



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

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

Project 1810

Rapportage fase II

COLOFON

© 1998 Proefstation voor Bloemisterij en Glasgroente

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

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

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

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

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

Proef 1810

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

Aalsmeer, september 1998



INHOUD

SAMENVATTING	7
1. INLEIDING	9
2. GECOMBINEERD EFFECT VAN ETHERISCHE OLIËN EN CA-CONDITIES ZONDER ZUURSTOF	10
2.1 Inleiding	10
2.2 Materiaal en methoden	10
2.2.1 Pilot experimenten	10
2.2.2 Experimentele opstelling	10
2.3 Resultaten en discussie	12
3. GECOMBINEERD EFFECT VAN ETHERISCHE OLIËN EN CA-CONDITIES MET ZUURSTOF	16
3.1 Inleiding	16
3.2 Materiaal en methoden	16
3.3 Resultaten en discussie	17
4. FYTOTOXICITEIT CONTROLLED ATMOSPHERE	19
4.1 Inleiding	19
4.2 Materiaal en methode	19
4.2.1 Begassingsapparatuur	19
4.2.2 Bloemen	20
4.3 Resultaten en discussie	20
4.3.1 Schadebeeld roos	20
4.3.2 Invloed temperatuur en concentratie	24
4.3.3 Schade bij 40% CO ₂ , 20 °C en vier uur behandeling voor 13 cultivars	25
4.3.4 Kortere tijdsduur of hogere temperatuur	26
4.4 Schadebeeld bij chrysant en lelie	26
4.5 Conclusies over fytoxiciteit van CA-behandelingen	26
5. ONTWIKKELING TESTOPSTELLING	28
5.1 Fytotoxiciteit insecticide oliën op roos, chrysant en lelie	28
5.2 Optimalisatie van verdamping van linalool	29
5.3 Effect van beladingsgraad van containers op gasfase concentratie linalool	30
6. TESTEN VAN EFFECTIVITEIT IN KLEINE POTTEN MET PLANTMATERIAAL	32
7. HAALBAARHEID CA IN GROTERE SYSTEMEN	33
8. TOXICITEIT EN FYTOTOXICITEIT VAN DE COMBINATIE CA MET ETHERISCHE OLIE IN 50 LITER VATEN	36
8.1. Inleiding	36
8.2 Materiaal en methoden	36

8.3 Resultaten en discussie	38
8.3.1 Insecticide-werking	38
9. CONCLUSIE EN AANBEVELINGEN	44
APPENDIX A Bereikte waarden van CA en etherische olie bij experimenten van hoofdstuk 2	45
APPENDIX B Resultaten van alle experimenten uit hoofdstuk 2	47
APPENDIX C Resultaten van alle experimenten uit hoofdstuk 3	56
APPENDIX D Toxicologisch dossier p-Cymeen	62

SAMENVATTING

Na het eerste jaar van het project 'ONTWIKKELING VAN EEN EFFECTIEVE METHODE OM GLASTUINBOUWPRODUCTEN INSECTENVRIJ EN MET VERBETERDE MILIEU- EN PRODUCTKWALITEIT TE KUNNEN EXPORTEREN' is geconcludeerd dat de combinatie van etherische oliën en gewijzigde atmosfeer een verhoogde mortaliteit geeft bij een aantal belangrijke plaaginsecten in bloemisterijproducten. In het tweede jaar is onderzocht wat de optimale combinatie van de oliën en CA-condities is.

Gebruik van CA-condities verhoogt de effectiviteit van etherische olie (hoofdstuk 2 en 3).

De fytotoxiciteit van CA is uitgebreid onderzocht bij roos. Behandelingen bij 5°C waren schadelijker dan bij 20°C. Een langere behandelingsduur en hogere concentraties CO₂ leidden beide tot meer schade bij roos. De schade was cultivar-afhankelijk (hoofdstuk 4).

De etherische oliën worden geabsorbeerd door plantmateriaal. Bij een hoge beladingsgraad van de containers neemt de gasfase-concentratie van etherische olie af (hoofdstuk 5 en 8). Als tengevolge van deze opname van actieve stoffen door plantmateriaal de gasfase-concentratie daalt onder het effectieve niveau, zijn aanpassingen aan het applicatiesysteem noodzakelijk.

Voor een goede synergie tussen Controlled Atmosphere condities en etherische olie is verhoging van de concentratie CO₂ in de atmosfeer voldoende.

Verhoging van de CO₂-concentratie is in korte tijd met eenvoudige middelen te realiseren (hoofdstuk 7).

De mortaliteit van de insecten in een experiment in 50 liter-vaten met product was zeer gering. De gekozen behandelingen: CA met 25% CO₂ en gebruik van linalool en cymeen gaven geen schade aan de bloemen (hoofdstuk 8).

In dit project is aangetoond dat CA-condities de insecticidewerking van etherische oliën vergroot. Dit biologische principe kan de basis vormen voor een te ontwikkelen methode voor insectenbestrijding op sierteeltproducten. Het onderzoek heeft echter op het moment van afronding nog niet geleid tot een voor de praktijk implementeerbare procedure. In vervolgonderzoek zal aandacht besteed moeten worden aan de gevolgen van opschaling op de effectiviteit van de methode.

1. INLEIDING

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

In fase I van het project waren de doelstellingen:

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

In de rapportage over fase I is uitvoerig ingegaan op de resultaten voor de eerste twee doelstellingen (a en b). Geconcludeerd werd dat de beste perspectieven aanwezig zijn in een combinatie van behandeling met etherische oliën en CA (Controlled Atmosphere).

In fase II is het doel te komen tot de beste combinatie van etherische oliën en CA. Deze combinatie wordt tenslotte getoetst in vaten van ca. 50 liter met bloemisterijproducten op effectiviteit en fytotoxiciteit.

Om dit doel te bereiken is een werkplan voor fase II opgesteld (doelstelling c van fase I). Hierin zijn de werkzaamheden gesplitst in zes activiteiten.

- Effect van combinatie van CA met etherische oliën op trips en bladluis;
- Fytotoxiciteit CO₂ op roos gevolgd door testen van de optimale condities op andere producten;
- Ontwikkeling testopstelling voor combinatie van behandeling van bloemen met CA en etherische olie op kleine schaal;
- Testen toxiciteit van de beste combinatie CA en etherische olie in aanwezigheid van plantmateriaal;
- Bepaling van in korte tijd haalbare CA- en etherische olie-condities in 50 liter-vaten met product en de fytotoxiciteit van de combinatie;
- Opschaling van de toxiciteitsproeven van kleine potten naar 50 liter-vaten.

De werkwijze voor deze onderdelen en de resultaten worden in dit verslag beschreven. Het geheel sluit af met een aantal algemene conclusies en aanbevelingen.

2. GECOMBINEERD EFFECT VAN ETHERISCHE OLIËN EN CA-CONDITIES ZONDER ZUURSTOF

2.1 INLEIDING

Uit drie pilot-experimenten die zijn uitgevoerd tijdens fase 1 van het project is geconcludeerd dat een combinatie van Controlled Atmosfere (CA) met etherische olie (linalool) een grotere insecticide-werking heeft op adulten van de Californische trips, *Frankliniella occidentalis*, dan behandelingen die bestaan uit het toedienen van linalool zonder CA of blootstelling van insecten aan CA zonder linalool. Tijdens deze experimenten is in enkele combinaties van CA plus linalool voor tripsadulten een maximale sterfte van 100% bereikt.

In het huidige onderdeel wordt de insecticide-werking van behandelingen die bestaan uit een combinatie van CA van verschillende samenstelling met gelijktijdige toediening van etherische olie verder geëvalueerd. Door voor een lagere dosis van etherische olie te kiezen die rond de LD₅₀ ligt, is het mogelijk het versterkende effect van CA beter te evalueren. Als etherische olie is gekozen voor linalool en cymeen omdat deze twee stoffen een goede doding geven van de toetsinsecten en bovendien niet tot weinig fytoxisch zijn voor roos, chrysant en lelie.

Uit de literatuur is bekend dat de temperatuur bij de blootstelling van insecten aan CA ook van invloed is op de sterfte van deze insecten. In het algemeen neemt bij hogere temperaturen de mortaliteit toe. Door het verhogen van de temperatuur zou de behandelingstijd die nodig is om een effectieve werking te verkrijgen verkort kunnen worden. Om deze reden is het effect van een hogere temperatuur van 25°C in plaats van 20°C tijdens de behandelingen in deze experimenten eveneens bekeken.

Het doel van de huidige experimenten is om na te gaan welke samenstelling van CA in combinatie met twee etherische oliën bij twee verschillende temperaturen de meest effectieve werking bezit.

2.2 MATERIAAL EN METHODEN

2.2.1 Pilot experimenten

De pilot experimenten zijn beschreven in de rapportage van fase 1 van het project.

2.2.2 Experimentele opstelling

Insecten

Alle insecten worden gekweekt in insectenkooien op chrysant bij een temperatuur van 20 tot 24°C en 16 uur fotoperiode. Voor experimenten met trips worden het tweede larvale stadium en adulten van de Californische trips, *Frankliniella occidentalis*, gebruikt. Van de groene perzikluiskruiper, *Myzus persicae*, worden het ongevleugelde adulte of het laatste nimfale stadium getoetst.

Opstelling

In serumflessen met een inhoud van 100 ml worden per fles ongeveer 35 insecten overgebracht. Insecten worden verzameld door de fles af te sluiten met een kurk waarin twee teflon-slangen bevestigd zijn. Via de ene slang wordt lucht aangezogen, waardoor onderdruk in de fles ontstaat. Via de tweede slang worden insecten aangezogen in de fles. Na het verzamelen van de insecten wordt de kurk verwij-

derd en de fles afgesloten met een dop met daarin een rubber septum. In de behandelingen met etherische olie wordt de olie op een ponsje filterpapier (doorsnee 6 mm) gepipetteerd en in de fles gebracht. Bij de experimenten 1 t/m 6 (zie Tabel 2.2) wordt bij de lage concentratie olie 1 μ l van een verdunning van 1:10 van cymeen of linalool in ethanol opgebracht (0,1 μ l olie + 0,9 μ l ethanol). Om een hoge concentratie olie te bereiken wordt 1 μ l cymeen of 1 μ l linalool toegediend, ook hier wordt 0,9 μ l ethanol toegevoegd. Om een eventueel effect van ethanol op de mortaliteit van insecten uit te sluiten, wordt bij de helft van de controle- en CA-behandelingen 0,9 μ l ethanol toegediend. Uit de pilot-experimenten is reeds gebleken dat er geen verschillen in mortaliteit van tripsadulten optraden tussen flessen met of zonder toediening van ethanol. In de experimenten 7 t/m 9 (zie Tabel 2.2) waar de optimale combinatie van cymeen en linalool wordt bepaald, wordt in totaal 10 μ l olie opgebracht in verschillende ratio's. In de experimenten 10 t/m 15 (zie Tabel 2.2), waar een mengsel van linalool en cymeen is toegediend, wordt in totaal 5 μ l olie opgebracht in een ratio van 1:4 van cymeen:linalool.

Na afsluiten van de flessen wordt de CA aangebracht. Een injectienaald die is aangesloten op een slang wordt door het septum van de fles gestoken. De te testen atmosfeer wordt door middel van de slang in de fles gebracht. De samenstelling van de CA kan worden geregeld door middel van een mengpaneel waarbij de afzonderlijke stroomsnelheden van CO₂, O₂ en N₂ worden ingesteld. Na menging wordt de lucht bevochtigd door het gas door water te laten borrelen. Een lange naald (5 cm) zorgt ervoor dat de atmosfeer zich gelijkmatig in de fles kan verdelen. Een tweede injectienaald in het septum zorgt voor de doorstroom van de test-atmosfeer in de fles en de afvoer van gas uit de fles. De totale stroomsnelheid bedraagt 100 ml per minuut. Flessen worden geflushed gedurende 8 minuten. Aan het einde van de flushtijd worden de naalden uit het septum gehaald en de fles gedurende twee uur bewaard bij 20 °C of 25 °C. Aan het einde van de behandelingstijd wordt de gassamenstelling en de hoeveelheid etherische olie in de flessen geanalyseerd met behulp van een gaschromatograaf. Na het opheffen van de CA worden de insecten gecontroleerd op mobiliteit. Actieve insecten worden geteld en verwijderd, immobiele insecten worden overgebracht naar glazen petrischalen die afgesloten worden met parafilm. In elke petrischaal wordt een stukje vochtig filtreerpapier gedaan om de luchtvochtigheid hoog te houden en een stukje blad als voeding voor de insecten. Na een periode van een uur worden de insecten nogmaals gecontroleerd op activiteit en na 24 uur worden de insecten die na aanraken niet bewegen, geteld als dode insecten.

Tabel 2.1 - Proefopzet van het experiment met een combinatie van CA en etherische olie

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

* Nummer van de flessen; in totaal 30 flessen per experiment

Proefopzet en schema van de experimenten

De samenstelling van de CA's en de opzet voor elk experiment wordt weergegeven in Tabel 2.1. In Tabel 2.2 wordt het schema weergegeven volgens welke de experimenten worden uitgevoerd. Elke combinatie van CA en olie wordt uitgevoerd met de drie toetsinsecten, tripslarve, tripsadult en groene perzikluis. In experimenten 1 t/m 3 wordt linalool als etherische olie getoetst onder CA-condities en 4 t/m 6 bestaan uit het toetsen van cymeen. Vervolgens wordt in experimenten 7 t/m 9 het meest optimale mengsel van cymeen en linalool vastgesteld onder normale atmosferische omstandigheden. Dit mengsel wordt vervolgens in experimenten 10 t/m 12 getoetst onder CA-condities. Nummers 1 t/m 12 worden uitgevoerd bij een temperatuur van 20 °C. Experiment 13 t/m 15 worden uitgevoerd bij 25 °C.

Tabel 2.2 - Schema van de experimenten met combinaties van CA en etherische olie

Insect	Behandeling en experimentnummer				
	CA + linalool 20 °C	CA + cymeen 20 °C	cymeen + linalool 20 °C	CA + mengsel 20 °C	CA + mengsel 25 °C
Californische trips - larve	1	4	7	10	13
Californische trips - adult	2	5	8	11	14
Groene perzikluis	3	6	9	12	15

2.3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

De gassamenstelling van de verschillende CA's die is bereikt gedurende alle experimenten en de concentraties van cymeen en linalool in de atmosfeer zijn samen-gevat in Tabel 2.3 en 2.4. De ruwe gegevens, die zijn gebruikt voor het samenstellen van deze tabellen staan vermeld in appendix A. Bij de instelling van een aantal atmosferen is een te hoge O₂-concentratie gevonden (1,8-4,5%), deze zijn niet meegenomen bij de samenstelling van Tabel 2.3. Deze gegevens zijn eveneens te vinden in Appendix A.

Tabel 2.3 - Ingestelde en bereikte waarden van de CA

Ingestelde waarden			bereikte waarden ^a		
% CO ₂	% N ₂	%O ₂	% CO ₂	% N ₂	%O ₂
0	100	0	0,0 - 0,1	99 - 100	<0,15
20	80	0	11 - 20	81 - 89	<0,06
50	50	0	43 - 53	47 - 57	<0,29
100	0	0	90 - 100	0 - 10	<0,36
0	79	21	-	-	-

^a Minimale en maximale waarden

Tabel 2.4 - Gemeten concentraties van cymeen en linalool

	gemeten concentratie etherische olie ^a	
	hoeveelheid opgebracht	concentratie (µg/l)
cymeen	laag (0,1 µl)	4 - 36
	hoog (1 µl)	46 - 108
linalool	laag (0,1 µl)	28 - 63
	hoog (1 µl)	79 - 150
mengsel (totaal 5 µl) ratio cymeen/linalool; 1:4	{ cymeen (1 µl)	45 - 101
	{ linalool (4 µl)	43 - 113

^a Minimale en maximale waarden

In appendix B staan de resultaten vermeld van alle vijftien experimenten. Omdat het in alle gevallen steeds gaat om twee herhalingen per behandeling kan er weinig gezegd worden over statistisch significante verschillen tussen mortaliteitgegevens. Om toch enig overzicht te verkrijgen en eventuele trends aan te kunnen geven, is besloten om enkele belangrijke gegevens uit de experimenten te verzamelen en samen te vatten in een tabel. Daartoe is steeds per experiment bepaald wat de maximale sterfte is, en wordt de atmosfeer vermeld waarbij deze maximale sterfte is bereikt. Verder wordt in de tabel ook de maximale sterfte vermeld die wordt bereikt na blootstelling van de insecten aan CA zonder toediening van etherisch olie of etherische olie zonder aanbrengen van een CA. Al deze gegevens zijn samengevat in Tabel 2.5

Er kan worden geconcludeerd dat een combinatie van CA + etherische olie in het algemeen effectiever is in het doden van insecten dan een CA- of een etherische olie-behandeling; in experimenten 1 t/m 6 wordt in alle gevallen, met uitzondering van experiment 4, de maximale sterfte bereikt bij een combinatie van CA en een hoge etherische olie-concentratie (zie appendix B).

In twee gevallen wordt het beste resultaat verkregen met een atmosfeer bestaande uit 100% CO₂, maar een eenduidige uitspraak over de meest werkzame CA kan niet worden gedaan.

Verder blijkt uit de samengevatte resultaten dat er een verschil bestaat in de gevoeligheid van verschillende insecten en stadia voor de behandelingen. De hoogste sterfte wordt bereikt bij adulten van *F. occidentalis*; linalool in combinatie met CA geeft een maximum sterfte van 78,3% en voor cymeen + CA bedraagt de mortaliteit maximaal 92,8%. Bij larven van *F. occidentalis* is er een groot verschil in de werking van cymeen en linalool; voor larven bedraagt de maximumsterfte bij linalool en cymeen in combinatie met CA respectievelijk 71,7% en 27,2%. *M. persicae* is het minst gevoelig voor de behandelingen; de maximumsterftes bij linalool en cymeen in combinatie met CA zijn respectievelijk 28,5% en 35,7%.

