nadruk gelegd op het vergroten van de kennis van het pathogeen. Gestart werd met een literatuuronderzoek. Voor de ontwikkeling van de ziekte in het gewas zijn o.a. de lage temperatuurbehoefte en het vochtminnende karakter van de schimmel van belang. Uit kasproeven bleek dat karwij zowel door conidiën als chlamydosporen kan worden geïnfecteerd. Onder gunstige omstandigheden kon

binnen drie dagen een infectiecyclus voltooid worden. Dat betekent dat de schimmel zich in het veld onder gunstige omstandigheden snel zou kunnen uitbreiden. Figuur 18 laat het symptoom op de stengel zien.

Conidiën van *M. acerina* verspreiden zich slechts over een beperkte afstand. Inoculum van buiten het veld lijkt dan ook een geringe rol te spelen bij de besmetting van karwij.

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 en de perceelskeuze te beïnvloeden.

Daarnaast werd vastgesteld dat zaaizaad besmet kan zijn met *M. acerina*. Een toets is ontwikkeld om de mate van zaadbesmetting aan te tonen. Dat geeft in de toekomst de mogelijkheid om ziektevrij zaaizaad te produceren. Ontsmetting van zaaizaad gaf een goede bescherming van de kiemplant tegen infectie vanuit de bodem en het zaad. De resultaten in het veld komen binnenkort beschikbaar. Volvelds behandeling tegen *Sclerotinia* heeft een nevenwerking



18.

Symptomen van de aantasting van karwij door *Mycocentrospora acerina*, de veroorzaker van verbruiningsziekte.

Tabel II. Legering, percentage zieke planten, mate van aantasting en opbrengst van zomerkarwij bij verschillende stikstof niveaus en inoculatie met *Mycocentrospora acerina*.

N-gift (kg/ha)	inoculatie	legering (%)		Zieke planten (%)		aantasting %	opbrengst (kg/ha)	
		1992	1993	1992	1993	1993	1992	1993
0	-	0	13	1	73	8.4	541	1169
40	+	0	10	13	99	30.8	554	792
100	-	0	63	1	89	10.9	741	1059
100	+	0	55	30	100	44.0	733	532
160	-	-	78	-	93	13.6	-	1063
160	+	-	83	-	100	41.1	-	503
LSD n (0,05)			18	2	3	6.1	116	120

op verbruining, echter het resultaat is vaak onzeker.

In de herfst vindt op afstervend blad inoculumopbouw plaats. Hieruit kunnen stengels, schermen en zaden in het voorjaar geïnfecteerd worden. In het veld bleek dat de schimmel in ernstige mate voorkwam in karwijgewassen met een dichte stand. Middels vermindering van de zaaizaadhoeveelheid, een niet te nauwe rijenafstand en een beperkte stikstofgift kon het optreden van de ziekte beperkt worden.

Infectie van de plant kan leiden tot stengelomvattende lesies, waardoor de boven gelegen plantedelen (schermen) afsterven. Dit is een van de belangrijkste oorzaken van schade door verbruining in de karwijteelt (Fig. 18).

Een aantal gewassen (o.a. spinazie en dille) en akkeronkruiden (o.a. klein kruiskruid en herderstasje) bleken vatbaar voor *M. acerina*. De bijdrage aan de inoculumopbouw in het veld lijkt beperkt. In karwijstro kunnen chlamydosporen gevormd worden. De gewasresten blijven op het land achter en vormen zo een inoculumreservoir voor een volgende karwijteelt.

Ten behoeve van de veredeling is door het PAGV een resistentietoets ontwikkeld, die toegepast wordt om het niveau van de resistentie in karwijpopulaties omhoog te brengen.

In 1994 worden nog waarnemingen in veldproeven gedaan. De uitgebreide resultaten worden beschreven in een PAGV-verslag.

Conclusies

Met een reeks van maatregelen kan het risico op schade door de verbruiningsziekte in de karwijteelt beperkt worden. Uitgangspunten hierbij zijn: 1) Een gezonde beginsituatie (gezond zaaizaad, perceelskeuze) waardoor de inoculumopbouw 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 de plant tegengaan maar is nog niet toegelaten. Volvelds behandeling gaf tot nu toe onzekere resultaten.

