

# Efeito da mobilização do solo nas micorrizas arbusculares de cereais de Inverno

## Effects of soil management on arbuscular mycorrhizal fungi in autumn-sown crops

I. Brito<sup>1</sup>, M. de Carvalho<sup>1</sup>, D. van Tuinen<sup>2</sup> & M. J. Goss<sup>3</sup>

### RESUMO

A mobilização do solo reduz a taxa de colonização por micorrizas arbusculares (MA) uma vez que ao provocar a disrupção do micélio extraradicular, faz com que a colonização seja preferencialmente iniciada por fontes de inoculo de crescimento mais lento. Em solos pouco perturbados, o aumento da taxa de colonização micorrízica é normalmente associado, embora nem sempre, a uma vantagem comparativa destas plantas numa fase inicial do crescimento.

No sentido de potenciar os benefícios proporcionados pela micorrização e numa óptica de sustentabilidade dos sistemas agrícolas, é fundamental o desenvolvimento de conhecimentos que elucidem sobre a ecologia funcional das MA nestes sistemas.

O trabalho desenvolvido em condições de campo no Alentejo permitiu confirmar de forma clara que raízes de trigo e de triticales cultivados em sistema de sementeira directa (SD) apresentaram uma taxa de colonização micorrízica superior, em cerca de 6 vezes, quando comparadas com raízes de plantas das mesmas espécies cultivadas em sistema de mobilização tradicional (MT). Os resul-

tados obtidos indicam também que o triticale parece ser mais micotrófico que o trigo.

Para uma melhor compreensão das implicações desta situação nas plantas desenvolveram-se ensaios em vasos. A perturbação do solo induzida pela mobilização foi reproduzida através da crivagem do solo por um crivo de 4mm. Vários parâmetros de crescimento da planta e de colonização micorrízica foram avaliados. Após 4 ciclos de 3 semanas de cultura de trigo com indução diferencial de estrutura ao nível do solo, todos os parâmetros de colonização micorrízica foram significativamente afectados. A colonização arbuscular, vesicular e por hifas foi maior em solo não perturbado. Presentemente esta metodologia de ciclos de perturbação do solo está a ser usada para avaliar diferentes aspectos da micorrização como sejam a sobrevivência de inoculo ao longo do Verão e a sua capacidade para gerar novas colonizações no período cultural.

Com o objectivo de avaliar a diversidade dos Glomeromycota presentes no campo de ensaios em estudo, sujeito aos dois tipos de mobilização do solo (SD e MT), foi usada a técnica de amplificação de sequências de rDNA destes fungos a partir de

---

<sup>1</sup> Instituto de Ciências Agrárias Mediterrâneas (ICAM), Universidade de Évora, Apartado 94, 7002 - 554 Évora, e-mail: ibrito@uevora.pt; <sup>2</sup> Université de Bourgogne, PME INRA CMSE, <sup>3</sup> University of Guelph, Kemptville College

DNA total do solo. Esta técnica permite uma avaliação abrangente, evitando a morosidade e complexidade da abordagem clássica através de culturas armadilha. No total foram analisadas 87 sequências, provenientes de solo perturbado e não perturbado, e encontrados 11 tipos ribossomais. Considerando as diferenças de frequência dos tipos ribossomais presentes em cada tipo de solo, os resultados parecem confirmar que os fungos micorrízicos arbusculares são diferencialmente susceptíveis à perturbação do solo, não só em termos de diversidade como ao nível da estrutura da comunidade.

### ABSTRACT

Soil tillage may markedly reduce the rate of arbuscular mycorrhiza (AM) establishment by breaking up the living AM fungal mycelium in the soil. In no till or reduced till management, this mycelium can allow earlier AM formation.

Work under field conditions in a Mediterranean climate clearly confirmed that wheat plants cultivated under no-till system had a 6 fold greater mycorrhizal colonization than those grown using a conventional tillage system.

Pot experiments were initiated to determine the benefit of the timing of colonization on plants. Soil disturbance induced by tillage practices was simulated by passing the soil through a 4 mm sieve at the start of each successive period of 3 weeks plant growth cycles. After 4 cycles of plant growth (wheat), significant effects in all colonization parameters were detected. Arbuscular, vesicular and hyphal colonization were clearly higher in undisturbed soil.