Tabel 2.5 - Samenvatting van gegevens uit de experimenten 1 t/m 15

Nr.	Insect	Maximum mortaliteit (%)			
		CA + eth.olie	bij CA van:	Alleen CA	Alleen olie
1 (lin)	<i>F.occidentalis</i> larve	71,7	100% CO ₂	12,5	10,9
2 (lin)	<i>F.occidentalis</i> adult	78,3	100% N ₂	8,7	23,3
3 (lin)	<i>Myzus persicae</i>	28,5	50% CO ₂	15,7	17,8
4 (cym)	<i>F.occidentalis</i> larve	27,2	gewone atm.	5,3	27,2
5 (cym)	<i>F.occidentalis</i> adult	92,8	100% CO ₂	30,5	53,3
6 (cym)	<i>Myzus persicae</i>	35,7	CO ₂ /N ₂ /O ₂ 88%/8%/4%	35,7	24,9
7 (c/l)	<i>F.occidentalis</i> larve	42,6		n.v.t	
8 (c/l)	<i>F.occidentalis</i> adult	36,7 85,7		n.v.t n.v.t	
9 (c/l)	<i>Myzus persicae</i>	100		n.v.t	
10	<i>F.occidentalis</i> larve	13,1 (lin)	50% CO ₂	5,0	9,4
11	<i>F.occidentalis</i> adult	96,7 (c/l)	100% CO ₂	9,5	15,0
12	<i>Myzus persicae</i>	57,9 (c/l)	20% CO ₂	14,1	24,4
13	<i>F.occidentalis</i> larve	74,7 (c/l)	100% CO ₂	8,1	6,6
14	<i>F.occidentalis</i> adult	100 (c/l)	20% CO ₂	21,9	50,1
15	<i>Myzus persicae</i>	97,9 (c/l)	100% CO ₂	83,0	40,6

De experimenten 7 t/m 9 werden uitgevoerd om te bepalen welke verhouding van cymeen:linalool de meest effectieve werking geeft. Bij analyse van de atmosfeer bleek echter dat er weinig verschil bestond in de concentraties cymeen en linalool wanneer deze werden toegediend in ratio's vanaf 2:8, 3:7 etc. tot en met 8:2 (in totaal werd steeds 10 µl opgebracht van het mengsel cymeen:linalool in verschillende ratio's). Bij toediening van toenemende hoeveelheid olie van 0 tot 10 µl, in stapjes van 1 µl, werd de maximale dampspanning van de afzonderlijke componenten cymeen en linalool snel bereikt, zodat een hogere toediening geen of weinig verhoging van de concentratie etherische olie in de dampfase tot gevolg had. In de experimenten 7 t/m 9 kon voor cymeen een maximum concentratie van 107 µl bereikt worden en voor linalool 78 µl (appendix A), vergelijkbaar met de maximaal realiseerbare concentraties in alle andere experimenten. In experiment 7 werd bij *F. occidentalis*-larven de hoogste sterfte bereikt bij een ratio van cymeen:linalool, 8:2. In experiment 8a werd bij de eerste uitvoering een lage sterfte van *F. occidentalis*-adulten gevonden, deze lag veel lager dan op grond van eerdere experimenten (rapportage fase 1) werd verwacht. Om deze reden is dit experiment herhaald (8b). In experiment 8a werd een maximumsterfte (bij een ratio van cymeen:linalool; 8:2) gevonden van 36,7% en in het tweede experiment bedroeg de sterfte 85,7%. De cymeen:linalool-concentratie die deze sterfte veroorzaakte bedroeg in het eerste

experiment 35 $\mu\text{g/l}$ cymeen: 29 $\mu\text{g/l}$ linalool en in het tweede 22 $\mu\text{g/l}$ cymeen: 4 $\mu\text{g/l}$ linalool. Het verschil dat optrad in sterfte kan dus niet verklaard worden door de concentraties etherische olie. Een andere reden kan zijn dat er een fout is opgetreden bij het meten van de concentraties in experiment 8a; deze waarden liggen alle veel lager dan in alle andere experimenten. De maximumsterfte van *M. persicae* in experiment 9 bedraagt 100%. Dit is aan de hoge kant en waarschijnlijk gevolg van het feit dat de kweek op dat moment slecht liep (wintermaanden). Er is naar gestreefd om in vervolggelaxperimenten voor een zo laag mogelijke concentratie cymeen te kiezen, omdat deze stof fytoxische effecten geeft. Voor vervolggelaxperimenten is gekozen voor een lage ratio van cymeen:linalool van 1:4; er is dan een minimum hoeveelheid van het cymeen aanwezig voor insecticidewerking in combinatie met een maximum hoeveelheid linalool, die een lage fytoxiciteit vertoont.

Bij experimenten 10 t/m 15 wordt gevonden dat het mengsel van cymeen:linalool werkzamer is dan linalool. In vijf van de zes gevallen wordt de hoogste sterfte bereikt bij het mengsel in combinatie met CA. Experiment 10 wijkt hiervan af; hier wordt in alle gevallen een lage sterfte bereikt. In dit experiment wordt een maximumsterfte van 15,0% bereikt bij gebruik van linalool + CA en bij het mengsel + CA wordt een iets lagere sterfte van 10,9% gevonden. Bij deze experimenten is meer olie toegediend dan bij experimenten 1 t/m 6 om een hogere concentratie olie in de atmosfeer te kunnen realiseren: er is 5 μl van een mengsel van cymeen:linalool (1:4) opgebracht. Als extra controle is een behandeling van 5 μl linalool getoetst. Uit analyse van de atmosfeer blijkt echter dat een verhoging van hoeveelheid opgebrachte olie niet leidt tot een verhoging van de concentratie in de atmosfeer; blijkbaar wordt bij toediening van 1 μl olie reeds een maximum concentratie in de atmosfeer bereikt.

Experimenten 13 t/m 15 zijn uitgevoerd om het effect van temperatuurverhoging op de behandelingen te kunnen evalueren. Bij een hogere temperatuur van 25°C wordt er voor alle insecten een hogere sterfte gevonden dan bij 20°C. Deze toename is naar verhouding het grootst voor larven van *F. occidentalis* en *M. persicae*. De maximumsterfte van adulten van *F. occidentalis* is reeds hoog (96,7%) bij 20°C, dus een verdere verhoging heeft in verhouding weinig effect.

Opmerking: Er worden grote verschillen tussen experimenten gevonden. Als voorbeeld kan genoemd worden dat in experiment 1 bij larven van *F. occidentalis* een maximumsterfte wordt bereikt van 71,7%. Deze waarde wordt gerealiseerd bij toediening van 1 μl linalool (deze hoeveelheid geeft een concentratie van 142 $\mu\text{g/l}$ in de atmosfeer) in combinatie met 100% CO₂. Vergelijk dit met experiment 10, waar toediening van 5 μl linalool (concentratie van 88 $\mu\text{g/l}$) een sterfte geeft van 15,0%. Dit grote verschil in sterfte kan mogelijk verklaard worden door de factor tijd; de experimenten zijn uitgevoerd in verschillende tijden van het jaar. Experiment 1 werd uitgevoerd begin september terwijl experiment 10 in februari werd gedaan. Het is bekend dat het jaargetijde van invloed kan zijn op de fitness van insecten, en daarmee ook de gevoeligheid voor bepaalde insecticide-behandelingen. In de wintermaanden deden de insectenkweken het in het algemeen wat slechter; dit kan tot uitdrukking komen in een toegenomen gevoeligheid voor insecticide-behandelingen.

3. GECOMBINEERD EFFECT VAN ETHERISCHE OLIËN EN CA-CONDITIES MET ZUURSTOF

3.1 INLEIDING

In voorgaande experimenten is gevonden dat een CA bestaande uit 100% N₂ of een CA met een verhoogde CO₂-concentratie in combinatie met etherische olie in het algemeen een hogere sterfte geeft dan een behandeling bestaande uit etherische olie of CA. In fytotoxiciteitsexperimenten (zie hoofdstuk 5) is gevonden dat bij een CO₂-concentratie van 40% of hoger fytotoxiciteit een rol gaat spelen. Daarom moet in de praktijk voor een lagere CO₂-concentratie gekozen worden. Daarnaast is in pilot-experimenten (hoofdstuk 7) vastgesteld dat, indien de O₂ verwijderd moet worden door middel van flushen met een 100% N₂-atmosfeer, onder praktijkomstandigheden CA's met 0% O₂ slecht haalbaar zullen zijn. De maximale flush-tijd zal de beperkende factor zijn; bij praktisch haalbare flushtijden (10 tot 20 minuten) zal naar verwachting door gasuitwisseling nog steeds 1% of meer O₂ in de container achterblijven. Om bovenstaande reden wordt in de huidige experimenten het effect van aanwezigheid van O₂ op de behandeling geevalueerd. Er worden daartoe CA's getoetst met variabele O₂-concentraties. Daarnaast bevat de CA een constante concentratie CO₂ van ongeveer 35%, waarvan is aangetoond dat deze in combinatie met etherische olie een verhoogde insecticide-activiteit geeft, maar die eveneens laag genoeg is zodat minimale fytotoxiciteit zal optreden. Het laatste experiment in deze serie is uitgevoerd om te bepalen of de concentratie CO₂ nog verder verlaagd kan worden, zodat de kans dat fytotoxiciteit optreedt nog verder verkleind wordt.

3.2 MATERIAAL EN METHODEN

Proefopzet en schema van de experimenten

De proefopstelling is voor het merendeel gelijk aan de opstelling bij de experimenten van hoofdstuk 2. In 1 en 2 (zie appendix C), die uitgevoerd zijn op het ATO, is de samenstelling van de gewenste atmosfeer geregeld zoals bij experimenten beschreven in hoofdstuk 2; door middel van een mengpaneel kunnen de afzonderlijke stroomsnelheden van CO₂, O₂ en N₂ worden ingesteld. Bij de experimenten die op het PBG zijn uitgevoerd (experimenten 3 t/m 6) wordt de gewenste atmosfeer verkregen door een combinatie van flushen met N₂ en het vervolgens injecteren van lucht en/of CO₂ in de fles door middel van een injectiespuit, zodat de gewenste samenstelling van de CA wordt bereikt.

Bij de samenstelling van de CA's is gekozen voor O₂-concentraties van 0, 2, 10 en 20% en CO₂-concentraties van 0 en 35%. In het laatste experiment van dit onderdeel zijn CO₂-concentraties van 10, 20 en 35% getoetst.

Het mengsel van etherische olie wordt op een ponsje filterpapier (doorsnee 6 mm) gepipetteerd en in de fles gebracht. In alle experimenten wordt per fles 5 µl van een mengsel van cyneen:linalool gebruikt (ratio 1:4). Alle experimenten zijn uitgevoerd bij 20°C en de behandelingsduur is twee of vier uur. Voor statistische verwerking is gebruik gemaakt van genstat (GLM; P ≤ 0,05).

3.3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

De resultaten van de zes experimenten staan vermeld in appendix C en zullen per experiment worden besproken. Bij elk experiment wordt de gassenstelling van de verschillende CA's en de concentraties van cymeen en linalool in de atmosfeer (indien gemeten) en de resultaten wat betreft de mortaliteit van de insecten vermeld.

In het eerste experiment werd gekozen voor O₂-concentraties van 0, 2, 10 en 20% en CO₂-concentraties van 0 en 35%. Tijdens een behandelingsduur van twee uur bij 20°C werd een maximale sterfte van 24,6% van tripslarven bereikt bij een atmosfeer van 10% O₂:35% CO₂:55% N₂ in combinatie met etherische olie. De sterfte in behandelingen met olie is significant hoger dan in behandelingen zonder olie. Wanneer naar het effect van O₂ of CO₂ wordt gekeken kan worden geconcludeerd dat CA's met 35% CO₂ een betere insecticide-werking vertonen dan CA's met 0% CO₂ en dat er geen effect is van O₂ (GLM; $P \leq 0,05$). Er moet opgemerkt worden dat de sterfte in dit experiment erg laag is, hierdoor komen de verschillen tussen behandelingen niet goed naar voren. Om deze reden is in een volgend experiment met tripslarven gekozen voor dezelfde behandelingen bij een behandelingstijd van vier uur om de effectiviteit van de verschillende behandelingen beter met elkaar te kunnen vergelijken.

Verder blijkt uit dit experiment en enkele niet getoonde experimenten dat er weinig verschil in sterfte bestaat bij hogere O₂-concentraties van 10 of 20%. Daarom is in alle volgende experimenten steeds gekozen voor één hoge O₂-concentratie van 10%.

In het tweede experiment werd gekozen voor O₂-concentraties van 0, 2 en 10% en CO₂ concentraties van 0 en 35%. Tijdens een behandelingsduur van twee uur bij 20°C werd een maximale sterfte van 92,6% van tripsadulten bereikt bij een atmosfeer van 0% O₂:35% CO₂:65% N₂ in combinatie met etherische olie. De atmosferen met 0% O₂ (al dan niet in combinatie met 35% CO₂) veroorzaken de hoogste mortaliteit bij tripsadulten. Enkele gewenste instellingen zijn in dit experiment niet bereikt, zodat goede vergelijkingen niet kunnen worden gemaakt. Om deze reden is dit experiment herhaald (Experiment 3).

Het derde experiment is een herhaling van Experiment 2. Het verschil is dat de instellingen van de CA worden bereikt door middel van een combinatie van flushen met N₂ en injecteren van lucht en/of CO₂ in de fles met een injectiespuit. Alle instellingen van de CA zijn op deze manier goed te realiseren. De concentraties etherische olie in de atmosfeer zijn niet bepaald; uit voorgaande experimenten blijkt dat de olie-concentraties bij verschillende experimenten goed reproduceerbaar zijn en altijd ongeveer dezelfde waarden worden bereikt.

Bij alle CA's in combinatie met etherische olie wordt een significant hogere sterfte bereikt dan bij CA's zonder etherische olie (GLM; $P \leq 0,05$). Tijdens een behandelingsduur van twee uur bij 20°C werd bij tripsadulten een maximale sterfte van 98,1% bereikt bij een CA van 10% O₂:35% CO₂:55% N₂ in combinatie met etherische olie. De significant hoogste sterfte werd bereikt bij de volgende CA's: 0% O₂:0% CO₂:100% N₂, 0% O₂:35% CO₂:65% N₂ en 10% O₂:35% CO₂:55% N₂. Bij deze CA's varieert de sterfte van 92,4 tot 98,1%. Een atmosfeer van 2% O₂:35% CO₂:63% N₂ veroorzaakt een significant lagere mortaliteit; bij deze CA wordt een sterfte gemeten van 79,7%. De laagste mortaliteit wordt bereikt bij een atmosfeer van 2 of 10% O₂ zonder CO₂. In deze gevallen worden sterftes gevonden van respectievelijk 44,5 en 32,5%. Concluderend kan worden gezegd dat het bijmengen van CO₂ bij atmosferen zonder O₂ weinig effect heeft op de mortaliteit van tripsadulten. Is daarentegen 2 of 10% O₂ in de CA aanwezig, dan geeft het bij-

mengen van 35% CO₂ een significant hogere sterfte. Een effect van O₂-concentratie is ook aanwezig; wanneer CA's met 35% CO₂ in combinatie met etherische olie in beschouwing worden genomen blijkt dat bij 0 en 10% O₂ een significant hogere sterfte wordt bereikt dan bij 2% O₂.

In de Experimenten 4 en 5 werd dezelfde opstelling gebruikt als in Experiment 3. In Experiment 4 werden Californische tripslarven gebruikt en in Experiment 5 groene perzikluizen. Uit Experiment 1 is gebleken dat sterfte van tripslarven erg laag is, hierdoor kwamen de verschillen tussen behandelingen niet goed naar voren. Omdat het larvale stadium van trips en groene perzikluis minder gevoelig zijn voor de behandelingen dan tripsadulten wordt gekozen voor een behandelingstijd van vier uur bij 20°C om het effect van verschillende CA's beter te kunnen beoordelen. Bij tripslarven wordt bij alle CA's in combinatie met etherische olie een significant hogere sterfte bereikt dan bij CA's zonder etherische olie (GLM; $P \leq 0,05$). De hoogste sterfte van 75,8% wordt bereikt bij een CA van 0% O₂:35% CO₂:65% N₂ in combinatie met etherische olie. Een CA bestaande uit 100% N₂ en een CA van 10% O₂:35% CO₂:65% N₂ geven een significant lagere sterfte; bij deze CA's worden respectievelijk sterftes gemeten van 57,8 en 58,7%. CA's met 2% O₂, al dan niet in combinatie met 35% CO₂, geven een nog lagere mortaliteit te zien van respectievelijk 27,2 en 30,4%. en de laagste mortaliteit van slechts 7,1% wordt bereikt bij een atmosfeer van 10% O₂ zonder CO₂.

Concluderend kan worden gezegd dat indien alleen CA's met 35% CO₂ en olie in beschouwing worden genomen er bij een O₂-concentratie van 0% de hoogste sterfte van tripslarven wordt bereikt, gevolgd door een wat lagere sterfte bij 10% O₂ en dat CA's met 2% O₂ het minst werkzaam zijn.

