

# OFFQ - Resultaten

## Impact van troposferisch ozon op de voedsel- en voederkwaliteit van Brassicaceae

DUUR VAN HET PROJECT  
15/12/2006 – 31/01/2011

BUDGET  
706.259€

### SLEUTELWOORDEN

Troposferisch O<sub>3</sub>, risico-analyse, Brassica napus, Brassica oleracea, koolzaad, broccoli, opbrengst, kwaliteit, dosis respons, antioxidantia, glucosinolaten, vitamines, voedselveiligheid, voedselvoorziening

### CONTEXT

Menselijke activiteiten hebben wereldwijd een tot nu toe ongeëvenaarde impact op het milieu, met belangrijke klimaatswijzigingen tot gevolg. Ozon (O<sub>3</sub>) is een natuurlijk voorkomend gas dat men zowel in de stratosfeer (10 – 40 km boven het aardoppervlak) als in de troposfeer (0-10 km boven de aarde) aantreft. Stratosferisch O<sub>3</sub> beschermt het aardoppervlak tegen schadelijke UV-stralen, troposferisch O<sub>3</sub> daarentegen is het derde belangrijkste broeikasgas (na CO<sub>2</sub> en CH<sub>4</sub>) (Denman *et al*, 2007; Solomon *et al*, 2007). Naast zijn bijdrage tot het broeikas effect is O<sub>3</sub> ook de belangrijkste luchtvervuilingscomponent in agrarische regio's en natuurgebieden met schadelijke gevolgen voor de menselijke gezondheid, materialen en vegetatie (WGE, 2004).

Verhoogde emissies ten gevolge van de verbranding van fossiele brandstoffen en biomassa (Gauss *et al*, 2006; Denman *et al*, 2007) en lange afstands-, zelfs intercontinentaal, transport van O<sub>3</sub> en zijn precursoren zijn verantwoordelijk voor een gestage toename van O<sub>3</sub> concentraties in landelijke gebieden op honderden en duizenden kilometers afstand van de vervuilingbron (Prather *et al*, 2003). Bijna een kwart van het aardoppervlak loopt momenteel het risico blootgesteld te worden aan O<sub>3</sub> concentraties boven 60 ppb op warme zomerdagen; lokaal kunnen deze concentraties zelfs nog veel hoger oplopen (Fowler *et al*, 1999 a,b). Dit is beduidend hoger dan de gemiddelde concentratie van 40 ppb, die schadelijk is bevonden voor gevoelige plantensoorten (Fuhrer *et al*, 1997; Mills *et al*, 2000; LRTAP Convention, 2007).

Verschuivende scenario's wijzen op een verdere toename van de troposferische O<sub>3</sub> concentraties in de 21<sup>ste</sup> eeuw (Gauss *et al*, 2003); simulaties voor de periode tussen 2015 en 2050 duiden op een toename tot 25% (Meehl *et al*, 2007). Daarenboven is ook het patroon van de O<sub>3</sub> blootstelling voor de vegetatie aan het wijzigen. Op basis van modellen werden door Dentener *et al* (2005) op wereldniveau een evolutie geschetst van de jaarlijkse gemiddelde O<sub>3</sub> concentraties van 1990 tot 2020. Dit wees op een toename van O<sub>3</sub> concentraties in alle landbouwgebieden van het noordelijk halfrond. In Noord-Amerika en West-Europa wordt wel een daling van de piekconcentraties verwacht (Gardner & Dorling, 2000), maar deze wordt teniet gedaan door een algemene toename van de achtergrondconcentraties. In delen van Azia, Latijns-Amerika en Afrika wordt deze stijging nog versterkt door steeds toenemende emissies van O<sub>3</sub> precursoren (NEG-TAP, 2001).

Ten gevolge hiervan zullen in deze gebieden ook de schadelijke gevolgen voor de vegetatie in belangrijke mate toenemen (Emberson *et al*, 2001). Daarnaast kan de landbouwproductie ook bijkomende nadelige gevolgen ondervinden door een wijziging van de interactie tussen planten en schadelijke insecten en pathogenen. Deze organismen kunnen bovendien zelf nog op hun beurt beïnvloed worden door wijzigende klimaatsomstandigheden, bijvoorbeeld ten gevolge van mildere winters.