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

M. Gerlagh, B. Verdam en H.M. van de Geijn (IPO-DLO)

Doel.

Onder de ziekten die de oogstzekerheid van karwij bedreigen neemt sclerotiënrot, veroorzaakt door *Sclerotinia sclerotiorum*, een belangrijke plaats in. Gezien de



19.

Karwij, overgang stengel-wortel. De opengewerkte, aangetaste plek toont sclerotiën van *Sclerotinia sclerotiorum* binnenin de holle stengel en wortel.

bepaalde schaal van de teelt van karwij, was kennis omtrent deze ziekte vooral een afgeleide van hetgeen bij andere gewassen was onderzocht. Onderzoek aan de ecologie van *S. sclerotiorum* in karwij werd een noodzakelijke stap geacht in het streven naar specifieke maatregelen om schade door deze ziekte te voorkomen. Deze maatregelen zelf vormden het sluitstuk van het onderzoek. Door het beoogde werk te integreren in een lopend IPO-DLO project aan biologische bestrijding van *S. sclerotiorum*, kon met gebruikmaking van karwij-specifieke kennis, geprofiteerd worden van verworven inzichten bij andere gewas-pathogeen relaties.

Resultaten

Sclerotiën. Karwij wordt in het eerste jaar geteeld onder een dekvrucht, die vaak eveneens vatbaar is voor *S. sclerotiorum*. Sclerotiënrot in de dekvrucht leidt tot vorming van sclerotiën, waaruit nog in datzelfde jaar, tegen het eind van het seizoen, onder een gesloten dek van karwij vruchtlichamen (apotheciën) kunnen ontstaan, die de

bron vormen van infectie van het gewas (Fig. 19). Ook oudere, in de grond aanwezige sclerotiën kunnen in deze fase nog een rol spelen. Op het geïnfecteerde karwijloof ontstaan sclerotiën, die overwinteren op de oppervlakte van de grond. Deze sclerotiën bleken belangrijk voor infectie van karwij in het oogstjaar. Het overblijven van de ziekte tijdens de winter op besmette planten bleek praktisch niet plaats te vinden.

Grondbewerking. Afwezigheid van een grondbewerking tussen eerste en tweede jaar heeft grote consequenties voor het beheersen van een epidemie van sclerotiënrot. In de eerste plaats worden in het eerste jaar gevormde sclerotiën niet door verplaatsing naar diepere lagen tijdelijk onschadelijk gemaakt, maar daar staat tegenover, dat geen verse sclerotiën vanuit de ondergrond naar de bovenste bodemlagen worden geploegd. Infectie in het eerste jaar kan dus plaatsvinden via aanwezige sclerotiën in de bovenste grondlaag, zowel via de dekvrucht als ook eventueel later direct in de karwij, en via oppervlakkige sclerotiën, gevormd op de dekvrucht. Infectie in het tweede jaar vindt zijn oorsprong uitsluitend in sclerotiën die in het eerste teeltjaar zijn gevormd, en oppervlakkig liggen (Fig. 19).

Bestrijding. Afgezien van mogelijke bestrijding van *S. sclerotiorum* met fungiciden, is het voorkomen van besmetting van het gewas door onderdrukking van de ontwikkeling van vruchtlichamen, de meest belovende strategie. Twee methoden om dit te bereiken werden onderzocht:

1. het gebruik van kalkstikstof;
2. het gebruik van de antagonistische schimmel *Coniothyrium minitans*.