Bij de groene perzikluis wordt eveneens bij alle CA's in combinatie met etherische olie een hogere sterfte bereikt dan bij CA's zonder etherische olie. Bij dit insect worden opvallend hoge mortaliteitspercentages gevonden in behandelingen met CA zonder toediening van olie, met uitzondering van de CA bestaande uit 10% O₂:0% CO₂:90% N₂ die als enige CA een zeer lage sterfte geeft. Deze CA is echter qua insecticide-werking door zijn hoge percentage O₂ en afwezigheid van CO₂ te vergelijken met de normale atmosferische samenstelling. De hogere gevoeligheid van de perzikluis voor CA-behandelingen is reeds eerder naar voren gekomen bij Experiment 15 van hoofdstuk 2. Er werd bij 25°C en een behandelingsduur van twee uur eveneens hogere sterftepercentages gevonden; de mortaliteit bij CA-behandelingen zonder olie varieerden van 12, 8 tot 83,0%.

In Experiment 6 werd bepaald of de CO₂-concentratie verder verlaagd kan worden zonder dat de insecticidewerking verloren gaat. De effecten kunnen gescheiden worden in CO₂- en O₂-effect. Wordt gekeken naar het effect van CO₂-concentratie, dan kan worden geconcludeerd dat een CA met 20% CO₂ effectiever is in het doden van tripsadulten dan CA's met 10% of 35%. Wordt er naar het effect van de O₂-concentratie gekeken, dan blijkt dat bij CA's met 0% en 10% O₂ een hogere sterfte optreedt van tripsadulten dan bij CA's met 2% O₂.

4. FYTOTOXICITEIT CONTROLLED ATMOSPHERE

4.1 INLEIDING

Een belangrijke voorwaarde voor het gebruik van CA-condities in combinatie met etherische oliën als desinfectiemethode is dat de toegepaste behandeling niet schadelijk mag zijn. Over de schadelijkheid van CA-condities op bloemen is relatief weinig bekend (Rapport fase I - §2.6). In het project is nagegaan of CA-condities fytotoxisch zijn voor roos. Daarnaast is oriënterend gekeken naar chrysant en lelie. Verwacht mag worden dat het ontstaan van schade afhankelijk is van de gebruikte CA-condities, duur van de CA-behandeling en de temperatuur.

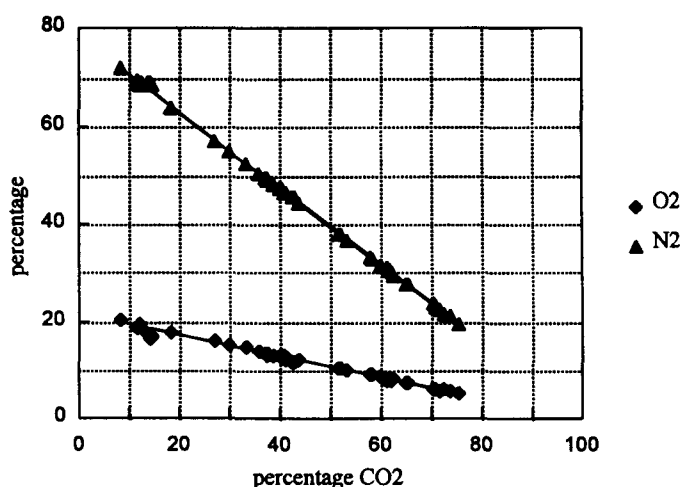
Voor de desinfectiebehandeling wordt ten opzichte van normale lucht de CO₂-concentratie verhoogd en de O₂-concentratie verlaagd. Deze veranderingen kunnen onafhankelijk van elkaar worden toegepast, mits de installatie hiervoor geschikt is. Vanuit praktische overwegingen is in het project gekeken naar het effect van verhoging van CO₂, zonder toevoeging of verwijdering van O₂. Hierdoor nemen de percentages O₂ en N₂ in de CA-condities evenredig af met de verhoging van het percentage CO₂. Er is niet onderzocht of het verwijderen van O₂ voordat de CO₂-concentratie werd verhoogd nog een gunstig effect zou hebben. Op de praktische haalbaarheid van verschillende CA-condities wordt in hoofdstuk 6 ingegaan.

4.2 MATERIAAL EN METHODE

4.2.1 Begassingsapparatuur

Voor het creëren van CA-condities zijn drie vaten van 50 liter beschikbaar. Deze zijn van kunststof met deksel. Als de vaten zijn gesloten is er vrijwel geen CO₂-uitwisseling met de buitenlucht (minder dan 0,1% per uur). In de wanden van de vaten is een in- en uitblaas opening aanwezig. De inblaasopening kan worden aangesloten op een CO₂-cilinder van waaruit 99,7% CO₂ in het vat wordt geblazen. Tussen de CO₂-cilinder en het CA-vat zit een flowmeter voor het regelen van de hoeveelheid CO₂ die per minuut in het CA-vat wordt geblazen. De toevoer van CO₂ bevindt zich onder in het CA-vat in de vorm van een buis met kleine gaatjes. CO₂ heeft een hoger soortelijk gewicht dan O₂ en N₂ en vermengt aanvankelijk slecht hiermee, maar blijft onder in het CA-vat. In elk CA-vat staat een ventilator. Deze zorgt ervoor dat binnen enkele minuten na afsluiten van de CO₂-toevoer en inschakelen van de ventilator een homogene gas-samenstelling ontstaat in het vat.

Na toevoer van CO₂ en het mengen van de atmosfeer werd met een GC (HP5890 series II) de luchtsamenstelling geanalyseerd.



Figuur 4.1 Relatie O₂ en N₂ met het percentage CO₂ in fytotoxiciteits-experimenten

In alle experimenten is 99,7 % CO₂ gebruikt om een gewenst niveau CO₂ in de gewijzigde atmosfeer te krijgen. Hier-door veranderde het percentage O₂ (Figuur 4.1), waarvoor niet is gecompenseerd.

4.2.2 Bloemen

De rozen zijn afkomstig van eigen teelten op het proefstation. De chrysanten en lelies zijn betrokken van groothandel Cultra. De bloemen zijn vier uur voorgewaterd bij de temperatuur die tijdens CA-condities gebruikt is. Als de bloemen een langere periode bewaard moesten worden zijn ze bij 5°C op water gezet en vier uur voor de CA-behandeling bij de gewenste temperatuur van behandeling geplaatst. In de experimenten is zoveel mogelijk gewerkt met vijftien bloemen per cultivar per behandeling.

In alle experimenten is een controle-partij meegenomen die geen CA-behandeling kreeg, maar wel droog lag en gelijk met de CA-behandelde bloemen op de vaas is gezet.

In een aantal experimenten is het bosgewicht voor en na de CA-behandeling bepaald.

Bij de CA-behandeling stonden de bloemen droog in de cilinder. Na de behandeling is een stukje van de stengel afgehaald en zijn de bloemen per stuk in een vaas gezet in de uitbloeiruimte bij 20°C, 60% r.v. en 12 uren licht/ 12 uren donker. In een aantal experimenten zijn vaasgewicht en takgewicht gemeten.

Elke dag is er visueel beoordeeld. In de meeste proeven is niet gekeken naar het uiteindelijke vaasleven, omdat de proeven wegens ruimtegebrek eerder zijn beëindigd. Een overzicht van alle experimenten staat in Tabel 4.1.

4.3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

4.3.1 Schadebeeld roos

In experimenten G1, G2 en G3 is nagegaan of er visuele schade optrad bij roos. Bij een langere behandeling en hoge concentratie werden de volgende symptomen gezien:

- * blauwe randjes op de bloemblaadjes, gevolgd door volledige blauwverkleuring van de bloemknop en het bruin worden van het blauwgekleurde deel en tenslotte verdroging;
- * kleinere diameter van de openkomende bloem;
- * bruine vlekken op het blad;
- * dof-kleuring van het blad, gevolgd door vergeling, verdroging en afvallen van blad.

De control-partijen vertoonden in geen van de uitgevoerde experimenten bijzondere schade.

Duidelijk is dat een verhoogde concentratie CO₂ in combinatie met een lagere concentratie O₂ schadelijk kan zijn voor de kwaliteit van de rozen.

Tabel 4.1 - Overzicht van de proeven

Proef	Inzetdatum	Gewas	Cultivar	Temperatuur in °C	Duur in uren	Gewenst % CO ₂	Gemeten % CO ₂
G1	28-8-97	Roos	Pareo	5	1, 2 en 3	50	46 - 53
G2	2-9-97	Roos	Kiss	5	2, 4, 6 en 17	70	70 - 72
G3	3-9-97	Roos	Gabriëlla	5	24, 48 en 72	70	62 - 68
G7	15-9-97	Roos	Gabriëlla Kiss	5	17, 20,5 en 24	10	11-12
G12	24-9-97	Roos	Gabriëlla Kiss	20	17, 20,5 en 24	10	13-14
G6	10-9-97	Roos	Gabriëlla Kiss	5	17, 20,5 en 24	40	41-45
G10	22-9-97	Roos	Gabriëlla Kiss	20	17, 20,5 en 24	40	47-50
G4	8-9-97	Roos	Gabriëlla Kiss	5	17, 20,5 en 24	70	69-72
G9	17-9-97	Roos	Gabriëlla Kiss	20	17, 20,5 en 24	70	72-80
G5	9-9-97	Roos	Prophyta Souvenir	5	17, 20,5 en 24	70	70-73
G8	16-9-97	Roos	Prophyta Souvenir	20	17, 20,5 en 24	70	75-78
G11	23-9-97	Roos	Lambada Souvenir	20	2, 6 en 24	70	73-76

Tabel 4.1 - Overzicht van de proeven

Proef	Inzetdatum	Gewas	Cultivar	Temperatuur in °C	Duur in uren	Gewenst % CO ₂	Gemeten % CO ₂							
G13	30-9-97	Roos	Gabriëlla	20	4	40	40-43							
			Kiss											
			Lambada											
			Pareo											
			Prophyta											
Souvenir														
G14	2-10-97	Roos	Charmilla	20	4	40	37-43							
			First Red											
			Frisco											
			Madelon											
			Sacha											
			Sonia											
m1	16-12-97	Roos	Ambiance	20	4	40	52-54							
			Gabriëlla											
			Kiss											
			Lambada											
			Pareo											
			Prophyta											
			Souvenir											
			a1					16-2-98	Roos	Gabriëlla	20	2, 3 en 4	40	51-54
										Souvenir				
			a2					17-2-98	Roos	Gabriëlla	5, 20 en 25	4	40	55-60
Souvenir														
G15a	8-10-97	Chrysant	Pray Yellow	20	4	40	37-39							
			Reagan White											

Tabel 4.1 - Overzicht van de proeven

Proef	Inzetdatum	Gewas	Cultivar	Temperatuur in °C	Duur in uren	Gewenst % CO ₂	Gemeten % CO ₂
m2	17-12-97	Chryasant	Decola Deliah Europa Mundial Reagan White	20	4	40	47-52
G15b	8-10-97	Lelie	?	20	4	40	37-39
m3	18-12-97	Lelie	Hilda Monte Negro	20	4	40	51-55

4.3.2 Invloed temperatuur en concentratie

In de experimenten G4, 6, 7, 9, 10 en 12 is nagegaan wat de invloed van temperatuur (5 of 20°C) en percentage CO₂ (10, 40 of 70%) is op het optreden van schade bij Gabriëlla en Kiss. De CA-behandelingen zijn uitgevoerd gedurende 17, 20,5 en 24 uur, omdat in experimenten G1, 2 en 3 bij deze tijdsduur zichtbare schade optrad.

Bij Kiss werd binnen zeven dagen na behandelen geen enkele schade waargenomen. Bij Gabriëlla was er wel schade. Bladschade trad meer en eerder op bij een lagere temperatuur en hogere concentratie (Tabel 4.2). De bloemschade trad meer en sneller op bij een hogere temperatuur en concentratie in combinatie met een langere behandelingsduur.

Tabel 4.2 - Tijdstip optreden CO₂ schade bij Gabriëlla.

Bladschade		Concentratie CO ₂		
Temperatuur in °C	Duur in uren	10 %	40 %	70 %
5	17	-	2	3
	20,5	-	2	3
	24	-	2	3
20	17	-	7	5
	20,5	-	7	3
	24	-	7	2
Bloemschade				
Temperatuur in °C	Duur in uren	10 %	40 %	70 %
5	17	-	-	-
	20,5	-	-	3
	24	-	2	3
20	17	-	-	2
	20,5	-	-	2
	24	-	-	2

Tussen Gabriëlla en Kiss kwam een duidelijk verschil in reactie op de CA-behandeling voor. Daarom is bij hoge concentratie en bij 5 en 20 °C nagegaan wat het schadebeeld is bij de cultivars Prophyta en Souvenir (Tabel 4.3). Bij Souvenir werd in proef G5 pas op dag 4 een specifiek schadebeeld waargenomen. Het basale deel van de kroonbladeren, dat normaal wit is, verkleurt bruin. Mogelijk is dit eerder opgetreden, maar was niet als zodanig herkend. In de later uitgevoerde proef G8 werd dit al op de dag na de CA-behandeling vastgesteld. Bij zowel Souvenir als Prophyta trad het schadebeeld in het blad op. Bij Prophyta was opnieuw een temperatuureffect zichtbaar.

Uit deze proeven blijkt dat een behandelingsduur van meer dan 17 uur schadelijk is voor meerdere cultivars. Deze tijdsduur is ook te lang voor de gewenste praktijktoepassing. Daarom is nagegaan of een kortere behandelingsduur schade geeft. Dit is gedaan met Souvenir, in de vorige experimenten een van de kwetsbare cultivars. Daarnaast is ter oriëntatie Lambada gebruikt (Tabel 4.4).

Tabel 4.3 - Tijdstip in dagen voor schade bij Prophyta en Souvenir in experimenten G5 en G8

Bladschade			
Temperatuur in °C	Duur in uren	Prophyta	Souvenir
5	17	3	2
	20,5	3	2
	24	3	2
20	17	5	2
	20,5	5	2
	24	4	2
Bloemschade			
Temperatuur in °C	Duur in uren	Prophyta	Souvenir
5	17	-	<4
	20,5	-	<4
	24	-	<4
20	17	-	1
	20,5	-	1
	24	-	1

Tabel 4.4 - Tijdstip in dagen voor schade bij Souvenir en Lambada in experiment G11 - temperatuur 20 °C en 70 % CO₂

	Duur in uren	Souvenir	Lambada
Bladschade	2	6	10
	6	4	10
	12	3	10
Bloemschade	2	4	-
	6	4	-
	12	4	-

In dit experiment is bij Souvenir te zien dat een kortere behandelingsduur later bladschade toont. De verkleuring van de bloem was ongeacht de behandeling op dag 4 te zien. Lambada had weinig schade.

4.3.3 Schade bij 40% CO₂, 20 °C en vier uur behandeling voor 13 cultivars

In fase I van het onderzoek is geconcludeerd dat een alternatieve behandeling moet passen in de afzetfase bij de exporteur (§ 2.3). Dit kan alleen als de behandeling kortdurend is of gedurende de gehele transportfase in stand kan blijven. Uit de voorgaande proeven is de conclusie te trekken dat een behandeling met meer dan 40% CO₂ niet gedurende een langere periode mogelijk is. In een praktijksituatie zal een behandeling maximaal enige uren mogen duren. Voor een goede insecticide-werking van etherische oliën met CA- wordt er vanuit gegaan dat een hogere temperatuur en een concentratie CO₂ van rond de 40% gunstig zijn. Daarbij is een

hogere producttemperatuur gunstig om minder bladschade te krijgen. Voor bloem- schade is het temperatuur effect bij kortere behandelingen onbekend. In de experi- menten G13, G14 en M1 is gekozen voor een CA-behandeling van 40% CO₂ bij 20 °C gedurende vier uur bij totaal 13 verschillende cultivars. In deze proeven is ook naar langetermijn-effecten gekeken.

In deze proeven trad bij Souvenir schade aan de bloem op zoals eerder beschreven (§ 4.3.2).

Bladschade trad op bij meerdere cultivars: Charmilla (G14), Gabriëlla (M1), Kiss (G13), Madelon (G14), Prophyta (M1), Sonia (G14). Bladschade kwam niet altijd in dezelfde mate voor, maar het verloop van de symptomen is vergelijkbaar, eerst wordt het blad dof, krult aan de randen soms iets op, verkleurt naar geel, ver- droogt en valt af.

Bij Kiss was de bladschade niet te zien in de vorm van dof-kleuring, maar vanaf dag 11 viel wel het blad af. Dat dit eerder niet was waargenomen is het gevolg van het vroegtijdig afbreken van de experimenten.

4.3.4 Kortere tijdsduur of hogere temperatuur

Een behandeling gedurende vier uur bij 40% CO₂ en 20 °C is niet zonder gevolgen voor roos.

In de laatste rozenexperimenten (A1 en A2) is voor Gabriëlla en Souvenir nogmaals getoetst of een kortere behandelingsduur (2 uur) of een nog hogere temperatuur de schade zou beïnvloeden. Ten opzichte van de controle-partijen waren alle behan- delde bloemen korter houdbaar en vertoonden duidelijk bladval of verminderde bloemopening (Tabel 4.5).

4.4 SCHADEBEELD BIJ CHRYSANT EN LELIE

In de experimenten G15a, G15b, M2 en M3 is oriënterend gekeken naar mogelijke schade bij lelie en chrysanter. Bij lelie is geen schade waargenomen, bij chrysanter trad bruinverkleuring van de bladranden op, gevolgd door verdroging. Dit effect was cultivar-afhankelijk. Deze schade trad kort na de CA-behandeling op en verminder- de de sierwaarde.

4.5 CONCLUSIES OVER FYTOTOXICITEIT VAN CA-BEHANDELINGEN

Verhoging van het percentage CO₂ met gelijktijdige verlaging van het percentage O₂ en N₂ als CA-behandeling voor roos en chrysanter geeft gemakkelijk schade. De kans op schade is cultivar-afhankelijk en neemt toe met de concentratie CO₂ en de duur van de behandeling. Behandeling bij 5 °C geeft meer schade dan behandeling bij 20 °C.