To gain a global overview of the diversity of Glomeromycota under the 2 cultivation systems in the experimental field,

rDNA sequences from the fungi have been amplified successfully from DNA extracted directly from field soil. In total 87 sequences were analysed, half from each kind of soil (undisturbed and disturbed). Based on differences observed in the frequency of the ribotypes present in soils under different tillage treatments, the results support the view that AMF are differently vulnerable to soil disturbance, not only in terms of diversity, but also in terms of the community structure.

### INTRODUÇÃO

As micorrizas arbusculares (MA), constituem a simbiose entre plantas e fungos mais frequente na terra, é formada por fungos do solo pertencentes ao filo Glomeromycota e raízes da maioria das plantas terrestres. Mais de 80% das espécies das plantas conhecidas, incluindo as de interesse agrícola formam este tipo de micorrizas, podendo encontrar-se nos mais variados habitats (Smith & Read, 1997) desde desertos às florestas tropicais, em altitudes e latitudes elevadas, para além de ecossistemas aquáticos. As MA constituem uma simbiose mutualista em que o fungo obtém o carbono necessário ao seu metabolismo a partir da planta colonizada, representando 10 a 20% dos produtos resultantes da sua actividade fotossintética (Graham, 2000). O micélio extraradical produzido pelo fungo constitui uma ligação entre as raízes da planta e o solo, transportando nutrientes minerais do solo à planta e proporcionado desta forma a troca bidirecional entre simbioses. Esta capacidade assume particular importância para os nutrientes que são transportados no solo por processos de difusão lentos e/ou são facilmente imobilizados, como acontece com o fósforo (P). O micélio extraradical desenvolvido faz com

que o volume de solo disponível para a absorção de P vá para além da zona de depleção que rapidamente se estabelece em torno das raízes activas em termos de absorção (Clark & Zeto, 2000). A planta micorrizada beneficia ainda de uma série de vantagens comparativas (Gupta *et al.*, 2000): alívio do stress hídrico, protecção contra patógenos da raiz (nematóides, fungos, bactérias), tolerância a metais pesados tóxicos, tolerância a condições de temperaturas muito altas ou baixas, níveis de salinidade elevada no solo, pH elevado ou baixo, melhor adaptação após transplante ou ainda melhoria ao nível da agregação de partículas do solo.

A actividade agrícola provoca alterações químicas, físicas e da componente biológica ao nível do solo, interferindo deste modo na formação e desempenho das MA de um determinado local. Em solo sujeito a mobilização tem-se observado que a taxa de colonização micorrízica das plantas é menor, uma vez que a mobilização provoca a ruptura do micélio extraradical fazendo com que o estabelecimento de novas colonizações dependa de formas de inóculo de crescimento mais lento (esporos e fragmentos de raiz colonizados). Em solos não perturbados o aumento da colonização por MA está geralmente, embora nem sempre (McGonigle *et al.*, 1999) associada a uma vantagem comparativa das plantas desde os estados iniciais da cultura.

As práticas culturais que potenciam a utilização das simbioses que naturalmente ocorrem são desejáveis, não só devido à impraticabilidade de se fazerem inoculações em larga escala mas também à necessidade de conhecer melhor a diversidade dos fungos micorrízicos arbusculares (AMF) na região mediterrânica (Abbott *et al.*, 1995).

Alguns dos maiores desafios que actualmente se colocam à investigação na

área das MA prendem-se com a necessidade de encontrar métodos práticos que permitam descrever comunidades e identificar e avaliar a funcionalidade da biomassa micorrízica, relacionando esta informação com a eficiência na aquisição de nutrientes. Torna-se cada vez mais evidente que a resposta a estas questões implica abordagens multidisciplinares, começando agora a surgir resultados (Jakobsen *et al.*, 2004) que resultam da integração de estudos da componente molecular, fisiológica e ecológica.