1. Kalkstikstof.

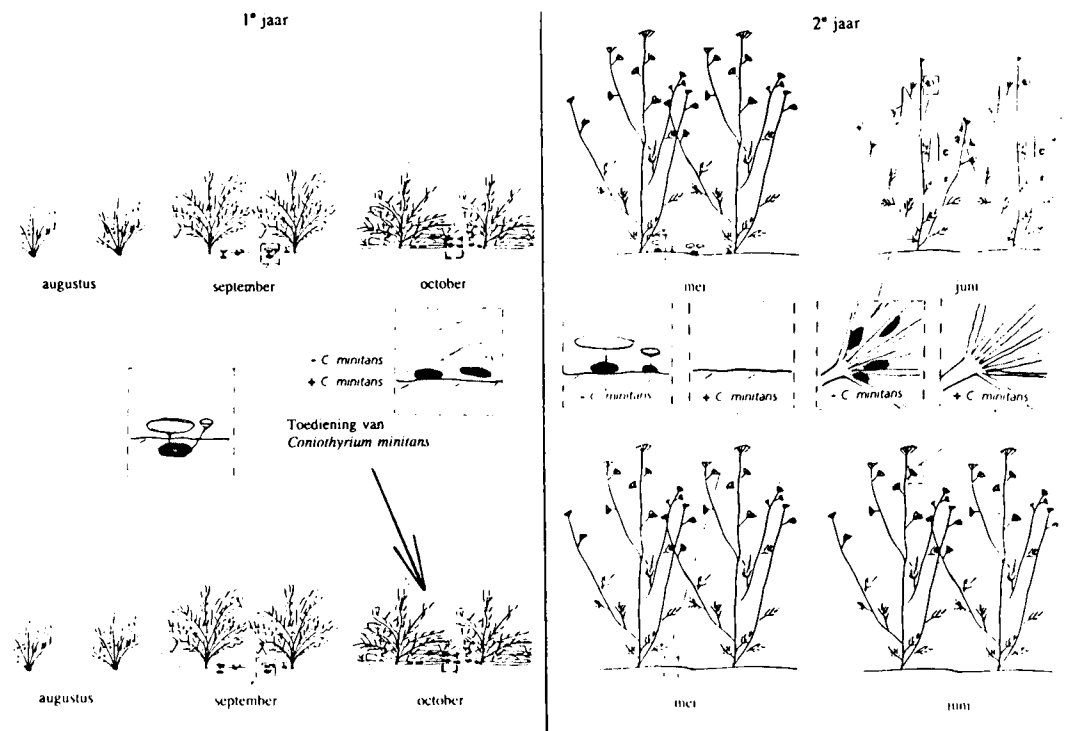
Kalkstikstof is een produkt met een lange geschiedenis, vooral als meststof en als herbicide. Daarnaast is bekend, dat toediening van 500 kg ha⁻¹ het verschijnen van vruchtlichamen van *S. sclerotiorum* gedurende 3-4 maanden na toediening geheel of in overwegende

mate voorkomt. Ook in karwij bleek kalkstikstof toepasbaar, hetzij circa 14 dagen vóór het zaaien, hetzij in februari/maart van het tweede jaar, voordat de actieve groei van het gewas weer begint. De toepassing in het eerste jaar schiet duidelijk tekort, omdat later in het seizoen vruchtlichamen alsnog verschijnen, wanneer de kalkstikstof is uitgewerkt. Onderdrukking in het tweede jaar is wél van voldoende duur om het gewas tot de oogst van besmetting te vrijwaren. Vaak is echter het effect van kalkstikstof niet 100%, en dan zal een weliswaar gereduceerd aantal vruchtlichamen, aantasting van het gewas toch niet geheel uitsluiten.

2. *Coniothyrium minitans*.

De antagonist *C. minitans* tast sclerotiën en mycelium van *S. sclerotiorum* aan, waardoor het pathogeen te gronde gaat. In een groot aantal onderzoeken, zowel bij IPO-DLO als op vele andere plaatsen, is aangetoond dat bespuiting van een ziek gewas met de antagonist leidt tot sterke reductie van het aantal vitale sclerotiën en dus van de bodembesmetting. Enkele weken na bespuiting met de antagonist is ruim 90% van de gevonden sclerotiën besmet en ten dode gedoemd. Het effect is nog