Bij roos blijkt schade in het blad pas na enkele dagen tot meer dan twee weken na de behandeling zichtbaar te worden. Schade in het blad heeft tot gevolg dat het vaasleven korter wordt.

Bij chrysanter is de bladschade binnen enkele dagen zichtbaar en vermindert de sierwaarde.

Over de oorzaken van de schade is geen uitsluitsel te geven. De schade is een gevolg van de combinatie van verhoging van CO₂ met gelijktijdige verlaging van O₂ en N₂.

Tabel 4.5 - Tijdstip in dagen voor schade bij Gabriëlla en Souvenir in experimenten A1 en A2

Bladval			
Temperatuur in °C	Duur in uren	Gabriëlla	Souvenir
5	4	13	12
20		-	14
25		15	15
20	2	-	15
	3	-	12
	4	-	12
Bloemschade			
Temperatuur in °C	Duur in uren	Gabriëlla	Souvenir
5	4	16	2
20		16	2
25		16	2
20	2	14	2
	3	14	2
	4	14	2

De bloemschade in de roos in de vorm van verkleuring zou het gevolg kunnen zijn van een veranderde zuurgraad in de cel. De bladschade bij roos lijkt te wijzen op een aantasting van de structuur van de waslaag. Als hypothetische verklaring zou dan gedacht kunnen worden dat aantasting van de structuur van de waslaag gevolgd zou kunnen zijn door een hogere cuticulaire verdamping. Dit zou kunnen leiden tot een lagere waterpotentiaal direct onder de epidermis, wat gevolgd zou kunnen worden door synthese van abscisnezuur (ABA), wat weer zou leiden tot bladval.

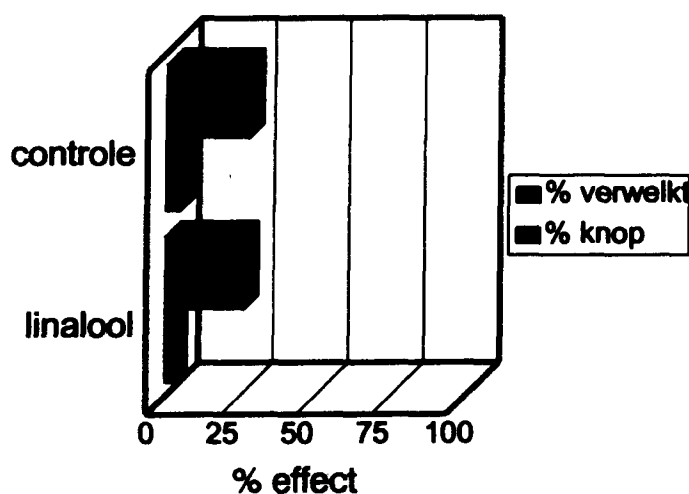
Er is geen vergelijking gemaakt met een door methylbromide begaste partij. Wit & Van de Vrie (1985) vonden dat de bloemen van Mercedes en Motrea niet openkwamen na begassing. Omdat zij geen melding maken van een onbehandelde controle is niet na te gaan of dit effect aan methylbromide moet worden toegeschreven of aan andere omstandigheden tijdens de proef, zoals droge bewaring. Tegenover de optredende schade moet een duidelijk positief effect van de insecticide-werking van CA en etherische oliën staan, wil deze schade acceptabel zijn bij de export van bloemen.

5. ONTWIKKELING TESTOPSTELLING

Voor het testen van de combinatie van etherische oliën en CA-condities op plantmateriaal diende nog nader onderzoek plaats te vinden naar de fytotoxiciteit van de gebruikte olie en naar de relatie tussen de hoeveelheid product in een vat en de resterende concentratie olie in de gasfase. De resultaten van de experimenten voor dit onderdeel worden in dit hoofdstuk beschreven.

5.1 FYTOTOXICITEIT INSECTICIDE OLIËN OP ROOS, CHRYSANT EN LELIE

In de rapportage van fase I van het project is aangetoond dat linalool tot een concentratie van 210 $\mu\text{g/L}$ geen fytotoxische effecten heeft op rozen (c.v. First Red). De fytotoxische effecten van linalool zijn verder geanalyseerd op lelie en chrysanth (zie Figuur 5.1 en Tabel 5.2).



Figuur 5.1 - Effect van linalool behandeling van lilies (cv Casa Blanca, standaard voorbehandeld) op vaasleven. De lilies (10 stelen per object) zijn na 16 dagen (18°C, 60% RV, 12 uur licht - 12 uur donker) beoordeeld op bloemverwelking en bloemopening.

Vervolgens is de fytotoxiciteit van carvon en *p*-cymeen bestudeerd bij chrysanth cv White Reagan (Tabel 5.1). Bij een gasfaseconcentratie van 22 $\mu\text{g/L}$ carvon treedt bij alle objecten bladschade op. De schade is te omschrijven als een lichte mate van verwelking. Carvon is in fase I van het project getoetst bij roos.

Bij 200 $\mu\text{g/L}$ cymeen wordt eveneens bladschade waargenomen. In dit geval is er sprake van volledige verwelking. Opvallend is dat bij geen van de oliën bloemschade is waar te nemen.

Met deze analyses kan een overzicht gemaakt worden van de grenswaarden voor fytotoxiciteit van een viertal insecticide-oliën (Tabel 5.2). Alleen voor linalool zijn de bovengrenzen voor fytotoxiciteit niet bereikt. Zelfs 210 $\mu\text{g/L}$ bij roos bleek geen effect op de kwaliteit en vaasleven te hebben.

Tabel 5.1 - Fytotoxiciteit van carvon en p-cymeen bij chrysanthe c.v White Reagan. De bloemen zijn onder standaard-condities, 2 uur bij 20°C blootgesteld aan de in de tabel gegeven dosis van de oliën. Bloemen zijn na 8 dagen vaasleven (20°C, 12 uur licht/12 uur donker) beoordeeld op blad en bloemschade.

<i>behandeling</i>	<i>bladschade</i> %	<i>bloemschade</i> %	<i>concentratie</i> (µg/l)
controle	0	0	
carvon	100	0	22.6
cymeen	100	0	196.2

Tabel 5.2 - Overzicht van grenswaarden voor fytotoxiciteit van een viertal insecticide-oliën. In alle gevallen zijn de objecten gedurende 2 uur blootgesteld aan de oliën bij 20°C.

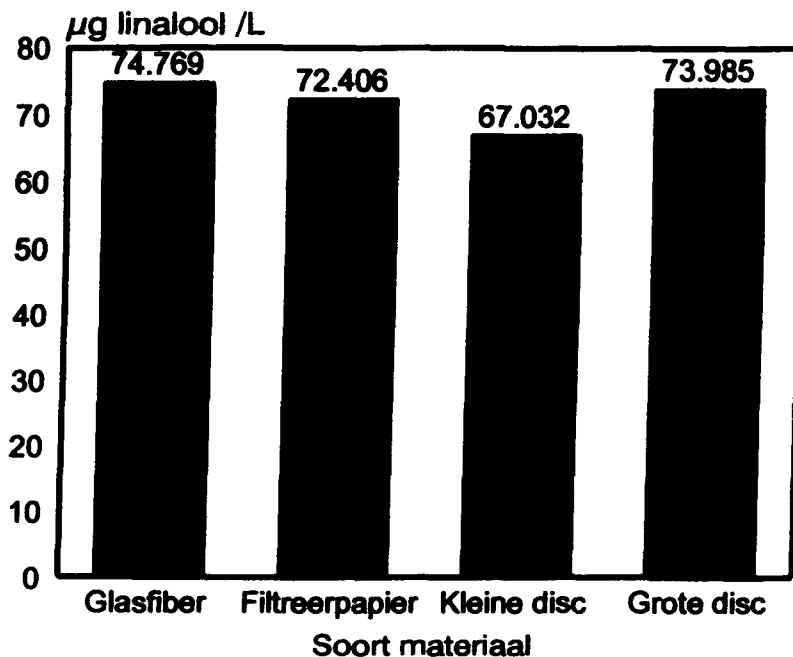
<i>Stof</i>	<i>Roos</i> (µg/l)	<i>Chrysanthe</i> (µg/l)	<i>Lelie</i> (µg/l)
(+/-) linalool	> 210	> 124	> 76
S(+) carvon	< 60	< 22	nb
1,8-cineol	< 3500	nb	nb
p-cymeen	< 3800	< 196	nb

nb is niet bepaald.

5.2 OPTIMALISATIE VAN VERDAMPING VAN LINALOOL

Tot nu toe is voor het aanbrengen van de oliën in het geforceerde verdampingsstelsel (opbrengschijf en ventilator) steeds een soort dragermateriaal gebruikt, namelijk filtreerpapier. In het volgende experiment is de release vanaf een 4-tal materialen getest. Het experiment is uitgevoerd in het standaard ATO-60 literstelsel (zie rapportage fase I) onder standaard-omstandigheden. Figuur 5.2 geeft aan dat de verschillen tussen de gebruikte materialen niet erg groot is. Grote disc voor antibioticum-analyse en glasfiber geven de hoogste gasfaseconcentraties.

Voor het vervolgonderzoek kunnen het beste grote disc voor antibioticum-analyse en glasfiber gebruikt worden.



Figuur 5.2- Verdamping linalool vanaf verschillende dragermaterialen. De volgende materialen zijn gebruikt: Glas Microfibre Filters (GF/C 90 mm Ø Whatman Int. Ltd.; Filter paper circles 90 mm Ø, Schleicher & Schüll GmbH; Antibiotica test discs, (groot) 9 mm Ø, Schleicher & Schüll GmbH; Antibiotica test discs, (klein) 6 mm Ø, Oxoid Ltd.

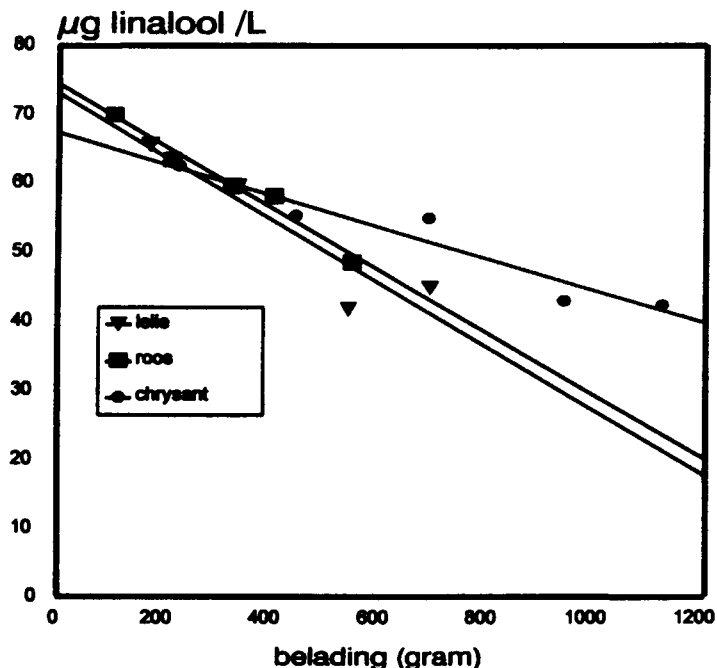
5.3 EFFECT VAN BELADINGSGRAAD VAN CONTAINERS OP GASFASE CONCENTRATIE LINALOOL

Omdat in een eerdere fase van het onderzoek (zie rapportage fase I, pag. 65) is waargenomen dat de gasfaseconcentratie van insecticide-oliën in aanwezigheid van bloemen in een container lager is dan in een onbeladen container kan verondersteld worden dat bloemen tijdens een behandeling deze oliën opnemen uit de omgeving. Deze opname kan het gevolg zijn van passieve absorptie aan bijvoorbeeld de waslaag van het bladmateriaal. Verder wordt de opname mogelijk versterkt door metabolisme van de plant, waardoor de (planteigen) stoffen worden omgezet in andere geurstoffen.

Om de opname van insecticide-oliën meer in detail te bestuderen is de gasfaseconcentratie van linalool bepaald in aanwezigheid van roos, lelie en chrysaant bij verschillende beladingsgraden. De planten zijn standaard twee uur behandeld met 2 ml linalool per 60 liter behandelvolume bij een omgevingstemperatuur van 20°C. Na twee uur is de gasfaseconcentratie gemeten en uitgezet tegen de beladingsgraad (Figuur 5.3). De sterkste opname wordt gevonden bij roos en lelie. Voor beide plantensoorten neemt de steady state gasfaseconcentratie in gelijke mate af met de beladingsgraad. Bij extrapolatie naar de hoogste beladingsgraad (20 gram bloemen per liter) zien we dat de steady state gasfaseconcentratie van linalool is afgenomen met ongeveer 50 µg linalool per liter. Bij afwezigheid van metabolisme (omzetting) en aannemende dat er een evenwicht in de gasfaseconcentratie is bereikt, dan moet geconcludeerd worden dat per gram bloemenmassa 2,5 µg linalool wordt opgenomen of gebonden in een periode van twee uur. Omdat de kinetiek van opname niet is bestudeerd kan geen uitspraak worden gedaan over de snelheid van opname. Omdat in een eerdere fase is waargenomen dat de gasfase-

concentratie van linalool na twee uur en in afwezigheid van bloemen, bij een dosering van 2 ml/60 liter, ongeveer 210 $\mu\text{g/liter}$ is, moet nog opgemerkt worden dat de berekende waarde van 2,5 μg linalool per gram bloemenmassa mogelijk een onderschatting is van de werkelijke opname. Als we dat laatste getal aanhouden komen we uit op een totale opname van 9,5 μg linalool per gram bloemenmassa. De opnamecapaciteit van chrysanten voor linalool is lager dan die van roos en lelie. Bij extrapolatie naar de hoogste beladingsgraad (20 gram per liter) is de steady state linalool-concentratie gedaald met ongeveer 30 $\mu\text{g/l}$. Dat is bijna 40% minder afname als is waargenomen bij roos en lelie.

De lagere gasfaseconcentraties die worden gemeten bij een hogere beladingsgraad kan implicaties hebben voor de effectiviteit van insecticide-oliën. Als tengevolge van opname van de actieve stoffen door het bloemmateriaal de gasfaseconcentratie daalt onder het effectieve niveau, zijn aanpassingen aan het applicatiesysteem noodzakelijk. Voor opschaling naar praktijkschaal kan gedacht worden aan toepassing van zogenaamde Mafex[®]-apparatuur voor de verneveling van vluchtige oliën in de atmosfeer. Deze apparatuur wordt momenteel gebruikt voor onder andere dosering van het aardappel-kiemremmer Talent[®] (karvon-formulering van Luxan B.V., Elst, Gelderland). Met dergelijke apparatuur kunnen in korte tijd hoge gasfaseconcentraties gerealiseerd worden.



Figuur 5.3 - Effect van beladingsgraad van 60 liter container op gasfaseconcentratie. De containers zijn beladen met verschillende hoeveelheden lelie (Casa Blanca), roos (First Red) en chrysaant (White Reagan). In alle gevallen is linalool gedoseerd in een hoeveelheid van 2 ml per 60 liter.

6. TESTEN VAN EFFECTIVITEIT IN KLEINE POTTEN MET PLANTMATERIAAL

Aan deze activiteit is slechts kort aandacht besteed, omdat voor andere onderdelen meer tijd nodig was en de benodigde apparatuur niet beschikbaar was.

De in hoofdstuk 5 beschreven absorptie van oliën door plantmateriaal zou het daarbij noodzakelijk maken om na te gaan hoe dit in kleine potten zou zijn als geen volledige takken, maar bladeren of bloemen gebruikt zouden kunnen worden.

Deze overwegingen hebben ertoe geleid om direct te gaan werken aan het in grote vaten toetsen van de effectiviteit van de combinatie van CA met etherische oliën.

7. HAALBAARHEID CA IN GROTERE SYSTEMEN

Voor praktijksystemen met bewaring en verpakking van groenten zijn vele toepassingen van CA bekend. Bij bewaring van fruit worden grote CA-cellen gebruikt. Een wezenlijk verschil met deze systemen en het systeem dat in dit project voor export van bloemen ontwikkeld wordt is de tijd waarin de CA-condities worden bereikt en de duur van de behandeling. Een logistieke eis is dat de behandeling niet langer duurt dan twee tot drie uur. In deze periode moeten de CA-condities, in combinatie met de etherische oliën, lang genoeg zijn gehandhaafd om effectief te kunnen zijn als insecticidebehandeling.

Een simpele en effectieve werkwijze om de gewenste CA-condities te bereiken is het inbrengen van gas met de gewenste CA-samenstelling. De concentraties van de verschillende gascomponenten gedurende het vervangen van de lucht door een atmosfeer met gewijzigde samenstelling is daarbij afhankelijk van een aantal factoren. In het systeem dat voor de insecticidebehandeling gewenst is wordt normale lucht vervangen door een CA met andere verhoudingen tussen de drie belangrijkste componenten van lucht: O₂, N₂ en CO₂. Tijdens het vervangen mengt de in het vat aanwezige lucht zich in meer of mindere mate met het ingebrachte gas. De snelheid van menging heeft invloed op de bereikte CA-conditie. Verder zijn de duur van de gaswisseling en de hoeveelheid te vervangen lucht van belang.