Recorrendo a ensaios de campo, experiências em vasos e estudos de biologia molecular o presente trabalho procura saber se, em condições mediterrânicas e com um determinado tipo de rotação (trigo, triticales, girassol), a mobilização tradicional do solo e a sementeira directa têm algum efeito na taxa de colonização micorrízica de cereais de Inverno, na performance da planta e na diversidade dos AMF do campo em estudo.

O recurso a sistemas de mobilização do solo adequados permitirá tirar melhor partido do inóculo natural de AMF, conduzindo a sistemas agrícolas preferencialmente mais produtivos e seguramente mais sustentáveis.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Experiência 1

Na região do Alentejo (38° 28' N-7° 28' W) uma experiência de campo foi conduzida para avaliar o efeito da mobilização tradicional (MT) e da sementeira directa (SD) na evolução da colonização micorrízica de raízes de trigo e de triticales como culturas de Inverno de uma rotação, ao longo do período vegetativo. O solo é um Luvisolo (pH 5 a 6, P 14 a 28 ppm em MT e 18 a 44 ppm em SD). O ensaio foi delineado em blocos casualizados, com 3 repetições de

campo. Cada 2 semanas, entre Março e Junho, foram colhidas 4 plantas por talhão (6x35 m). As raízes foram isoladas, coradas com azul de tripano e a % de colonização micorrízica avaliada de acordo com Giovannetti & Mosse, (1980) em 3 sub-amostras por talhão.

## Experiência 2

A variabilidade edafoclimática faz com que seja difícil avaliar a influência dos vários factores no desenvolvimento da planta. Assim estabeleceram-se ensaios em vaso, sob condições controladas, para avaliar o impacto das diferenças de colonização observadas em condições de campo. Adaptou-se um sistema desenvolvido por McGonigle & Miller (2000) em que a perturbação do solo induzida pela mobilização é reproduzida através da crivagem do solo por um crivo de 4mm. A indução de diferenças estruturais ao nível solo faz-se pela realização de ciclos sucessivos de 3 semanas de cultura, em que o solo a perturbar é crivado entre cada ciclo.

O solo foi recolhido no local da experiência de campo (pH-6,2, P-25 ppm, N total-0,06%,  $\text{NO}_3^-$  14 ppm, MO-0,6%), seco ao ar e crivado (4 mm). A experiência foi conduzida em estufa em vaso de plástico de 6 l. Quatro sementes de trigo pré-germinadas foram colocadas em cada um dos 24 vasos e 5 dias depois eliminadas as excedentes de modo a ficarem apenas duas plantas por vaso. Três semanas após a emergência foram avaliados a altura das plantas e o peso seco. Em metade dos vasos removeram-se duas camadas de 10 cm que se passaram separadamente através de um crivo de 4 mm. Os pedaços de raiz que ficaram retidos no crivo foram cortados em fragmentos de 2 cm e misturado no solo da respectiva camada. O solo foi de novo colocado nos vasos respeitando a

posição inicial de cada uma das camadas. Nos restantes doze vasos o solo permaneceu sem qualquer perturbação. De novo, 4 sementes de trigo pré-germinadas foram colocadas em cada um dos 24 vasos, e um novo ciclo iniciado. Em cada ciclo, à excepção do último, uma semana após o transplante, foi aplicado nitrato de amónio ( $50 \mu\text{g N g}^{-1}$  de solo seco). Após o último ciclo as raízes foram separadas, coradas com azul de tripano e foi avaliada a percentagem de colonização micorrízica (McGonigle *et al.*, 1990) em 3 sub-amostras por vaso.

## Experiência 3

A amplificação de sequências de rDNA (DNA ribosomal) de Glomeromycota (van Tuinen *et al.*, 2004) a partir de DNA extraído directamente do solo permite uma percepção mais global da diversidade dos Glomeromycota de um dado local uma vez que evita o enviesamento introduzido pelo estabelecimento de culturas armadilha que são normalmente usadas para isolamento e identificação de AMF (Jansa *et al.*, 2002). Esta metodologia foi a adoptada no presente estudo.