sterker als rekening wordt gehouden met sclerotiën die reeds zover zijn vergaan, dat zij niet meer worden aangetroffen. Gelet op het hierboven voor de ecologie van *S. sclerotiorum* in karwij beschrevene, dient bespuiting met de antagonist te worden uitgevoerd in het najaar van het eerste teeltjaar. De toepasbaarheid van deze strategie werd overtuigend aangetoond in een veldproef met het sterk aan karwij verwante gewas peen, dat werd ingezaaid na het mislukken van een karwijteelt. De peen overwinterde onder plastic tot een zaadgewas in het tweede jaar. In het eerste jaar trad aantasting op door *S. sclerotiorum*. Hiertegen werd in het najaar gespoten met *C. minitans* (suspensie van $5 \cdot 10^6$ conidiën ml^{-1} water). Ten gevolge van deze bespuitingen ontstonden in de bespoten percelen slechts 0,1 vruchtlichamen per m^2 , tegen 1,7 in de controle. In combinatie met hernieuwde bespuitingen in de zomer van het tweede jaar leidde dit tot een reductie van het percentage aangetaste zaadschermen van circa 4% tot circa 0,5%. Resultaten uit andere proefnemingen maken het aannemelijk dat de najaarsbespuiting met *C. minitans*, en de daaruit voortvloeiende teruggang in aantal vruchtlichamen, en dus in smetstofpotentiaal,



20.

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.)

het grootste deel van deze ziekte-reductie voor zijn rekening neemt. Figuur 20 geeft een schematische weergave van de toepassing van de antagonist *C. minitans* ter bestrijding van *Sclerotinia sclerotiorum* in tweejarige karwij.

Conclusies.

Bij tweejarige karwij gaat aantasting in het eerste jaar niet noodzakelijk over naar het tweede jaar, maar draagt wel bij aan verhoging van de smetstofpotentiaal in het tweede jaar.

Toediening van kalkstikstof (500 kg ha^{-1}) in het vroege voorjaar van het oogstjaar leidt tot sterke reductie van het aantal vruchtlichamen, met vermindering van aantasting door *S. sclerotiorum* tot gevolg. Deze maatregel is echter niet consistent afdoende, en bovendien is kalkstikstof duur.

Bespuiting van zieke karwij in het najaar van het eerste jaar met *C. minitans* doodt vrijwel alle nieuwgevormde sclerotiën, die de bron vormen voor het verschijnen van vruchtlichamen binnen het gewas in het tweede jaar. Deze bespuiting, eventueel in combinatie met gewasbespuiting in het tweede jaar, leidt, zoals aangetoond bij peen, tot afdoende bestrijding van *S. sclerotiorum*. Indien in het eerste jaar in het geheel geen aantasting optreedt in de karwij of zijn dekvrucht, is aantasting in het tweede jaar evenmin te verwachten.

5.9 Biologie en bestrijding van de wollige karwijluis

J.D. Prinsen en M.N.C.P. Buijsman (IPO-DLO)

Doel

Karwij kan worden aangetast door bladluizen van de soort *Pemphigus passeki*, die aan de wortel zuigen. De schade ontstaat in het eerste jaar, wanneer de planten onder de dekvrucht, en na de oogst daarvan, voldoende moeten groeien om in het volgende jaar te kunnen bloeien en zaad produceren. Het optreden van de karwijluis is grillig, in sommige jaren is ze nauwelijks te vinden, maar soms komt ze zo massaal voor dat de plantengroei onvoldoende is voor bloei. Over de achtergronden van de opbouw van de luispopulatie en de ontwikkeling in een eenmaal geïnfecteerd gewas was nog weinig bekend. Doel van het onderzoek was om grondige kennis van de levenswijze van de luis op te bouwen en van de factoren die de omvang van de infectie in een gewas bepalen. Op basis van die kennis worden aangrijpingspunten gezocht voor een geleide en zo mogelijk geïntegreerde bestrijding.