Voor de afzonderlijke componenten kan het bereikte percentage berekend worden met de volgende algemene formule

$$\%G_t = \frac{V^2 \cdot \%G_0 + t \cdot V \cdot F \%G_c + t^2 \cdot F^2 \cdot (k_{\max} \cdot \%G_c - k_{\min} \cdot \%G_0)}{V^2 + t \cdot V \cdot F + t^2 \cdot F^2 \cdot (k_{\max} - k_{\min})}$$

in deze formule is

- $\%G_t$: percentage gas op tijdstip t
- $\%G_0$: percentage gas in atmosfeer in begin situatie
- $\%G_c$: percentage gas in ingeblazen lucht
- V : volume vat/container in liter
- t : tijd in minuten
- F : flowsnelheid ingeblazen lucht in liter per minuut
- k_{\max} : maximale mate van scheiding tussen ingeblazen lucht en atmosfeer in vat. Als $k_{\max} = 1$ is er sprake van volledige verdringing
- k_{\min} : minimale mate van scheiding tussen ingeblazen lucht en atmosfeer in vat. Als $k_{\min} = 0$ is er sprake van volledige vermenging

k_{\max} moet groter of gelijk zijn dan k_{\min} . Als k_{\max} groter is dan k_{\min} dan neemt k_t (de mate van scheiding tijdens de gaswisseling) in de tijd af volgens de formule

$$k_t = k_{\min} + (k_{\max} - k_{\min}) \cdot \frac{(\%G_t - \%G_c)}{(\%G_0 - \%G_c)}$$

Bovenstaande formule geldt voor de duur van de behandeling als die ligt tussen

$$t = 0 \text{ en } t = \frac{V}{F \cdot \sqrt{k_{\min}}}$$

Uit de formule voor $\%G_t$ is af te leiden dat de benodigde tijd om een niveau te bereiken rechtevenredig is met het volume en omgekeerd evenredig is met de flowsnelheid.

$$t = L \cdot V / F$$

De factor L is afhankelijk van $\%G_0$, $\%G_c$, $\%G_t$, k_{max} en k_{min} .

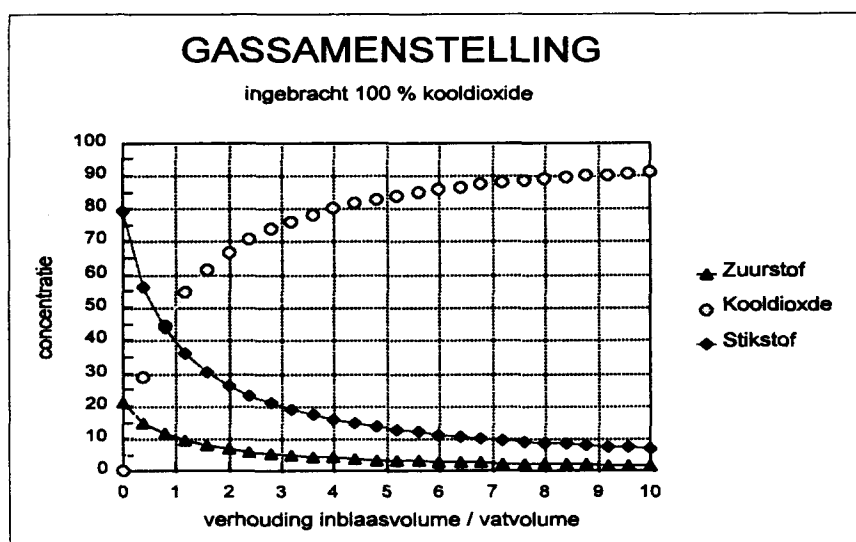
Als de ingebrachte lucht het gewenste percentage van een component bevat, dan moet na de behandeling $\%G_t$ gelijk zijn aan $\%G_c$ en dan geldt dat de factor

$$L = 1 / \sqrt{k_{min}}$$

Voor O_2 kan hieruit geconcludeerd worden dat de mate van minimale verdringing bepaalt hoe snel het niveau van 0% bereikt kan worden. Als er volledige vermenging blijft optreden wordt het niveau van 0% niet bereikt.

Als in een vat (container) 100% CO_2 wordt ingeblazen kan, uitgaande van een situatie waarin lucht met 21% O_2 en 0,04% CO_2 en de rest N_2 aanwezig was en aannemende dat er volledige vermenging optreedt, berekend worden hoe de luchtsamenstelling in het vat zal zijn, afhankelijk van het ingeblazen volume (flowsnelheid * tijd) in verhouding tot het vat volume (Figuur 7.1). Uit deze figuur is duidelijk af te lezen dat het bereiken van zeer lage zuurstofconcentraties door gasuitwisseling veel gas vraagt. Bij grote volumes, bijvoorbeeld containers van 30 m^3 , zal de tijdsduur voor de gaswisseling lang worden.

Voor de experimenten in hoofdstuk 2 is steeds ongeveer acht keer het volume van de flesjes doorgeblazen om de gewenste atmosfeer te krijgen. Om onder de 1% O_2 te komen is dit minimaal nodig. Voor een praktijktoepassing met bloemen is dit een onrealistische opgave.



Figuur 7.1 - Gassamenstelling in een container als 100% CO_2 wordt ingebracht.

Andere mogelijkheden om de O_2 -concentratie te verlagen zijn er wel maar in het kader van het project niet verder onderzocht. In 50 liter-vaten is middels gasmenging de gewenste atmosfeer in een acceptabele tijd te bereiken. Voor de experimenten beschreven in hoofdstuk 3 en 7 is van deze techniek gebruik gemaakt.

Voor het bereiken van een verhoogde concentratie CO_2 (25 tot 50 %) is in verhouding tot het terugdringen van de concentratie O_2 relatief weinig CO_2 nodig. Voor een toepassing van CA als insecticidebehandeling zou het vanuit technisch oogpunt gunstig zijn als dit te danken is aan de effecten van CO_2 en niet aan de afwezigheid van O_2 .

8. TOXICITEIT EN FYTOTOXICITEIT VAN DE COMBINATIE CA MET ETHERISCHE OLIE IN 50 LITER VATEN

8.1. INLEIDING

Als laatste activiteit in het project was een experiment voorzien waarbij de beste combinatie van etherische olie en CA-condities toegepast zou worden in vaten van 50 liter met daarin bloemen en insecten. Bij deze proefopzet kan tegelijkertijd de insecticidewerking en de fytotoxiciteit van de behandeling beoordeeld worden. Verder wordt gekeken in hoeverre de resultaten van proeven in 100 ml flessen vergelijkbaar zijn met de proeven in 50 liter-vaten. Door opschaling van de proefopzet zal dit een betere weergave zijn van de situatie in de praktijk, waarbij snijbloemen begast moeten worden in een grotere ruimte.

In de voorgaande hoofdstukken is beschreven welke voor- en nadelen de verschillende behandelingen hebben. Onder andere is gebleken uit fytotoxiciteits-experimenten dat 40% of meer CO₂ in de atmosfeer, evenals hogere concentraties cymeen, fytotoxische effecten veroorzaken. Bovendien wordt een belangrijk deel van de etherische olie die in dampvorm aanwezig is, geabsorbeerd door snijbloemen. Hierdoor zal een groot gedeelte van de etherische olie niet beschikbaar zijn om de insecticide-activiteit uit te oefenen op de insecten. Daarnaast kan de aanwezigheid van plantmateriaal ook een directe invloed hebben op de insecten. Wanneer insecten zich bevinden op plantmateriaal kan dit voordelig zijn voor de insecten, omdat zij zich in het plantmateriaal kunnen verschuilen en door dit gedrag een lagere dosis van de actieve stof ontvangen, of een gedeelte van de dosis kunnen ontwijken, c.q. ongunstige omstandigheden beter kunnen ontwijken dan wanneer geen plantmateriaal aanwezig is. Op basis van bovenstaande overwegingen wordt bij de behandelingen met CA gekozen voor een CO₂-concentratie van 25% en wordt een mengsel van cymeen:linalool (ratio 1:4) gebruikt.

8.2 MATERIAAL EN METHODEN

Getoetste instellingen

Voor de behandelingen met CA wordt de CO₂-concentratie verhoogd tot 25% door inblazen van 100% CO₂. Als etherische oliën worden gebruikt p-cymeen en linalool in een verhouding van 1:4 met geforceerde verdamping. De behandelingsduur is drie uur bij 20°C. Als gewas wordt gebruikt roos, de cultivars Souvenir en Propheta.

In de proefopzet is uitgegaan van vier behandelingen:

- 1 controle, geen CA geen etherische olie
- 2 wel CA (25% CO₂ balance lucht), geen etherische olie
- 3 geen CA, wel etherische olie (cymeen:linalool, 1:4 ; 2ml)
- 4 CA (25% CO₂ balance lucht) en etherische olie (cymeen:linalool, 1:4 ; 2ml)

Omdat slechts drie cilinders beschikbaar zijn is een proefopzet gemaakt met vier blokken met per blok drie behandelingen. Blok 1 en 2 worden op een dag na elkaar uitgevoerd en blok 3 en 4 op een dag na elkaar.

Insecten

Alle insecten worden gekweekt in grote insectenkooien op chryasant bij een temperatuur van 20 tot 24°C en 16 uur fotoperiode. Voor experimenten worden larven

en adulten van de Californische trips, *Frankliniella occidentalis* gebruikt. Van de groene perzikluis, *Myzus persicae*, worden het ongeveugelde adulte en het laatste nimfale stadium getoetst.

Insectenkooien

Insectenkooien zijn gemaakt van insectengaas. Voor tripsadulten en bladluizen wordt gaas met een maaswijdte van 200 micron gebruikt, voor tripslarven wordt gaas van 100 micron gebruikt. Van het gaas is een envelop gemaakt (afmetingen: 5 x 7 cm) door het gaas dubbel te klappen en de twee zijkanten dicht te sealen met behulp van een sealapparaat. Drie envelopjes worden aan elkaar bevestigd zodat een groter insectenkooitje ontstaat met drie compartimenten voor de respectievelijke insecten. Met behulp van een blauwe pipetpunt (voor een 1000 μ l pipet) bevestigd op een teflonslang worden de insecten verzameld en overgebracht in de kooitjes. Insecten worden in lege kooien geplaatst of in kooien die een chrysantembloem bevatten. Per compartiment worden 30-35 insecten verzameld. De kooitjes worden afgesloten door het gaas aan de kant van de opening enkele malen om te vouwen en af te sluiten met paperclips. Per behandeling worden drie kooien tussen de bloemstelen in de cilinder geplaatst en drie kooien worden los in de cilinder gehangen.

Bloemen

Per cultivar zijn per behandeling 15 takken gebruikt. Deze zijn geoogst en gebost met 15 per bos en afgeknipt op 55 cm en vervolgens voorgewaterd bij 5°C gedurende een nacht. De takken per ras en tijdstip in één container. Eén uur voor de behandeling zijn de takken bij 20°C geplaatst. De bossen worden gewogen en droog in de cilinder gebracht.

Na de behandeling worden de bossen opnieuw gewogen.

Voor het op de vaaszetten worden de takken aangesneden en individueel gewogen. De takken worden op de vaas gezet bij 20°C en 60 % r.v. onder 12 uur licht/12 uur donker bij 3,4 W/m² van TL licht, kleur 84. Na het op de vaaszetten zijn eens per twee dagen de takken gewogen en is visueel waargenomen of er schade of veroudering optrad.

Opstelling

Kunststofcilinders met een inhoud van 50 liter worden afgesloten met een kunststofdeksel. In de wand van de cilinder zijn twee kraantjes aangebracht. Met de eerste kraan kan de toevoer van gassen geregeld worden en met de tweede kraan wordt de atmosfeer afgevoerd uit de cilinder. In de cilinder is een ventilator geplaatst die van buitenaf te bedienen is en die zorg draagt voor vermengen van de gassen in de cilinder. CO₂ wordt toegediend via een PVC-slang aan de onderkant van de cilinder en gedurende het vullen staan beide kranen op de cilinder open. Met behulp van een flowmeter die aan de gasfles is gekoppeld, kan de stroomsnelheid van het gas ingesteld worden. Wanneer voldoende gas is toegediend, worden beide kranen gesloten en de ventilator gedurende 5 minuten ingeschakeld. Aan de hand van de flowsnelheid en -tijd kan worden berekend wanneer de gewenste CO₂-concentratie van 25% is bereikt. Na instelling van de CA wordt de atmosferische gassamenstelling in de cilinder geanalyseerd met behulp van een gaschromatograaf. De etherische oliën worden gedoseerd op een schijf filtreerpapier en met behulp van een kleinere ventilator geforceerd in de dampfase gebracht; de ventilator blijft gedurende de gehele behandelingsduur ingeschakeld. Bloemstelen worden begast gedurende drie uur bij 20°C. Aan het einde van de behandelingsduur wordt opnieuw een monster genomen ter bepaling van de samenstelling van atmosferische gassen. Op dit tijdstip worden ook twee monsters genomen ter bepaling van de etherische olieconcentratie in de gasfase.

Het eerste monster wordt direct voor het einde van de incubatietijd genomen. Met een luchtdichte spuit wordt direct boven de rozenknoppen een monster van 10 ml atmosfeer uit het gesloten vat genomen. Het tweede monster wordt genomen direct nadat het deksel van het vat verwijderd is. In dit geval wordt een monster van de atmosfeer tussen de bloemstelen genomen.

Na bemonstering worden de cilinders geopend en kooien met insecten verwijderd, waarna insecten worden gecontroleerd op mobiliteit. Aktieve insecten worden geteld en verwijderd, immobiele insecten worden overgebracht naar glazen potjes met daarin bladmateriaal en een vochtig stukje filtreerpapier. Potjes worden afgesloten met parafilm. Na een periode van een tot enkele uren en nogmaals 24 uur later worden de insecten gecontroleerd op activiteit; insecten die na 24 uur bij aanraken niet bewegen worden geteld als dode insecten.

Na verwijdering van de insectenkooien worden de bloemstelen uit de cilinders gehaald.

8.3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

8.3.1 Insecticide-werking

De resultaten van het experiment in 50 liter-vaten staan vermeld in Tabel 8.1. Uit de experimenten blijkt dat een totale afdoding van alle toetsinsecten niet kan worden bereikt. De hoogst sterfte wordt gevonden bij trips-adulten. De maximale mortaliteit die wordt bereikt is 31,6% bij een combinatie van CA + etherische olie en afwezigheid van plantmateriaal in de insectenkooien. Er wordt een iets lagere sterfte van 26,5% gevonden wanneer er plantmateriaal in de insectenkooien aanwezig is. Deze sterfte is significant hoger dan wanneer trips-adulten worden blootgesteld aan CA zonder olie of een behandeling met etherische olie onder normale atmosferische omstandigheden (GLM; $P \leq 0,05$). In deze gevallen ligt de sterfte op hetzelfde peil als in de controlegroepen zonder toediening van olie of CA. Bij tripslarven of bladluizen is de sterfte in alle behandelingen gelijkwaardig. Er is geen extra effect merkbaar van het toedienen van CA, etherische olie of een combinatie van beide. De maximale sterfte die wordt bereikt voor tripslarven en bladluizen bedraagt respectievelijk 7,0% en 11,2%, terwijl in de controlegroepen een sterfte wordt gevonden van 0,0 en 8,3%.

Bij de instelling van de CA is de gewenste concentratie CO_2 bereikt door te flushen met 100% CO_2 gedurende een vastgestelde tijd. De bereikte CA's staan vermeld in Tabel 8.2. Bij het opbrengen van etherische olie, cymeen en linalool in een verhouding 1:4, is gekozen voor een hoeveelheid van 2 ml, omdat dezelfde hoeveelheid olie in reeds uitgevoerde fytotoxiciteitsproeven met roos en chrysant geen noemenswaardige fytotoxiciteit veroorzaakte. De bereikte etherische olie-concentraties staan eveneens vermeld in Tabel 8.2. Per vat zijn twee monsters genomen, één monster direct voor het einde van de incubatietijd. Bij dit monster werd direct boven de rozenknoppen met een luchtdichte spuit een monster van 10 ml atmosfeer uit het vat genomen. Het tweede monster werd genomen direct nadat het deksel van het vat verwijderd was. In dit geval werd de atmosfeer tussen de bloemstelen bemonsterd.

Omdat in de behandelingen van de eerste twee blokken vrijwel geen mortaliteit van insecten werd waargenomen -een te geringe effectiviteit- zijn in de blokken 3 en 4 geen insecten meer ingebracht, maar is met het oog op fytotoxiciteit en belading de methode van toediening van de etherische olie aangepast.

Tabel 8.1 - Sterfte van groene perzikluis *Myzus persicae*, en trips, *Frankliniella occidentalis* larven en adulten na een behandelingsduur van drie uur bij 20°C in 50 liter-containers met 15 rozenstelen. Gemiddelde waarden van drie herhalingen plus standaardafwijking (tussen haakjes).

Behandeling	Sterfte (%)		
	bladluis	tripslarve	tripsadult
<i>A Kooitjes zonder plantmateriaal</i>			
Controle [§]	5,5 (3,9)	0,0 (0,0)	4,6 (8,1)
CA	9,0 (2,2)	-	5,8 (1,5)
Etherische olie	8,7 (3,3)	6,0 (1,8)	6,3 (8,8)
CA + etherische olie [§]	8,8 (5,6)	7,0 (5,6)	31,6 (16,1)
<i>B Kooitjes met plantmateriaal</i>			
Controle	8,3 (5,8)	0,0 (0,0)	1,1 (2,0)
CA	11,2 (4,0)	2,1 (3,6)	8,0 (5,3)
Etherische olie	7,0 (5,9)	1,3 (2,2)	2,7 (2,5)
CA + etherische olie [§]	10,7 (7,1)	3,1 (3,5)	26,5 (7,6)

[§] Gemiddelde waarde van zes herhalingen i.p.v. drie herhalingen

Uit Tabel 8.2 blijkt dat de CA-condities goed zijn gerealiseerd en dat de takken gedurende de behandeling vrijwel niet in gewicht afnemen. De gasfaseconcentratie van zowel cymeen als linalool blijkt laag te zijn en veel lager dan in de experimenten beschreven in hoofdstuk 2. Voor linalool komt de concentratie overeen met die bij de experimenten die beschreven zijn in hoofdstuk 4. Opvallend daarbij is dat vergroting van de verdamping niet leidde tot een duidelijk hogere concentratie in de gasfase. De concentratie van linalool en cymeen ligt ver onder de in fase I gevonden LD₅₀-waarden voor deze stoffen.