As amostras do solo foram recolhidas em dois talhões adjacentes do campo de ensaios. Um deles sujeito a mobilização tradicional, assumindo-se como solo perturbado (Per.) e o outro sujeito a sementeira directa desde há 9 anos, que se assumiu como solo não perturbado (N Per.). Em cada talhão (6x35 m) foram recolhidas dez amostras com sonda (0-15 cm), constituindo-se uma amostra composta que foi crivada e mantida a 4 °C até ser analisada. De cada tipo de solo retiraram-se 3 sub-amostras de 200 mg e o DNA total foi isolado de acordo com Martin-Laurent, *et al.* (2001).

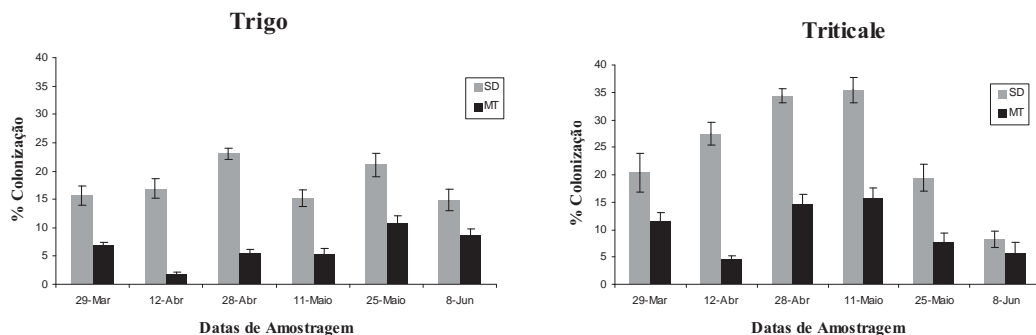
O DNA purificado foi usado para executar a primeira amplificação de PCR da extremidade 5' da LSU (large sub-unit) do rDNA. Usaram-se os primers LR1 (van Tuinen *et al.*, 1998) específico de eucariotas, e FLR2 (Trouvelot *et al.*, 1999)) específico de fungos. O produto da amplificação foi diluído e usado como “template” para a segunda PCR, com o primer específico de AMF FLR4 (Gollotte *et al.*, 2004) em combinação com LR1. Os produtos desta segunda amplificação foram clonados no vector (TOPO TA Cloning Kit for Sequencing, Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A preparação do plasmídeo foi feita usando o Nucleoplasmid kit (Macherey-Nagel) e a sequência feita pela MWG Biotech-AG (Alemanha). Todas as sequências foram verificadas quanto à presença de sequências quiméricas e alinhadas com recurso ao programa ClustalW. O alinhamento foi otimizado manualmente, com recurso ao software Se-Al v 2.0 (University of Oxford). Procedeu-se à análise filogenética usando o algoritmo de “neighbour joining”

(NJ) incluído no programa ClustalW, usando *Mortierella multidivariata* como “outgroup”. As posições com intervalos em aberto (gaps) foram ignoradas e a fiabilidade das ramificações internas do NJ foi avaliada usando o método de “bootstrap” com 1000 réplicas. Os ficheiros da árvore foram desenhados usando njplot (<http://biom3.univ-lyon1.fr>) e as sequências agrupadas em tipos ribossomais.