Resultaten

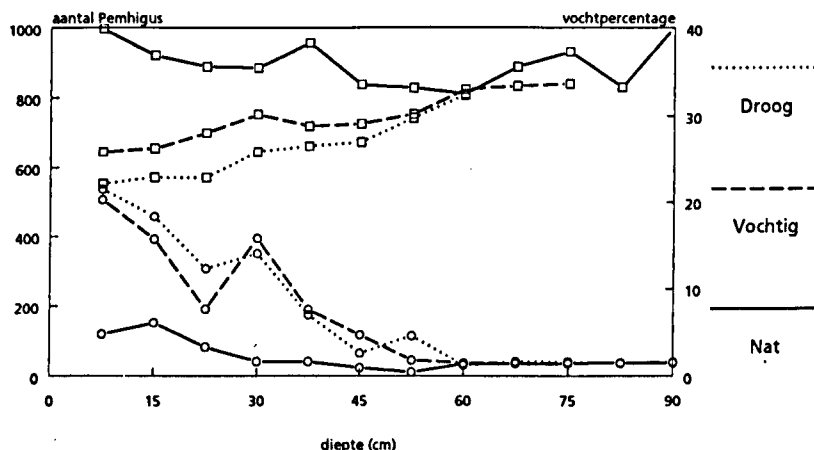
Pemphigus passeki overwintert als ei op Italiaanse en zwarte populier. In het voorjaar vormt de eerste generatie gallen

karwij waar ze haar larven afzet op het loof. Deze larven lopen naar de wortel en vermeerderen zich daar enkele generaties lang, tot diep in de herfst. Dan ontstaat er weer een gevleugelde generatie die terugvliegt naar populier. In de eerste fase van het onderzoek zijn de methoden ontwikkeld om de voorjaarsvlucht van de luis en de kolonisatie van het gewas te kwantificeren en om de populatieontwikkeling op de karwijwortels te kunnen meten. Vervolgens is onderzocht hoe de kolonisatie in het dekvruchtjaar verloopt, wat de invloed is van de soort dekvrucht op de kolonisatie en hoe de populatie luizen zich in het eerste jaar ontwikkelt afhankelijk van de vochttoestand van de bodem.

De migratie van de luis van de winterwaard populier naar de karwijgewassen is niet eenvoudig te kwantificeren. De vluchten beginnen eind juni en gaan door tot begin augustus. De dekvrucht lijkt invloed te hebben op de kolonisatie. Onder gerst kwamen nauwelijks wortelluizen tot ontwikkeling. Voor de opbouw van de populatie blijkt de vochttoestand van de grond belangrijk. In droge en matig vochtige grond vindt kennelijk een snelle vermeerdering plaats, mogelijk omdat de toegankelijkheid via krimp-scheuren goed is. Natte grond verhindert de populatieopbouw (Fig. 21). Omdat de groei van de planten bij droogte vertraagd wordt, is de aantasting door de luizen een extra handicap. Op basis van de verworven kennis van de ecologie van het insect is het nog niet mogelijk om maatregelen of strategieën te formuleren om een plaag te beperken.

(Deze samenvatting is gemaakt door de redactie op basis van de eerste drie onderzoekjaren)

luisprofiel versus vochtprofiel
2 - 5 september 1991



O = aantal Pemphigus, □ = vochtpercentage

21.

De gemeten aantallen karwijluizen op verschillende diepten in de grond en bij droge, vochtige en natte grond.

op het blad. De tweede generatie, die bestaat uit gevleugelden, verlaat omstreeks juli de gal en vliegt naar

5.10 Omzetting van carvon door micro-organismen

J.N. Bottema-Mac Gillavry (Groningen Biotechnology Centre)

Doel

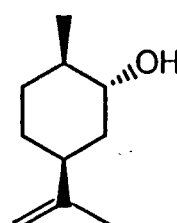
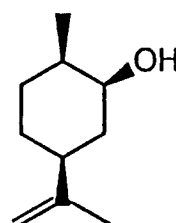
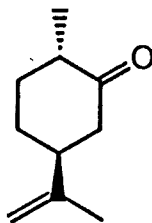
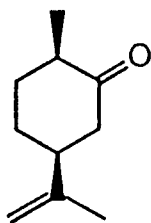
Dit onderzoek is als éénjarig haalbaarheidsonderzoek uitgevoerd om na te gaan of carvon door micro-organismen op een specifieke manier kan worden omgezet in hoogwaardiger verbindingen.