8.2 Fytotoxiciteit

Visueel werd geen schade bij Souvenir of Prophyta waargenomen. De takken stonden uitzonderlijk lang - meer dan vier weken - op de vaas. Ook in gewichtsverloop was tussen de takken van verschillende behandelingen op één dag geen verschil waarneembaar (Figuur 8.1). De onregelmatige stijgingen en dalingen in de lijnen van takken die waren ingezet op 14 mei zijn het gevolg van het moment van wegen op de dag. 's Morgens zijn de takken zwaarder dan midden op de dag. In de nacht treedt weer enig herstel op.

De in deze proef gebruikte behandelingen waren niet fytotoxisch voor de rozenrassen 'Souvenir' en 'Prophyta'.

Tabel 8.2 - Overzicht van de behandelingen in een proef in 50 liter-vaten naar toxiciteit en fytotoxiciteit van CA gecombineerd met etherische olie

Dag	Behandeling	Ras	Gewicht in gram per bos			Belading cilinder in gram	Atmosfeer			Etherische olie in µg/l		
			voor	na	verschil		CO ₂	O ₂	N ₂	cymeen	linalool	n.v.t.
14 mei morgen	Controle	Souvenir	291,9	290,3	1,6	679	Lucht met iets oplopende CO ₂ concentratie				n.v.t.	
		Prophyta	388,4	386,8	1,6							
	CA	Souvenir	246,6	244,9	1,7	590	24,4	16,2	59,4		n.v.t.	
		Prophyta	345,6	343,8	1,8							
	CA + Olie 2ml onder	Souvenir	269,1	267,1	2,0	591	25,1	16,1	58,8	65	51	
		Prophyta	323,7	322,4	1,3							
14 mei middag	Controle	Souvenir	332,0	330,7	1,3	745	Lucht met iets oplopende CO ₂ concentratie				n.v.t.	
		Prophyta	414,6	412,5	2,1							
	Olie 2ml onder	Souvenir	275,3	273,0	2,3	648	Lucht met iets oplopende CO ₂ concentratie				62	48
		Prophyta	374,1	373,1	1,0							
	CA + Olie 2 ml onder	Souvenir	297,5	296,0	1,5	684	24,9	16,2	58,9	67	59	
		Prophyta	388,6	385,9	2,7							

Table 8.2 - Overzicht van de behandelingen in een proef in 50 liter-vaten naar toxiciteit en fytotoxiciteit van CA gecombineerd met etherische olie

Dag	Behandeling	Ras	Gewicht in gram per bos			Belading cilinder in gram	Atmosfeer	Etherische olie in µg/l			
			voor	na	verschil			CO ₂	O ₂	N ₂	cymeen
19 mei morgen	Controle	Souvenir	285,5	284,3	1,2	646	Lucht met iets oplopende CO ₂ concentratie			n.v.t.	
		Prophyta	361,4	359,9	1,5						
	CA	Souvenir	302,0	301,2	0,8	716	40,2	12,8	47,0	n.v.t.	
		Prophyta	415,3	414,3	1,0						
	CA + Olie 2,5 ml onder 2,5 ml boven	Souvenir	289,7	288,5	1,2	655	31,5	14,6	53,9	75	86*
		Prophyta	367,1	365,2	1,9						
19 mei middag	Controle	Souvenir	283,9	282,6	1,3	653	Lucht met iets oplopende CO ₂ concentratie			n.v.t.	
		Prophyta	370,3	369,2	1,1						
	CA	Souvenir	283,0	282,0	1,0	665	25,5	16,0	58,5	n.v.t.	
		Prophyta	382,8	381,5	1,3						
	CA + Olie 2,5 ml onder 2,5 ml boven	Souvenir	268,1	267,2	0,9	658	26,2	15,8	58,0	77	67
		Prophyta	391,6	390,0	1,6						

9. CONCLUSIE EN AANBEVELINGEN

Het project 'Ontwikkeling van een effectieve methode om glastuinbouwproducten insectenvrij en met verbeterde milieu- en productkwaliteit te kunnen exporteren' heeft niet tot een voor de praktijk bruikbare methode geleid. De getoetste oplossingen waren in een systeem met 50 liter-vaten niet effectief. Aan het ontwikkelen van nog grotere praktijk systemen is geen aandacht besteed.

Op onderdelen is wel de kennis van de problematiek en de mogelijke oplossingen vergroot.

Het LEI- rapport 'Bedrijfseconomische aspecten van insectenvrije export van snijbloemen' heeft de economische voorwaarden en perspectieven beschreven. Uit dit rapport is af te leiden dat een investering in verdere ontwikkeling van een desinfecteringsmethode gebaseerd moet zijn op handelspolitieke overwegingen.

In het verslag van fase I is een uitvoerige literatuurstudie opgenomen over alternatieven voor desinfectering.

In dit tweede verslag is aangegeven dat etherische oliën in combinatie met CA-condities een insecticidewerking hebben. Gebruik van CA-condities versterkt daarbij het effect van de oliën. In de proeven is de werking van dit biologische principe aangetoond. Dit werd zowel in experimenten in kleine flessen als in 50 liter-containers gevonden. De doding in grotere vaten was echter onvoldoende. Naar de oorzaken hiervan is geen onderzoek gedaan.

Als mogelijk knelpunten bij praktijk toepassing worden gezien

- * de absorptie van de oliën door plantmateriaal;
- * de verschillende gevoeligheid van insecten en insectenstadia;
- * de schade aan rozen veroorzaakt door CO₂ bij voor toxiciteit gewenste CA-condities en duur van de behandeling.

Dit project heeft geen oplossing gebracht voor een probleem dat met het verdwijnen van methylbromide zal ontstaan. Bij een vervolg zullen de oorzaken van de mindere effectiviteit in 50 liter-containers met product onderzocht moeten worden. Daarnaast geeft het project aanwijzingen voor mogelijke andere methoden die onderzocht zouden kunnen worden. Niet onderzocht is de toepassing van verlaagde druk in combinatie met één van de andere technieken die in dit rapport zijn genoemd.

Verder zijn er mogelijk andere begassingsmiddelen die een brede insecticidewerking hebben, maar die vanwege de beschikbaarheid van methylbromide tot nu toe niet zijn toegepast. De effectiviteit van deze middelen zou door gebruik van CA kunnen worden versterkt.

APPENDIX A Bereikte waarden van CA en etherische olie bij experimenten van hoofdstuk 2

Schema van de experimenten met combinaties van CA en etherische olie

Insect	Behandeling en experiment nummer				
	CA + linalool 20°C	CA + cymeen 20°C	cymeen + linalool 20°C	CA + mengsel 20°C	CA + mengsel 25°C
Californische trips - larve	1	4	7	10	13
Californische trips - adult	2	5	8	11	14
Groene perzikluis	3	6	9	12	15

<i>Datum</i>	<i>Insect</i>	<i>behandeling</i>	<i>nr.</i>	<i>Instelling van atmosfeer niet bereikt (zie volgende pagina):</i>
02/09/1997	tripslarve	CA + linalool (20°C)	1	20% CO ₂
11/02/1998	tripsadult	CA + linalool (20°C)	2	alle instellingen OK
10/02/1998	bladluis	CA + linalool (20°C)	3	alle instellingen OK
18/09/1997	tripslarve	CA + cymeen (20°C)	4	20% CO ₂
12/08/1997	tripsadult	CA + cymeen (20°C)	5	50% CO ₂
03/02/1998	bladluis	CA + cymeen (20°C)	6	100% N ₂ en 100% CO ₂
04/12/1997	tripslarve	cymeen/linalool	7	n.v.t.
25/11/1997	tripsadult	cymeen/linalool	8a	n.v.t.
17/12/1997	tripsadult	cymeen/linalool	8b	n.v.t.
03/12/1997	bladluis	cymeen/linalool	9	n.v.t.
19/02/1998	tripslarve	CA + cym/lin (20°C)	10	100% CO ₂
24/02/1998	tripsadult	CA + cym/lin (20°C)	11	alle instellingen OK
03/03/1998	bladluis	CA + cym/lin (20°C)	12	alle instellingen OK
05/03/1998	tripslarve	CA + cym/lin (25°C)	13	alle instellingen OK
12/03/1998	tripsadult	CA + cym/lin (25°C)	14	alle instellingen OK
10/03/1998	bladluis	CA + cym/lin (25°C)	15	alle instellingen OK

nr		CA: bereikte waarden (minimum-maximum)				olie (µg/L)	
		1 (100% N ₂)	2 (20% CO ₂)	3 (50% CO ₂)	4 (100% CO ₂)	laag	hoog
1	CO ₂	0,00 - 0,08	21,5 - 22,0	52,1 - 52,5	99,7 - 99,8	(linalool) 31 - 63	102 - 150
	O ₂	0,12 - 0,15	1,81 - 1,89	0,25 - 0,27	0,08 - 0,17		
	N ₂	99,8 - 99,9	76,1 - 76,7	47,2 - 47,6	0,08 - 0,18		
2	CO ₂	0,00 - 0,04	11,0 - 13,4	51,5 - 51,7	90,6 - 90,8	(linalool) 28 - 48	85 - 107
	O ₂	0,00 - 0,00	0,01 - 0,05	0,00 - 0,07	0,00 - 0,00		
	N ₂	99,9 - 100	86,6 - 89,0	48,3 - 48,5	9,16 - 9,37		
3	CO ₂	0,01 - 0,05	12,0 - 13,3	51,4 - 51,5	90,4 - 90,7	(linalool) 30 - 61	79 - 100
	O ₂	0,00 - 0,00	0,01 - 0,06	0,00 - 0,01	0,00 - 0,00		
	N ₂	99,9 - 100	86,7 - 88,0	48,5 - 48,6	9,27 - 9,65		
4	CO ₂	0,00 - 0,06	21,8 - 22,0	51,3 - 51,7	99,7 - 99,8	(cymeen) 8 - 36	76 - 105
	O ₂	0,11 - 0,12	1,78 - 1,81	0,20 - 0,29	0,09 - 0,22		
	N ₂	99,8 - 99,8	76,2 - 76,4	48,1 - 48,4	0,00 - 0,20		
5	CO ₂	0,00 - 0,05	11,1 - 11,2	31,9 - 32,6	98,3 - 99,7	(cymeen) 9 - 34	57 - 108
	O ₂	0,05 - 0,07	0,05 - 0,06	1,94 - 1,98*	0,08 - 0,36		
	N ₂	99,9 - 99,9	88,7 - 88,8	65,5 - 66,2	0,19 - 1,31		
6	CO ₂	0,02 - 0,09	17,0 - 17,1	47,8 - 48,2	87,5 - 87,8	(cymeen) 4 - 23	46 - 78
	O ₂	3,23 - 3,30	0,00 - 0,00	0,00 - 0,01	4,45 - 4,50		
	N ₂	96,7 - 96,7	82,9 - 83,0	51,8 - 52,2	7,73 - 8,00		
7	-	cymeen: 21 - 58, linalool: 16 - 56				cymeen en linalool in verschillende ratio's toegediend	
8a	-	cymeen: 18 - 77, linalool: 14 - 78					
8b	-	cymeen: 3 - 34, linalool: 2 - 22					
9	-	cymeen: 22 - 107, linalool: 19 - 74					
10	CO ₂	0,01 - 0,07	17,7 - 17,9	51,4 - 52,1	72,3 - 76,3	cymeen: 59 - 101 linalool: 43 - 99	
	O ₂	0,00 - 0,00	0,00 - 0,00	0,00 - 0,07	3,55 - 4,49		
	N ₂	99,9 - 100	82,1 - 82,3	47,9 - 48,5	20,2 - 23,2		
11	CO ₂	0,00 - 0,06	18,6 - 18,7	43,4 - 43,6	99,9 - 100	cymeen: 51 - 67 linalool: 67 - 101	
	O ₂	0,00 - 0,00	0,00 - 0,00	0,00 - 0,00	0,00 - 0,09		
	N ₂	99,9 - 100	81,3 - 81,4	56,4 - 56,6	0,00 - 0,13		
12	CO ₂	0,02 - 0,08	19,4 - 19,5	49,2 - 49,4	99,9 - 99,9	cymeen: 56 - 73 linalool: 70 - 113	
	O ₂	0,00 - 0,00	0,00 - 0,00	0,00 - 0,00	0,00 - 0,06		
	N ₂	99,9 - 100	80,5 - 80,6	50,6 - 50,8	0,04 - 0,11		
13	CO ₂	0,02 - 0,08	19,4 - 19,5	49,2 - 49,3	99,9 - 99,9	cymeen: 51 - 69 linalool: 71 - 106	
	O ₂	0,00 - 0,00	0,00 - 0,00	0,00 - 0,00	0,00 - 0,04		
	N ₂	99,9 - 100	80,5 - 80,6	50,7 - 50,8	0,05 - 0,11		
14	CO ₂	0,02 - 0,08	19,4 - 19,5	49,3 - 49,4	99,9 - 99,9	cymeen: 46 - 59 linalool: 59 - 90	
	O ₂	0,00 - 0,00	0,00 - 0,00	0,00 - 0,00	0,00 - 0,06		
	N ₂	99,9 - 100	80,5 - 80,6	50,6 - 50,7	0,00 - 0,09		
15	CO ₂	0,02 - 0,08	19,4 - 19,5	49,2 - 49,4	99,9 - 99,9	cymeen: 45 - 64 linalool: 61 - 91	
	O ₂	0,00 - 0,00	0,00 - 0,00	0,00 - 0,00	0,00 - 0,06		
	N ₂	99,9 - 100	80,5 - 80,6	50,6 - 50,8	0,04 - 0,12		

* vetgedrukt: Instellingen kloppen niet; te hoge O₂ concentratie

APPENDIX B Resultaten van alle experimenten uit hoofdstuk 2

Schema van de experimenten met combinaties van CA en etherische olie

Insect	Behandeling en experiment nummer				
	CA + linalool 20 °C	CA + cymeen 20 °C	cymeen + linalool 20 °C	CA + mengsel 20 °C	CA + mengsel 25 °C
Californische trips - larve	1	4	7	10	13
Californische trips - adult	2	5	8	11	14
Groene perzikluis	3	6	9	12	15

atmosfeer werkelijke waarden			EXPERIMENT 1: tripslarven % mortaliteit [*]		
			hoeveelheid toegediend linalool [*]		
% CO ₂	% N ₂	% O ₂	geen	laag	hoog
0,0532	99,8	0,139	12,5	3,3	36,8
21,7	76,4	1,83	6,8	2,6	34,7
52,3	47,5	47,5	6,1	0,0	61,3
99,7	0,157	0,0983	5,9	0,0	71,7
0,48	77,5	22,0	4,1	1,5	10,9

Gemiddelde waarde van twee waarnemingen

* één van de twee controleflessen bestond uit het opbrengen van 0,9 µl ethanol (gebruikt als oplosmiddel voor verdunning van linalool), toediening van de lage hoeveelheid linalool vond plaats als een mengsel van 0,1 µl linalool + 0,9 µl ethanol, en de hoge hoeveelheid bestond uit het opbrengen van 1 µl linalool en 0,9 µl ethanol.

atmosfeer werkelijke waarden			EXPERIMENT 2: tripsadulten % mortaliteit ^a		
			hoeveelheid toegediend linalool ^b		
% CO ₂	% N ₂	% O ₂	geen	laag	hoog
0,041	100	0,001	1,5	1,5	78,3
11,8	88,1	0,025	4,2	6,7	33,7
51,6	48,4	0,012	8,3	4,3	49,8
90,7	9,28	0,000	8,7	12,9	60,5
0,396	77,4	22,2	2,9	17,4	23,3

^a Gemiddelde waarde van twee waarnemingen, totaal van ♀ en ♂ tripsen
^b één van de twee controle flessen bestond uit het opbrengen van 0,9 µl ethanol (gebruikt als oplosmiddel voor verdunning van linalool), toediening van de lage hoeveelheid linalool vond plaats als een mengsel van 0,1 µl linalool + 0,9 µl ethanol, en de hoge hoeveelheid bestond uit het opbrengen van 1 µl linalool en 0,9 µl ethanol.

atmosfeer werkelijke waarden			EXPERIMENT 3: perzikluis % mortaliteit ^a		
			hoeveelheid toegediend linalool ^b		
% CO ₂	% N ₂	% O ₂	geen	laag	hoog
0,041	100	0,001	3,2	17,8	33,5
12,5	87,5	0,025	8,7	19,7	18,5
51,5	48,5	0,003	15,7	28,5	26,5
90,5	9,50	0,000	12,5	23,0	27,0
0,435	77,4	22,2	0,0	21,0	17,8

^a Gemiddelde waarde van twee waarnemingen
^b één van de twee controle flessen bestond uit het opbrengen van 0,9 µl ethanol (gebruikt als oplosmiddel voor verdunning van linalool), toediening van de lage hoeveelheid linalool vond plaats als een mengsel van 0,1 µl linalool + 0,9 µl ethanol, en de hoge hoeveelheid bestond uit het opbrengen van 1 µl linalool en 0,9 µl ethanol.

atmosfeer werkelijke waarden			EXPERIMENT 4: tripslarven % mortaliteit ^a		
			hoeveelheid toegediend cymeen [*]		
% CO ₂	% N ₂	% O ₂	geen	laag	hoog
0,0443	99,8	0,117	2,9	2,5	12,9
21,9	76,3	1,79	2,5	6,0	9,0
51,5	48,2	0,258	0,0	1,4	12,1
99,7	12,6	0,132	5,3	7,6	19,8
0,625	77,4	22,0	1,7	5,0	27,2