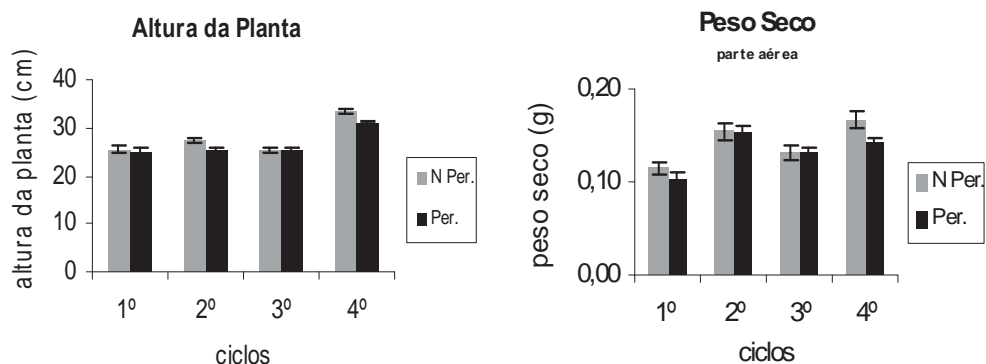
## RESULTADOS

### Experiência 1

Os resultados obtidos indicam que as plantas cultivadas em regime de SD evidenciam uma colonização micorrízica mais elevada do que as cultivadas em regime de MT e que o tritcale parece ser mais micotrófico que o trigo (Figura 1). A colonização micorrízica seguiu um padrão típico, mais evidente no tritcale, aumentado até à Primavera e decrescendo gradualmente a partir dessa altura.



**Figura 1** - % de colonização micorrízica de raízes de trigo e tritcale ao longo do ciclo vegetativo, em condições de campo. As barras representam o erro padrão da média



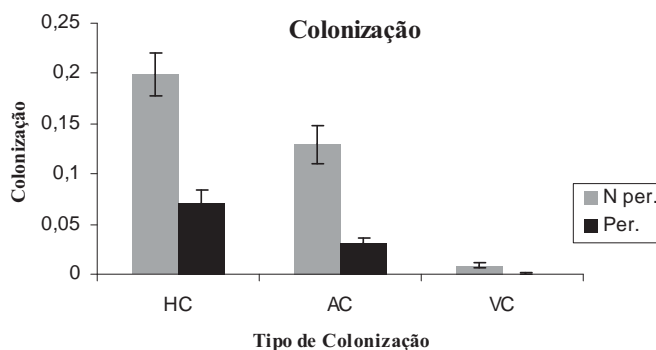
**Figura 2** - Altura de planta (cm) e peso seco da parte aérea (g) ao longo dos 4 ciclos, em solo não perturbado (N Per.) e perturbado (Per.). As barras representam o erro padrão da média

### Experiência 2

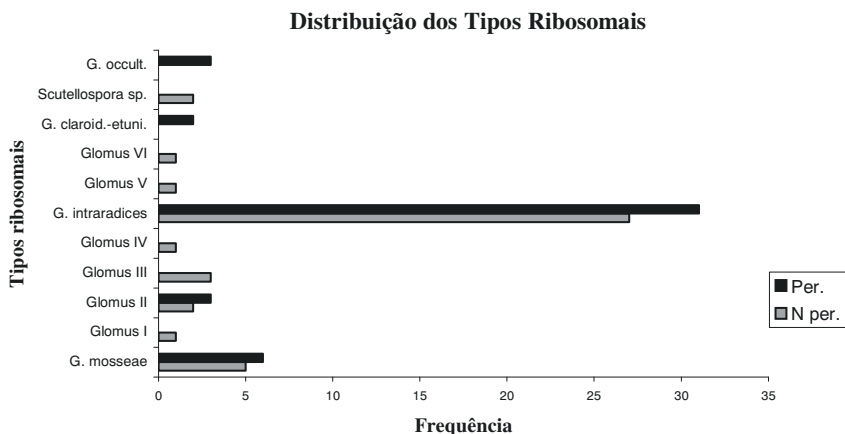
Após 4 ciclos de 3 semanas é perceptível, ao nível dos parâmetros da planta avaliados, o efeito da perturbação diferencial do solo. A altura da planta e o peso seco da parte aérea (Figura 2), são significativamente maiores em solo não perturbado.

A perturbação diferencial do solo afectou significativamente todos os parâmetros da colonização micorrízica (Figura 3). A colo-

nização de arbuscular (AC), vesicular (VC) e por hifas (HC) foi claramente maior em solo não perturbado. As diferenças observadas na AC e na VC em plantas com 3 semanas indicam que no solo não perturbado, onde o micélio extraradical não é quebrado, a colonização ocorre mais eficientemente/rapidamente (as vesículas são produzidas apenas quando a colonização está bem estabelecida) e em maior extensão.