Resultaten

De structuur van carvon, en ervan afgeleide verbindingen, is te beschouwen als een zesring van koolstofatomen met

naar voren (2a) en één met de hydroxylgroep naar achteren (2b). Uit 1b ontstonden geen dihydrocarveolen. De micro-organismen konden blijkbaar deze isomeer niet omzetten.

De stand van de zijgroepen bepaalt dus welke biologische reacties met de stof kunnen plaatsvinden. Bovendien bepaalt de structuur eigenschappen als geur en smaak en draaiing van gepolariseerd licht. Deze stoffen zouden daardoor



1a isodihydrocarvon 1b dihydrocarvon

2a neo-isodihydrocarveol 2b isodihydrocarveol

22.

Structuurformules van isodihydrocarvon (1a), dihydrocarvon (1b), neoisodihydrocarveol (2a) en isodihydrocarveol (2b).

aan de ene kant de isopropenylgroep, daartegenover een methylgroep en daarnaast al of niet een zuurstofgroep. Carvon werd aan een aantal geselecteerde bacteriën en een schimmel aangeboden. De micro-organismen hadden daarnaast de beschikking over alle benodigde voedingsstoffen en lucht. De proeven werden in batch-cultuur uitgevoerd. Carvon werd omgezet in dihydrocarvon en dihydrocarveolen (Fig. 22). Het bijzondere bij deze omzettingen is dat de starre structuur van carvon verloren gaat: bij dihydrocarvon kan de methylgroep knikken ten opzichte van de zesring. Hierdoor ontstaan er uit carvon twee verschillende dihydrocarvon en dihydrocarveolen (Fig. 22). Het bijzondere bij deze omzettingen is dat de starre structuur van carvon verloren gaat: bij dihydrocarvon kan de methylgroep knikken ten opzichte van de zesring. Hierdoor ontstaan er uit carvon twee verschillende dihydrocarvon en dihydrocarveolen met dezelfde structuurformule maar met een verschillende ruimtelijke oriëntatie. Dergelijke paren moleculen worden (dia)stereoisomeren genoemd. Bij dihydrocarveol kan bovendien de zuurstofgroep naar voren of naar achteren staan, in tegenstelling tot bij carvon en dihydrocarvon waar de zuurstofgroep in het vlak van de zesring opzij uitstaat door de dubbele band. Uit 1a ontstaan daardoor twee stereoisomere dihydrocarveolen: één met de hydroxylgroep

gebruikt kunnen worden als geur- en smaakstof of kunnen dienen als basis voor chemische synthese van stoffen, waarbij de stand van bepaalde zijgroepen van belang is. Dit is bijvoorbeeld het geval bij de productie van medicijnen of insectenbestrijdingsmiddelen.

De carvonderivaten kunnen vrij eenvoudig chemisch worden gesynthetiseerd. Het probleem daarbij is echter dat de derivaten steeds paarsgewijs ontstaan en moeilijk zuiver te krijgen zijn. In micro-organismen worden de reacties door enzymen gekatalyseerd. Enzymen zijn meestal ruimtelijk gespecialiseerd, waardoor slechts een van beide isomeren wordt geproduceerd. Indien meerdere isomeren worden gevormd, kunnen de ongewenste enzymen door mutatie en selectie onwerkzaam worden gemaakt, zodat uitsluitend het gewenste produkt ontstaat. Op dezelfde wijze kan ook de productie opgevoerd worden.

De geteste micro-organismen volgden verschillende strategieën bij de omzetting van carvon: sommige bacteriën maakten veel 1b en een beetje 1a dat daarna in 2a werd omgezet (route I). Andere bacteriën begonnen met de synthese

van **1a**. Dit werd daarna grotendeels omgezet in **1b** (route II). De enige geteste schimmel volgde een andere route (III): deze maakte eerst stof **1a** en zette die vervolgens vrijwel geheel om in stof **2a**. Aanvankelijk werden door de schimmel ook trans- en ciscarveol gevormd door directe reductie van de zuurstofgroep, terwijl de dubbele band in de ring intact bleef. De carveolen verdwenen echter weer snel.