^a Gemiddelde waarde van twee waarnemingen

^{*} één van de twee controle flessen bestond uit het opbrengen van 0,9 µl ethanol (gebruikt als oplosmiddel voor verdunning van cymeen), toediening van de lage hoeveelheid cymeen vond plaats als een mengsel van 0,1 µl cymeen + 0,9 µl ethanol, en de hoge hoeveelheid bestond uit het opbrengen van 1 µl cymeen en 0,9 µl ethanol.

atmosfeer werkelijke waarden			EXPERIMENT 5: tripsadulten % mortaliteit ^a		
			hoeveelheid toegediend cymeen [*]		
% CO ₂	% N ₂	% O ₂	geen	laag	hoog
0,0328	99,9	0,0563	24,8	55,1	39,7 ^b
11,2	88,8	0,0540	5,1	11,6	28,8 ^b
32,2	65,9	1,96	30,5	23,9	78,8
99,3	0,469	0,146	3,3	3,0	92,8
0,306	79,2	20,5	5,0	8,5	53,3

^a Gemiddelde waarde van twee waarnemingen totaal, van ♀ en ♂ tripsen

^{*} één van de twee controle flessen bestond uit het opbrengen van 0,9 µl ethanol (gebruikt als oplosmiddel voor verdunning van cymeen), toediening van de lage hoeveelheid cymeen vond plaats als een mengsel van 0,1 µl cymeen + 0,9 µl ethanol, en de hoge hoeveelheid bestond uit het opbrengen van 1 µl cymeen en 0,9 µl ethanol.

atmosfeer werkelijke waarden			EXPERIMENT 6: perzikluis % mortaliteit ⁸		
			hoeveelheid toegediend cymeen*		
% CO ₂	% N ₂	% O ₂	geen	laag	hoog
0,0678	96,7	3,26	11,0	9,0	11,3
17,1	82,9	0,000	2,3	1,6	25,8
47,8	52,0	0,004	13,4	9,1	7,4
87,6	7,92	4,48	35,7	16,3	34,0
0,441	77,3	22,1	2,7	8,6	24,9

⁸ Gemiddelde waarde van twee waarnemingen, totaal van ♀ en ♂ tripsen

* één van de twee controle flessen bestond uit het opbrengen van 0,9 µl ethanol (gebruikt als oplosmiddel voor verdunning van cymeen), toediening van de lage hoeveelheid cymeen vond plaats als een mengsel van 0,1 µl cymeen + 0,9 µl ethanol, en de hoge hoeveelheid bestond uit het opbrengen van 1 µl cymeen en 0,9 µl ethanol.

ratio cymeen:linalool (totaal 1 µl)	concentratie µg/l		EXPERIMENT 7: tripslarven % mortaliteit ⁸
	cymeen	linalool	
0:10	1	45	22,5
1:9	22	42	22,2
2:8	39	54	14,2
3:7	37	41	21,5
4:6	40	35	21,0
5:5	56	39	26,0
6:4	55	37	17,1
7:3	51	37	20,0
8:2	51	20	42,6
9:1	43	18	20,9
10:0	56	4	27,6
controle	11	1	1,6

⁸ Gemiddelde waarde van twee waarnemingen

ratio cymeen:linalool (totaal 1 µl)	concentratie µg/l		EXPERIMENT 8a: tripsadulten % mortaliteit ^a
	cymeen	linalool	
0:10	1	47	10,0
1:9	21	65	11,7
2:8	25	58	18,3
3:7	38	67	16,7
4:6	43	67	8,3
5:5	50	68	20,0
6:4	60	70	28,3
7:3	47	48	36,7
8:2	35	29	36,7
9:1	57	30	26,7
10:0	71	18	36,7
controle	-	-	1,7

^a Gemiddelde waarde van twee waarnemingen

ratio cymeen:linalool (totaal 1 µl)	concentratie µg/l		EXPERIMENT 8b: tripsadulten % mortaliteit ^a
	cymeen	linalool	
0:10	1	11	40,0
1:9	5	9	28,6
2:8	5	5	31,4
3:7	18	14	52,9
4:6	12	6	38,6
5:5	19	9	38,6
6:4	19	5	65,7
7:3	14	2	70,0
8:2	22	4	85,7
9:1	18	2	84,3
10:0	32	3	68,6
controle	7	3	4,3

^a Gemiddelde waarde van twee waarnemingen

ratio cymeen:linalool (totaal 1 µl)	concentratie µg/l		EXPERIMENT 9: perzikluis % mortaliteit ^a
	cymeen	linalool	
0:10	1	63	75,9
1:9	26	51	73,0
2:8	32	42	80,5
3:7	56	64	90,4
4:6	-	-	.*
5:5	59	46	100,0
6:4	-	-	-
7:3	73	44	98,2
8:2	68	31	100,0
9:1	92	38	100,0
10:0	97	2	100,0
controle	-	-	3,1

^a Gemiddelde waarde van twee waarnemingen

* Niet getoetst

atmosfeer werkelijke waarden			EXPERIMENT 10: tripslarven % mortaliteit ^a		
			hoeveelheid toegediend olie ^b		
% CO ₂	% N ₂	% O ₂	geen	cym:lin	linalool
0,058	99,9	0,000	5,0	8,2	3,6
17,8	82,2	0,000	1,7	6,5	15,0
51,8	48,2	0,024	4,7	10,9	13,1
74,6	21,4	3,95	0,0	4,8	3,3
0,359	77,4	22,2	0,0	9,4	9,2

^a Gemiddelde waarde van twee waarnemingen

^b Er werd in totaal 5 µl van de etherische olie (mengsel van cymeen en linalool (cym:lin) of alleen linalool (linalool) opgebracht. Het mengsel van cymeen:linalool werd opgebracht in de verhouding 2:8.

atmosfeer werkelijke waarden			EXPERIMENT 11: tripsadulter % mortaliteit ^a		
			hoeveelheid toegediend olie [*]		
% CO ₂	% N ₂	% O ₂	geen	cym:lin	linalool
0,046	100	0,000	1,6	93,6	77,4
18,7	81,3	0,000	3,2	90,8	71,2
43,5	56,5	0,000	3,2	71,0	62,9
99,9	0,066	0,016	9,5	96,7	68,5
0,422	77,4	22,2	0,0	15,0	6,7

^a Gemiddelde waarde van twee waarnemingen, alleen ♀♀ tripsen

^{*} Er werd in totaal 5 µl van de etherische olie (mengsel van cymeen en linalool (cym:lin) of alleen linalool (linalool) opgebracht. Het mengsel van cymeen:linalool werd opgebracht in de verhouding 2:8.

atmosfeer werkelijke waarden			EXPERIMENT 12: perzikluis % mortaliteit ^a		
			hoeveelheid toegediend olie [*]		
% CO ₂	% N ₂	% O ₂	geen	cym:lin	linalool
0,065	99,9	0,001	3,2	53,3	32,6
19,5	80,5	0,000	11,6	57,9	40,3
49,4	50,6	0,000	14,1	21,5	23,7
99,9	0,088	0,013	7,9	45,3	20,4
0,481	77,4	22,2	0,0	24,4	19,7

^a Gemiddelde waarde van twee waarnemingen

^{*} Er werd in totaal 5 µl van de etherische olie (mengsel van cymeen en linalool (cym:lin) of alleen linalool (linalool) opgebracht. Het mengsel van cymeen:linalool werd opgebracht in de verhouding 2:8.

atmosfeer werkelijke waarden			EXPERIMENT 13: tripslarven % mortaliteit*		
			hoeveelheid toegediend olie*		
% CO ₂	% N ₂	% O ₂	geen	cym:lin	linalool
0,064	99,9	0,001	6,1	54,8	36,7
19,5	80,5	0,001	5,0	52,3	25,8
49,3	50,7	0,001	4,8	60,1	47,3
99,9	0,091	0,009	8,1	74,7	52,2
0,414	77,3	22,3	0,0	6,6	3,2

* Gemiddelde waarde van twee waarnemingen (experimentele temperatuur is 25 °C i.p.v. 20 °C)

* Er werd in totaal 5 µl van de etherische olie (mengsel van cymeen en linalool (cym:lin) of alleen linalool (linalool) opgebracht. Het mengsel van cymeen:linalool werd opgebracht in de verhouding 2:8.

atmosfeer werkelijke waarden			EXPERIMENT 14: tripsadulten % mortaliteit*		
			hoeveelheid toegediend olie*		
% CO ₂	% N ₂	% O ₂	geen	cym:lin	linalool
0,063	99,9	0,001	1,6	93,9	95,4
19,5	80,5	0,001	4,5	100,0	95,3
49,3	50,7	0,001	0,0	96,9	87,0
99,9	0,060	0,020	21,9	98,5	93,8
0,421	77,3	22,3	1,5	48,4*	50,1

* Gemiddelde waarde van twee waarnemingen, alleen ♀ tripsen (experimentele temperatuur is 25 °C i.p.v. 20 °C)

* Er werd in totaal 5 µl van de etherische olie (mengsel van cymeen en linalool (cym:lin) of alleen linalool (linalool) opgebracht. Het mengsel van cymeen:linalool werd opgebracht in de verhouding 2:8.

atmosfeer werkelijke waarden			EXPERIMENT 15: perzikluis % mortaliteit [‡]		
			hoeveelheid toegediend olie*		
% CO ₂	% N ₂	% O ₂	geen	cym:lin	linalool
0,056	99,9	0,001	12,8	87,1	72,3
19,5	80,5	0,001	23,2	67,2	69,3
49,3	50,7	0,001	22,2	60,2	67,2
99,9	0,086	0,014	83,0	97,9	96,8
0,456	77,4	22,1	1,4	40,3	40,6

[‡] Gemiddelde waarde van twee waarnemingen (experimentele temperatuur is 25 °C i.p.v. 20 °C)

* Er werd in totaal 5 µl van de etherische olie (mengsel van cymeen en linalool (cym:lin) of alleen linalool (linalool) opgebracht. Het mengsel van cymeen:linalool werd opgebracht in de verhouding 2:8.

APPENDIX C Resultaten van alle experimenten uit hoofdstuk 3

Experiment 1 (07-04-1998)

Mortaliteit van Californische tripslarven (Frankliniella occidentalis) bij verschillende samenstellingen van de controlled atmosphere (CA: ingestelde en werkelijk bereikte waarden) en met of zonder etherische olie gedurende een behandeling van twee uur bij 20°C.

CA						% mortaliteit tripslarven ^{&}	
ingestelde waarden			werkelijk bereikte concentraties [±]			geen olie	olie [®]
O ₂	CO ₂	N ₂	O ₂	CO ₂	N ₂		
0	0	100	<0,30	<0,25	99,5-99,6	1,7 (±2,4)	15,3 (±3,4)
0	35	65	<0,002	35,1-35,2	64,8-64,9	4,7 (±2,2)	14,0 (±1,6)
2	0	98	6,1-6,3 [§]	<0,002	93,7-93,9	0,0 (±0,0)	9,5 (±4,3)
2	35	63	<0,04 [§]	42,3-42,6	57,4-57,7	7,6 (±2,1)	9,3 (±8,9)
10	0	90	7,9-7,9	<0,003	92,0-92,1	1,7 (±2,4)	7,6 (±2,1)
10	35	55	12,3-12,4	31,5-31,6	56,0-56,2	0,0 (±0,0)	24,6 (±1,7)
20	0	80	19,6-19,7	0,000	80,3-80,3	0,0 (±0,0)	10,0 (±0,9)
20	35	45	19,6-19,6	31,3-31,4	49,0-49,1	0,0 (±0,0)	22,3 (±1,2)

[±] Minimaal en maximaal gemeten concentraties

[&] Gemiddelde waarde + standaardafwijking (tussen haakjes) van twee waarnemingen

[®] In totaal is 5 µl etherische olie opgebracht (cymeen:linalool, ratio 2:8). De gemeten atmosferische concentraties (minimale-maximale concentratie) bedroegen: cymeen: 38-48 µg/l en linalool: 49-63 µg/l.

[§] Sterk afwijkende O₂-concentraties

Experiment 2 (15-04-1998)

Mortaliteit van Californische tripsadulten (Frankliniella occidentalis) bij verschillende samenstellingen van de controlled atmosphere (CA: ingestelde en werkelijk bereikte waarden) en met of zonder etherische olie gedurende een behandeling van twee uur bij 20 °C.

CA						% mortaliteit tripsadulten [‡]	
ingestelde waarden			werkelijk bereikte concentraties [‡]			geen olie	olie [®]
O ₂	CO ₂	N ₂	O ₂	CO ₂	N ₂		
0	0	100	0,000	<0,12	99,9-100	5,3 (±3,4)	91,3 (±0,2)
0	35	65	<0,001 <0,002	28,4-28,8 32,9-33,0	71,2-71,6 67,0-67,1	0,0 (±0,0) 2,9 (±4,0)	92,6 (±2,1) 83,1 (±0,3)
2	0	98	3,6-3,7 2,1-2,7	0,98-0,99[§] 0,17-0,18	95,3-95,4 97,2-97,7	0,0 (±0,0) 0,0 (±0,0)	42,6 (±4,5) 14,4 (±7,9)
2	35	63	n.b. [*]	n.b.	n.b.	-	-
10	0	90	9,3-9,3	2,3-2,3[§]	88,4-88,5	0,0 (±0,0)	46,6 (±17,4)
10	35	55	9,2-9,4 9,3-9,3	32,4-32,6 31,6-31,7	58,2-58,3 59,0-59,1	0,0 (±0,0) 2,8 (±3,9)	54,5 (±10,3) 57,7 (±4,8)

[‡] Minimaal en maximaal gemeten concentraties

[‡] Gemiddelde waarde + standaardafwijking (tussen haakjes) van twee waarnemingen

[®] In totaal is 5 µl etherische olie opgebracht (cymeen:linalool, ratio 2:8). De gemeten atmosferische concentraties (minimale-maximale concentratie) bedroegen: cymeen: 41-48 µg/l en linalool: 57-64 µg/l.

[§] Sterk afwijkende O₂-concentraties

^{*} Ingestelde waarden van de CA niet bereikt

Experiment 3 (21-04-1998)

Mortaliteit van Californische tripsadulten (Frankliniella occidentalis) bij verschillende samenstellingen van de controlled atmosphere (CA: ingestelde en werkelijk bereikte waarden) en met of zonder etherische olie gedurende een behandeling van twee uur bij 20 °C.

CA						% mortaliteit tripsadulten [†]	
ingestelde waarden			werkelijk bereikte concentraties [‡]			geen olie	olie [®]
O ₂	CO ₂	N ₂	O ₂	CO ₂	N ₂		
0	0	100	<0,56	0,000	99,5-99,9	1,0 (±1,6)	92,4 (±4,4)
0	35	65	<0,17	36,9-38,8	61,1-62,9	4,4 (±6,2) ²	93,2 (±4,6)
2	0	98	1,7-2,3	<0,41	97,7-99,7	3,0 ¹	44,5 (±4,8)
2	35	63	2,6-3,6	32,8-35,9	62,2-64,1	2,9 ¹	79,7 (±9,1)
10	0	90	13,0-13,5	<0,06	85,5-87,0	0,0 ¹	32,5 (±13,0)
10	35	55	8,9-10,5	32,3-43,0	47,5-58,8	0,0 ¹	98,1 (±1,6)

[‡] Minimaal en maximaal gemeten concentraties

[&] Gemiddelde waarde + standaardafwijking (tussen haakjes) van drie waarnemingen

² gemiddelde waarde van twee waarnemingen

¹ één waarneming per behandeling

[®] In totaal is 5 µl etherische olie opgebracht (cymeen:linalool, ratio 2:8). De concentraties olie in de atmosfeer zijn niet bepaald

Experiment 4 (28-04-1998)

*Mortaliteit van Californische tripslarven (*Frankliniella occidentalis*) bij verschillende samenstellingen van de controlled atmosphere (CA: ingestelde en werkelijk bereikte waarden) en met of zonder etherische olie gedurende een behandeling van vier uur bij 20 °C.*

CA						% mortaliteit tripslarven [†]	
ingestelde waarden			werkelijk bereikte concentraties [‡]			geen olie	olie [@]
O ₂	CO ₂	N ₂	O ₂	CO ₂	N ₂		
0	0	100	<0,43	< 0,37	99,4-99,9	10,0 (± 12,3)	57,8 (± 2,5)
0	35	65	<0,38	36,9-38,7	60,9-62,7	9,0 (± 6,3)	75,8 (± 14,0)
2	0	98	1,7-2,2	<0,50	97,3-98,3	0,0 (± 0,0)	27,2 (± 7,3)
2	35	63	1,8-2,7	33,0-37,9	60,0-64,5	1,9 (± 1,6)	30,4 (± 11,3)
10	0	90	12,5-14,7	<0,19	85,2-87,5	2,3 (± 4,0)	7,1 (± 1,1)
10	35	55	9,5-11,2	35,2-42,0	48,5-53,7	1,2 (± 2,1)	58,7 (± 6,4)

[‡] Minimaal en maximaal gemeten concentraties

[&] Gemiddelde waarde + standaardafwijking (tussen haakjes) van drie waarnemingen

[@] In totaal is 5 µl etherische olie opgebracht (cymeen:linalool, ratio 2:8). De concentraties olie in de atmosfeer zijn niet bepaald

Experiment 5 (28-04-1998)

Mortaliteit van ongevleugelde adulten of laatste nimfale stadium van de groene perzikluis (Myzus persicae) bij verschillende samenstellingen van de controlled atmosphere (CA: ingestelde en werkelijk bereikte waarden) en met of zonder etherische olie gedurende een behandeling van vier uur bij 20 °C.