**Figura 3** - Parâmetros da colonização micorrízica. AC - colonização arbuscular, VC - colonização vesicular, HC - colonização por hifas, em solo não perturbado (N Per.) e perturbado (Per.). As barras representam o erro padrão da média



**Figura 4** - Tipos ribosomais encontrados em solo perturbado (Per.) e não perturbado (N Per.) e suas frequências

### Experiência 3

Após o alinhamento da extremidade 5' da LSU do rDNA que cobre a região de D1 D2 (616 bases) de 87 sequências foram detectados 11 tipos ribosomais, com diferentes frequências (Figura 4). À exceção de um tipo ribosomal, identificado como pertencendo ao género *Scutellospora*, todos os restantes pertencem à ordem Glomineae, nomeadamente à família Glomaceae. Quatro tipos ribosomais foram identificados ao nível da espécie, a saber: *G. mosseae*, *G. intraradices*, *G. claroideum-etunicatum* e *G. occultum*. O tipo ribosomal que corresponde a *G. intraradices* foi o mais abundantemente encontrado em ambas as condições experimentais estudadas. De acordo com os dados obtidos apenas 3 dos tipos ribosomais (*G. mosseae*, *G. intraradices* e *Glomus II*) foram identificados em ambos os tipos de solo, 6 foram apenas encontrados em solo não perturbado e 2 apenas no solo perturbado.

### DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Vários estudos atestam que a ruptura do micélio extraradical de AMF influencia de forma negativa a subsequente taxa de colonização micorrízica das plantas (Fairchild & Miller, 1990; Douds Jr. *et al.*, 1995; Martins & Read, 1997; Goss & de Varennes, 2002). Contudo, a maioria destes estudos reconhece igualmente a necessidade de verificar esta tendência em situação de campo. Os resultados obtidos na experiência 1 parecem confirmar de forma clara que plantas de trigo e tritcale cultivadas em solo sujeito a sementeira directa evidenciam uma taxa de colonização micorrízica superior à observada nas mesmas espécies vegetais quando cultivadas em solo sujeito a mobilização tradicional.

A adaptação da metodologia dos ciclos com perturbação para indução de diferenças estruturais permitirá ultrapassar alguns dos constrangimentos do trabalho de campo, nomeadamente a variabilidade edafoclimática. Outra importante vantagem desta abor-

dagem consiste no facto de usar o inoculum natural de AMF, abrangendo toda a sua diversidade e formas. Esta metodologia está actualmente a ser usada para avaliar diferentes aspectos da micorrização, tais como a sobrevivência do inoculum ao longo do Verão e a sua capacidade para iniciar novas colonizações na época agrícola seguinte.

Considerando as diferenças observadas na frequência dos vários tipos ribossomais identificados em ambos os solos, os dados moleculares obtidos parecem confirmar que os AMF são diferencialmente susceptíveis à perturbação do solo, não só em termos da diversidade (Oehl *et al*, 2003), mas também ao nível da estrutura da comunidade (Franke-Snyder *et al*, 2001). A diversidade de tipos ribossomais encontrada em solo não perturbado é claramente mais elevada quando comparada com solo perturbado, indicando que a diversidade diminui com a perturbação do solo. Os dados obtidos permitirão o *design* de *primers* específicos de cada tipo ribossomal (Turnau *et al*, 2001), e assim perceber quais os tipos ribossomais que colonizam a planta ao longo do seu ciclo vegetativo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, L.K., Robson, A.D. & Scheltema, M.A. 1995. Managing soils to enhance mycorrhizal benefits in mediterranean agriculture. *Critical Reviews in Biotechnology*, **15**:213-228.
- Clark, R.B. & Zeto, S.K. 2000. Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *Journal of Plant Nutrition*, **23**:867-902.
- Douds Jr., D. D., Galvez, L., Janke, R. R. & Wagoner, P. 1995. Effect of tillage and farming system upon populations and distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Agric., Ecosis. and Envir.*, **52**: 111-118.
- Fairchild, G.L. & Miller, M.H. 1990. Vesicular-arbuscular mycorrhizas and the soil-disturbance-induced reduction of nutrient absorption in maize. *New Phytol.*, **114**:641-650.
- Franke-Snyder, M., Douds Jr, D. D., Galvez, L., Philips, J. G., Wagoner, P., Drinkwater, L. & Morton, J. B. 2001. Diversity of communities of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi present in conventional versus low-input agricultural sites in eastern Pennsylvania, USA. *Applied Soil Ecology*, **16**:35-48.
- Giovannetti, M. & Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.*, **84**:489-500.
- Gollotte, A., van Tuinen, D. & Atkinson, D. 2004. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing roots of the grass species *Agrostis capillaries* and *Lolium perenne* in a field experiment. *Mycorrhiza*, **14**:111-117.
- Goss, M.J. & de Varennes, A. 2002. Soil disturbance reduces the efficacy of mycorrhizal associations for early+ soybean growth and N<sub>2</sub> fixation. *Soil Biology and Biochemistry*, **34**:1167-1173.
- Graham, J.H. 2000. Assessing costs of arbuscular mycorrhizal symbiosis agroecosystem fungi. In G.K. Podila & D.D. Douds Jr (eds) *Current Advances in Mycorrhizal Research*, pp 127-140. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Gupta, V., Satyanarayana, T. & Garg, S. 2000. General aspects of mycorrhiza. In K.G. Mukerji, B.P., Chamola & J. Singh (eds) *Mycorrhizal Biology*, pp 27-44. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Jakobsen, I., Munkvold, L., Smith, A. & Smith, S. 2004. Functional diversity in nutrient acquisition by arbuscular mycorrhizal fungi. In J. Baar and E.Josten