De produktie van **1b** via route I was gering en bovendien werd **2a** gevormd, zodat **1b** niet zuiver werd verkregen. Via route II werd **1b** wel tamelijk zuiver en in grotere hoeveelheden gevormd. De schimmel produceerde **2a** tamelijk zuiver en met betrekkelijk hoog rendement.

Conclusie

Dit betekent dat de carvon-derivaten dihydrocarvon (**1b**) en neo-iso-dihydrocarveol (**2a**) door de micro-organismen betrekkelijk zuiver geproduceerd kunnen worden. De schimmel en de micro-organismen die route I volgen lenen zich daarom voor verder onderzoek. Bovendien is het van belang de enzymsystemen die verantwoordelijk zijn voor deze omzettingen te onderzoeken. Of de gevormde stoffen economisch nut kunnen hebben is nog niet duidelijk. Wel heeft de geur- en smaakstoffen-industrie interesse getoond in de produkten zoals die gevormd kunnen worden uit carvon.

5.11 Toepassingsmogelijkheden van S-(+)-carvon als chirale uitgangsstof in de synthese van enantiomeer zuivere geurstoffen, gewasbeschermingsmiddelen en tussenprodukten van de organische synthese.

A.A. Verstegen-Haaksma, H.J. Swarts, B.J.M. Jansen en Ae. de Groot, LUW

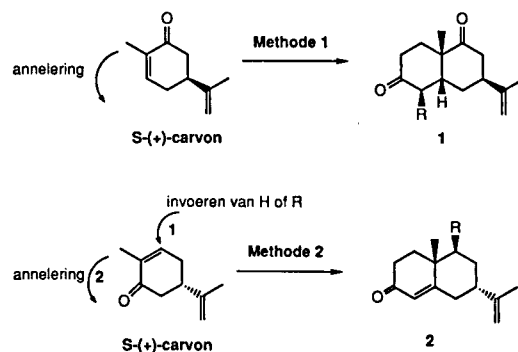
Doel

Vele natuurprodukten hebben een biologische werking die ze geschikt maken voor toepassing in medicijnen, in de gewasbescherming of in de geurstoffen-industrie. 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. Wanneer het gewenste natuurprodukt chiraal is, is het nodig de synthese uit te voeren met chirale hulpmiddelen. Een chirale verbinding is een verbinding die niet door draaien van het molecuul samen kan vallen met zijn spiegelbeeld. De chirale verbinding en zijn spiegelbeeld worden enantiomeren genoemd (een alledaags voorbeeld van chiraliteit is een paar schoenen. De linker- en rechterschoen zijn elkaars spiegelbeeld, maar de linkerschoen kan niet zodanig gedraaid worden dat hij gelijk is aan de rechterschoen). Een andere mogelijkheid voor het verkrijgen van chirale produkten, is een ander, gemakkelijk verkrijgbaar, natuurprodukt als uitgangsstof te gebruiken in de synthese. S-(+)-Carvon, de hoofdcomponent van karwijolie, is hiervoor zeer geschikt en is in dit onderzoek getest als uitgangsstof in de synthese van chirale, biologisch actieve verbindingen.