CA						% mortaliteit groene perzikluis [§]	
ingestelde waarden			werkelijk bereikte concentraties [‡]			geen olie	olie [®]
O ₂	CO ₂	N ₂	O ₂	CO ₂	N ₂		
0	0	100	<0,43	< 0,37	99,4-99,9	37,5 (±17,8)	98,2 (±1,5)
0	35	65	<0,38	36,9-38,7	60,9-62,7	67,5 (±20,0)	95,2 (±1,6)
2	0	98	1,7-2,2	<0,50	97,3-98,3	25,0 (±10,6)	96,6 (±3,1)
2	35	63	1,8-2,7	33,0-37,9	60,0-64,5	45,5 (±19,3)	93,0 (±5,0)
10	0	90	12,5-14,7	<0,19	85,2-87,5	7,3 (±3,3)	95,9 (±1,0)
10	35	55	9,5-11,2	35,2-42,0	48,5-53,7	43,6 (±16,8)	94,5 (±2,0)

[‡] Minimaal en maximaal gemeten concentraties

[&] Gemiddelde waarde + standaardafwijking (tussen haakjes) van drie waarnemingen

[®] In totaal is 5 µl etherische olie opgebracht (cymeen:linalool, ratio 2:8). De concentraties olie in de atmosfeer zijn niet bepaald

Experiment 6 (12-05-1998)

Mortaliteit van Californische tripsadulten (Frankliniella occidentalis) bij verschillende samenstellingen van de controlled atmosphere (CA: ingestelde en werkelijk bereikte waarden) en met of zonder etherische olie gedurende een behandeling van twee uur bij 20 °C.

CA						% mortaliteit tripsadulten [†]	
ingestelde waarden			werkelijk bereikte concentraties [‡]			geen olie	olie [@]
O ₂	CO ₂	N ₂	O ₂	CO ₂	N ₂		
0	10	90	<0,48	11,1-11,7	88,0-88,4	-*	99,0 (±1,8)
0	20	80	<0,43	21,6-22,5	77,0-78,3	-	99,1 (±1,5)
0	35	65	<0,38	35,3-37,1	62,5-64,3	-	95,2 (±1,7)
2	10	88	2,6-3,2	10,5-10,9	86,2-86,6	-	75,2 (±8,8)
2	20	78	2,2-3,0	17,6-23,1	73,9-79,3	-	88,3 (±12,2)
2	35	63	3,0-3,9	31,1-34,4	62,2-65,0	-	74,3 (±3,6)
10	10	80	11,5-11,6	11,2-11,6	76,9-77,2	-	91,3 (±4,5)
10	20	70	11,8-12,0	20,2-21,9	66,2-67,7	-	98,0 (±3,4)
10	35	55	10,7-11,0	34,9-35,4	53,8-54,2	-	95,3 (±1,6)

Sterfte in controle groepen, bestaande uit 100% N₂ en normale atmosfeer (beide zonder etherische olie), bedroeg respectievelijk 6,3% en 0%.

[‡] Minimaal en maximaal gemeten concentraties

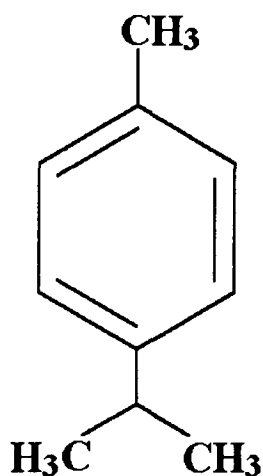
[&] Gemiddelde waarde + standaardafwijking (tussen haakjes) van drie waarnemingen

[@] In totaal is 5 µl etherische olie opgebracht (cymeen:linalool, ratio 2:8). De concentraties olie in de atmosfeer zijn niet bepaald

^{*} Controles zonder olie zijn niet gedaan

p-Cymene

Chemical formula: C₁₀H₁₄



Preferred name: *p*-Cymene
Synonyms: *para*-isopropyltoluene; 4-isopropyl-1-methylbenzene;
p-cymol
CAS Registry number: 99-87-6

Official classification:

C.E.: List B (CE, 1992);
upper level: 5 mg/kg (beverages and food)
except: condiments, seasonings: 100 mg/kg (CE, 1992).

METABOLISM

p-Cymene is readily absorbed through the skin (Wepierre, 1963; Wepierre *et al.*, 1968), gastro-intestinal tract (Bakke & Scheline, 1970; Ishida *et al.*, 1981; Southwell *et al.*, 1980) and lungs (Gerarde, 1960) in a variety of mammalian species. The majority of the absorbed fraction is metabolised in the liver and excreted in the urine (Ishida *et al.*, 1981; Southwell *et al.*, 1980; Walde *et al.*, 1983). Early studies in dog, sheep, brushtail possum and koala indicated that the major pathway was oxidation of the methyl group to give cumic acid, followed by its conjugation with glycine to give cuminuric acid. However, more recent studies identified more than 20 metabolites in the urine of rabbit, rat and guinea-pig, and qualitative as well as quantitative differences have been reported between the three species. The first evidence that *p*-cymene can undergo aromatic hydroxylation, with the formation of carvacrol, was obtained in guinea pig (Scheline, 1991).

TOXICOLOGICAL DATA

LOCAL EFFECTS

Skin Irritation

Human

The neat material has been reported to be a mild skin irritant (CHRIS, 1991; Gerarde, 1960) [presumably in man, although the basis for this statement is not clear]. No irritation was seen in 25 volunteers given 48-hr covered patch tests with 4% in petrolatum (Kligman, 1972) or in ten volunteers given ten daily 24-hr covered applications of up to 4% in petrolatum or diethyl phthalate (Kligman, 1973). Ointment containing 30% cymene [apparently *para*-isopropyltoluene] has been used as a local analgesic, and thus was presumably non-irritant at this concentration (Martindale, 1989).

Non-human

p-Cymene was moderately irritating when applied neat under cover for 24 hr to intact or abraded rabbit skin (Moreno, 1973) and when applied to guinea-pigs (Stelmakh *et al.*, 1983). Multiple applications of the neat material caused swelling, hair loss and some bleeding, in rats (Stelmakh *et al.*, 1986).

Eye Irritation

Human

A brief and unsubstantiated comment indicates that contact with p-cymene causes mild eye irritation (CHRIS, 1991).

Other Local Effects

Human

p-Cymene has been described as irritant to the mucous membranes [presumably in man, although experimental support for this statement was not given] (Lee, 1987). Ointment containing 30% cymene [apparently *para*-isopropyltoluene] produced local analgesia when applied to the skin (Martindale, 1989).

Non-human

Slight local irritation was seen when rats were exposed by inhalation to 27-55 g/m³ for four consecutive periods of 20-50 minutes, with time to recover between exposures (Furnas & Hine, 1958).

SENSITIZATION AND INTOLERANCE

Human

In an unsuccessful attempt to induce sensitization (following the maximization procedure) none of 25 subjects displayed local reactions when given patch tests with 4% p-cymene in petrolatum, followed by a challenge with the same concentration (Kligman, 1972). The maximization procedure involves an induction phase of five 48-hr closed patch tests over a 15-day period followed after a 2-wk rest by a final 48-hr closed challenge patch (Kligman & Epstein, 1975). p-Cymene is included in a list of potential sensitizers with a concentration of 1% in petrolatum recommended for diagnostic [24/48-hr covered] patch tests (Fisher, 1975). [The basis for its inclusion is not given.]

Non-human

A study indicated that p-cymene caused sensitization in guinea-pigs (Stelmakh *et al.*, 1983).

GENERAL SYSTEMIC EFFECTS

Acute data

Non-human

Oral: Rat LD₅₀: 4.75 g/kg bw (Jenner *et al.*, 1964).

When given by stomach tube, the average lethal dose in rats was 5.11 g/kg bw and in mice was 2.2 g/kg bw (Stelmakh *et al.*, 1983), while in another study a dose of 4.3 g/kg bw killed nine out of ten rats (Gerarde, 1960). Rats and mice given near lethal doses displayed various central nervous system (CNS) effects, diarrhoea, bloody tears, shallow breathing and a scrawny appearance (Jenner, 1964; Stelmakh *et al.*, 1983).

Dermal: Rabbit LD₅₀: > 5g/kg bw [24-hr covered contact] (Moreno, 1973).

Rats given an apparently single application of 0.5 g/kg bw had changes in the cellular fraction of the blood after 6 days (Stelmakh *et al.*, 1986).

Rats died following immersion of the tail for 4 hr in neat p-cymene or in a 50% dilution [in an unspecified oil], whilst concentrations of 25% or greater caused tissue abnormalities (Stelmakh *et al.*, 1986). [It was not possible to estimate the doses involved in this study.]

Inhalation: Rat. Breathing difficulties, twitching, quivering, salivating, depression of the CNS, failure of muscular co-ordination, respiratory arrest and death occurred when rats were exposed to 27-55 g/m³ for four consecutive periods of 20 to 50 minutes, with time to recover between exposures. No tissue changes were seen in the brain, spinal cord or sciatic nerve (Furnas & Hine, 1958). Exposure to 5 g/m³ for an unspecified period was fatal (Anon., 1960), whereas undefined high exposures, probably for 2-3 hr, produced tremors, convulsions, lethargy, shallow breathing and virtual coma (Stelmakh *et al.*, 1983). Rats exposed to 172 mg/m³ or greater for 4 hr showed behavioural, reflex and body temperature changes, which were not seen at 70 mg/m³ (Stelmakh *et al.*, 1986).

Mouse. The average lethal concentration was claimed to be 24 g/m³ [exposure period and temperature unspecified] (Stelmakh *et al.*, 1983).

Mice exposed to [undefined] high concentrations, apparently for 2-3 hr, had tremors and convulsions, followed by lethargy, shallow breathing, and virtual coma (Stelmakh *et al.*, 1983). No overt toxicity was seen in mice exposed to an atmosphere saturated with p-cymene [for an unspecified period] (Gerarde, 1960). [Saturated air at 17.3°C contains about 7 g p-cymene/m³ (Gerarde, 1960).] Exposure to 282 mg/m³ or greater for 2 hr produced effects upon mobility, body temperature, and certain reflex and behavioural responses, while 162 mg/m³ caused none of these effects nor changes in unspecified blood or biochemical [probably urinary] parameters (Stelmakh *et al.*, 1986).

Intraperitoneal: The average lethal dose in mice was 1.44 g/kg bw (Stelmakh *et al.*, 1983). Deaths occurred when 2.16 g/kg was injected into guinea-pigs (Chassevant & Garnier, 1903).

Intravenous: Rats given 324 mg/kg bw, over a period of 1 hr, displayed disturbances in a reflex reaction (Tham *et al.*, 1984).

Subacute data

Human

Oral: Daily administration of 3-4 g [approximately 43-57 mg/kg bw/day] for 2-3 days caused nausea, headache and vomiting (Zeigler, 1873).

Non-human

Oral: According to an unclear report, in a study mice were given 0.22 g p-cymene / kg bw [probably] daily for 4 days by stomach tube. This dose was apparently increased by a factor of 1.5 every 4 days for a total of 24-28 days [giving a final maximum dose apparently of about 1.65 g/kg bw daily], when reduced mobility was reported (Stelmakh *et al.*, 1983). [Only overt effects were apparently recorded in

this study.]

Rats given approximately 0.5 g/kg bw/day or greater for 60 days by stomach tube suffered unspecified toxic effects, whilst doses of 1 g/kg bw/day did not cause deaths. Higher doses [probably around 2.5 g/kg bw/day] affected the nervous system, liver (increased weight and enzyme activity), kidneys (increases in weight and the excretion of protein and urea) and blood cells (Stelmakh *et al.*, 1986).

Dogs given 2 g/day [approximately 0.2 g/kg bw/day, apparently orally] experienced no overt adverse effects apart from diarrhoea (Gerarde, 1960).

Dermal: Twenty-one applications [probably daily] caused decreases in body temperature, reflex responses and blood haemoglobin levels in rats (Stelmakh *et al.*, 1986). [It was not possible to estimate the doses administered.]

Inhalation: Male rats were exposed to 50 or 250 ppm *p*-cymene 6 hr/day, 5 days/wk, for a period of four weeks, followed by an exposure-free period of eight weeks. Yield of synaptosomal proteins, isolated from whole brain minus cerebellum, was statistically significantly reduced; synaptosomal noradrenaline and dopamine concentrations and acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and lactate dehydrogenase activities were statistically significantly increased when expressed relative to synaptosomal proteins (Lam *et al.*, 1996).

Injection: Subcutaneous injection at 1.7 g/day [approximately 0.85 g/kg bw/day] for 2 days produced some changes in the white blood cells and bone marrow in rabbits (Woronow, 1929).

Chronic data

Human

Inhalation: A worker in the sulphite paper pulp industry exposed for 20 yr to vapours from a mixture containing 0.034% *p*-cymene (and unspecified concentrations of other chemicals) developed, over a period of about 20 months, weakness, breathing difficulty, nose bleeds, severe anaemia, and an abnormality of the bone marrow followed by death from cerebral haemorrhage. The worker constantly handled and frequently chewed pieces of sulphite pulp. Although the investigator suggested that the fatal symptoms were possibly due to the *p*-cymene exposure (Carlson, 1946), others have pointed out that this association has not been convincingly established (Gerarde, 1960; Lee, 1987). According to a brief citation, exposure to about 1.1-2.7 g *p*-cymene / m³ caused dizziness, headaches and nausea (OHMTADS, 1991). [No further details were provided.]

GENOTOXICITY AND MUTAGENICITY

There was no mutagenic activity in tests with *p*-cymene in the bacterium *Escherichia coli*, in the absence of a metabolic activation system (Szybalski, 1958) or with isopropyltoluene [unspecified isomer] in a fairly limited Ames test using the bacterium *Salmonella typhimurium* in the presence of a liver metabolic activation system (Rockwell & Raw, 1978).

An old report indicated that isopropyltoluene [unspecified isomer] had no effect on the appearance of the chromosomes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, in the absence of an added metabolic activating system (Levan, 1947).

EMBRYOTOXICITY AND TERATOGENICITY

No relevant data identified.

CARCINOGENICITY

No relevant data identified.

References:

- Anon. (1960) *J. Water Pollut. Contr. Fed.* **32**: 65 (Cited in OHMTADS, 1991).
- Bakke O.M. & Scheline R.P. (1970) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **16**: 691.
- Carlson G.W. (1946) *Ann. Intern. Med.* **24**: 277.
- CE (1992). *Flavouring substances and natural sources of flavourings, Part I. (Blue Book) 4th Ed., Council of Europe, Maisonneuve, Strasbourg.*
- Chassevant A. & Garnier M. (1903) *C.r. Séanc. Soc. Biol.* **55**: 1255 (cited in Lee, 1987).
- CHRIS (1991) Chemical Hazard Response Information Database.
- Fisher A.A. (1975) *Contact Dermatitis* **1**: 166.
- Furnas D.W. & Hine C.H. (1958) *A.M.A. Archs Ind. Hlth* **18**: 9.
- Gerarde H.W. (1960) *Toxicity and Biochemistry of Aromatic Hydrocarbons.* Elsevier, Amsterdam.
- Ishida T. *et al.* (1981) *J. Pharmacol. Sci.* **70**: 406.
- Jenner P.M. *et al.* (1964) *Fd Cosmet. Toxicol.* **2**: 327.
- Kligman A.M. (1972) Report to the Research Institute for Fragrance Materials (RIFM), 1 November (Cited in Opdyke, 1974).
- Kligman A.M. (1973) Report to the Research Institute for Fragrance Materials (RIFM), 11 June (Cited in Opdyke, 1974).
- Kligman A.M. & Epstein W. (1975) *Contact Dermatitis* **1**: 231.
- Lam H.R. *et al.* (1996) *Pharmacol. & Toxicol.* **79**: 225.
- Lee E.W. (1987) In: *Ethel Browning's Toxicity and Metabolism of Industrial Solvents. Vol.1: Hydrocarbons. 2nd Ed. Edited by R. Snyder. p.105.* Elsevier, New York.
- Levan A. (1947) *Hereditas* **33**: 457.
- Martindale (1989) *The Extra Pharmacopoeia. 29th Edition, p.31; The Pharmaceutical Press, London.*
- Moreno O.M. (1973) Report to the Research Institute for Fragrance Materials (RIFM), 25 April (Cited in Opdyke, 1974).
- OHMTADS (1991). *Oil and Hazardous Materials Technical Assistance Data System.*
- Opdyke D.L.J. (1974) *Fd Cosmet. Toxicol.* **12**: 401.
- Rockwell P. & Raw I. (1978) *Nutr. Cancer* **1**: 10.
- Scheline R. (1991) *Handbook of Mammalian Metabolism of Plant Compounds.* p.15; CRC Press;
- Southwell I.A. *et al.* (1980) *Xenobiotica* **10**: 17.
- Stelmakh V.A. *et al.* (1983) *Zdravookhr. Beloruss.* **3**: 41.
- Stelmakh V.A. *et al.* (1986) *Zdravookhr. Beloruss.* **5**: 39.
- Szybalski W. (1958) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **76**: 475.
- Tham R. *et al.* (1984) *Acta Pharmac. Tox.* **54**: 58.
- Walde A. *et al.* (1983) *Xenobiotica* **13**: 503.
- Wepierre J. (1963) *C.r. Acad. Sci.* **256**: 4529 (cited in Lee, 1987).
- Wepierre J. *et al.* (1968) *Eur. J. Pharmacol.* **3**: 47 (cited in Lee, 1987).
- Woronow A. (1929) *Virchows Arch. Path. Anat. Physiol.* **271**: 173 (cited in Lee, 1987).
- Zeigler E. (1873) *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Path. Pharmac.* **1**: 63 (cited in Lee, 1987).