- (eds), *Programme and abstracts of the COST-Meeting Role of Mycorrhiza in sustainable land management*. Applied Plant Research, WUR, Netherlands.
- Jansa, J., Mozafar, A., Anken, T., Ruh, R. & Sanders, I.R., Frossard, E. 2002. Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. *Mycorrhiza*, **12**: 225-234.
- Martin-Laurent, F., Philippot, L. Hallet, S. Chaussod, R. Germon, J. C. Soulas, G. & Catroux, G. 2001. DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl Environ Microbiol.*, **67**:2354-2359.
- Martins, M. & Read, D. J. 1997. Efeitos da distribuição do micélio externo de fungos micorrízicos arbusculares sobre o crescimento vegetal. *Pesq. Agropec. Bras.*, **32** (11):1183-1189.
- McGonigle, T. P., Miller, M. H. & Young, D. 1999. Mycorrhizae crop growth and crop phosphorus nutrition in maize-soybean rotations given various tillage treatments. *Plant and Soil*, **210**:33-42.
- McGonigle, T. P. & Miller, M. H. 2000. The inconsistent effect of soil disturbance on colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi: A test of the inoculum density Hypothesis. *Appl. Soil Ecol.*, **14**:147-155.
- McGonigle, T.P., Miller, M.H., Evans, D.G., Fairchild, G.L. & Swan, J. 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.*, **115**:495-501.
- Oehl, F., Sieverding, E., Ineichen, K., Mader, P., Boller, T. & Wiemken, A. 2003. Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe. *Appl Environ Microbiol.*, **69**:2816-2824.
- Smith, S.E. & Read, D.J. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London.
- Trouvelot, S., van Tuinen, D., Hijri, M. & Gianinazzi-Pearson, V. 1999. Visualization of ribosomal DNA loci in spore interphasic nuclei of glomalean fungi by fluorescence in situ hybridisation. *Mycorrhiza*, **8**:203-206.
- Turnau, K., Ryszka, P., Gianinazzi-Pearson, V. & van Tuinen, D. 2001. Identification of arbuscular mycorrhizal fungi in soils and roots of plants colonizing zinc wastes in southern Poland. *Mycorrhiza*, **10**:169-174.
- van Tuinen, D., Jacquot, E., Zhao, B., Golotte, A. & Gianinazzi-Pearson, V. 1998. Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. *Molecular Ecology*, **7**:879-887.
- van Tuinen, D., Charvolin, E. & Gianinazzi-Pearson, V. 2004. Ribosomal sequences as a tool to study and monitor arbuscular mycorrhizal fungi. In J. Baar and E.Josten (eds), *Programme and abstracts of the COST-Meeting Role of Mycorrhiza in sustainable land management*. Applied Plant Research, WUR, Netherlands.