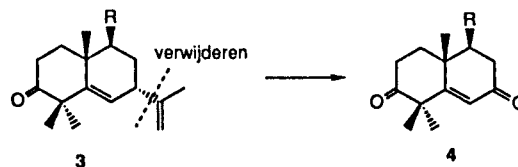
Resultaten

S-(+)-Carvon is op twee manieren omgezet in een bicyclisch tussenprodukt (zie schema). De eerste manier van ringvorming (=annelering) is de Diels-Alder reactie met een gefunctionaliseerd dieen, waardoor een produkt gevormd wordt waarbij alle substituenten aan dezelfde kant van het molecuul terecht komen. Bij de tweede manier moet eerst de dubbele band van carvon verwijderd worden. Dit kan gedaan worden door reductie ($R = H$), of door de geconjugeerde additie van een groep die in het verdere verloop van de synthese gebruikt kan worden. Daarna vindt annelering plaats tot een bicyclisch produkt waarbij

de isopropenylgroep trans ten opzichte van de angulaire methylgroep komt te staan. De chiraliteit van de isopropenylgroep stuurt zo de chiraliteit in de gevormde produkten. Als deze functie is uitgeoefend, moet de isopropenylgroep verwijderd en omgezet worden in een op vele manieren te manipuleren groep. Een carbonylgroep is zo'n groep en de omzetting van de isopropenylgroep in een carbonylgroep is daarom een belangrijk onderwerp van het onderzoek geweest.



Het nut van de chirale tussenprodukten, die via deze basisreacties verkregen zijn, is vervolgens aangetoond door de synthese van een aantal verbindingen met een interessante biologische activiteit. Uit het Diels-Alder produkt 1 is (+)- α -cyperon gesynthetiseerd. Deze verbinding heeft *in vitro* een activiteit tegen de malariaparasiet ($IC_{50} = 5.5 \mu g/ml$). Uit de Robinson anneleringsprodukten 2 zijn onder andere



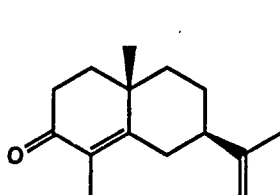
(-)-polygodial, decalol 5 en (-)-Ambrox^R gemaakt. (-)-Polygodial is een bekend insect-antifeedant, dat gebruikt kan worden in de gewasbescherming. Decalol 5 heeft een remmende werking op de cholesterol biosynthese. (-)-Ambrox^R is een commercieel interessante geurstof. Deze verbinding wordt ook nu al op redelijke schaal geproduceerd, maar de syntheseroute met S-(+)-carvon als

uitgangsstof is vanwege de schaarste van het commercieel gebruikte startmateriaal toch interessant.

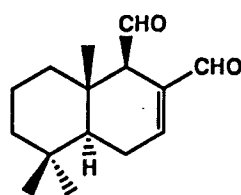
Conclusie

Door dit onderzoek komen derivaten van biologisch actieve verbindingen beschikbaar, zodat een onderzoek naar structuur-activiteit relaties mogelijk wordt. Vaak hebben synthetische derivaten een betere en selectievere werking dan het natuurproduct.

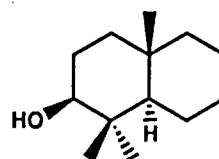
Er is rekening gehouden met de mogelijkheden voor schaalvergroting van de reacties, door gebruik te maken van eenvoudige, goedkope reagentia die ook in bulkhoeveelheden verkrijgbaar zijn, maar de interesse van de industrie voor de verbindingen is ook afhankelijk



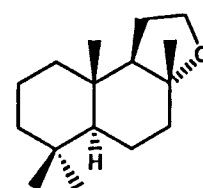
(+)-α-cyperone



(-)-polygodial



5



(-)-Ambrox^R

van factoren die niets met de productiemogelijkheden te maken hebben. Om de aandacht voor S-(+)-carvon als chirale uitgangsstof te vergroten is behalve de synthese van biologisch actieve verbindingen ook de synthese van bekende chirale tussenprodukten van biologisch actieve verbindingen en nieuwe, hoog gefunctionaliseerde chirale verbindingen belangrijk. Door publikatie van de verkregen resultaten zullen meer onderzoeksgroepen attent gemaakt worden op de mogelijkheden van S-(+)-carvon als chirale 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.

6. 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.

Onderzoek naar de toepasbaarheid van
karwij-olie als grondstof voor bioconversies
en de biosynthese van farmaca, gewas-
beschermingsmiddelen en fijnchemicaliën.

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 toepassingsmogelijk-
heden van carvon als chirale uitgangstof
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 (PAGV).
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