Studies naar de invloed van O<sub>3</sub> op planten gaan van effecten op cellulair niveau tot voorspellingen op regionaal en internationaal niveau (EPA, 1996). O<sub>3</sub> schade aan plantaardig weefsel kan variëren van zichtbare bladschade tot een verminderde fotosynthesecapaciteit of een versnelde senescentie met gevolgen voor de opbrengst en kwaliteit van belangrijke landbouwgewassen, biodiversiteit en vitaliteit van de bossen. Deze effecten worden in de planten geïnduceerd door een toename van de reactieve zuurstof radicalen (ROS), zowel binnen als buiten de cel. Dit is een gemeenschappelijke factor voor verschillende vormen van stress, zowel ten gevolge van biotische als abiotische factoren. Deze stresscondities kunnen meerdere signaaltransductie pathways activeren die betrokken zijn bij antioxidatieve verdedigingsmechanismen. Alsgevolg hiervan kan O<sub>3</sub> ook interfereren met de respons van planten op andere natuurlijke stressfactoren zoals droogte (Bell, 1987). O<sub>3</sub> is dan ook een middel bij uitstek om deze mechanismen te bestuderen waarbij apoplastische ROS vorming betrokken is in de inductie van genexpressie. Op die manier kan de studie van O<sub>3</sub> stress bijdragen tot een beter begrip van het complex netwerk van signaaltransductie pathways die deel uitmaken van de antioxidatieve verdedigingsmechanismen van planten (Rao *et al*, 2000).

De antioxidatieve verdedigingsrespons beïnvloedt de productie van secundaire metabolieten zoals vitamines en glucosinolaten (GSLs). De productie van glucosinolaten vormt een uniek induceerbaar afweersysteem voor *Brassica* soorten dankzij het feit dat hun afbraakproducten fungicide, bactericide en insectwerende eigenschappen vertonen (Fenwick *et al*, 1989). Zeker zo belangrijk is de anticarcinogene capaciteit van deze stoffen. Dit verklaart het intens onderzoek naar hun werkingsmechanisme en de manipulatie van de metabolische pathways voor hun productie in de plant.



# OFFQ - Resultaten

## Impact van troposferisch ozon op de voedsel- en voederkwaliteit van Brassicaceae

Daarentegen kunnen overmatige concentraties in dierlijk voeder (door toevoeging van koolzaadsupplementen) aanleiding geven tot verminderde verteerbaarheid, verstoring van de schildklierwerking en bloedarmoede. Als antioxidantia spelen uiteraard ook vitamine C (ascorbaat, ASC) en vitamine E ( $\alpha$ -tocopherol,  $\alpha$ -TOC) een rol in de antioxidatieve plantrespons. Vanuit nutritioneel standpunt staan deze componenten gekend voor hun positieve effecten op de gezondheid: het is al lang duidelijk dat voeding rijk aan antioxidanten kan geassocieerd worden met een verminderd risico op hart- en vaatziekten en kanker. Een bijkomend argument voor de keuze van *Brassica*-soorten voor dit specifiek project is hun nauwe verwantschap met de modelplant *Arabidopsis thaliana*, waar het gehele genoom van gekend is. Voor de implementatie van deze fundamentele genetische kennis ter verbetering van belangrijke landbouwgewassen is het dan ook logisch om dit in de eerste plaats op *Brassica*-soorten uit te testen.

Het is duidelijk dat de voorspelde toename van de troposferische  $O_3$  concentraties een invloed zal hebben op toekomstige landbouw-ecosystemen en hun beheer. Het doel van dit project is na gaan in hoeverre dit de opbrengst, kwaliteit en veiligheid van *Brassica* producten kan beïnvloeden, zowel kwantitatief als kwalitatief. Tevens zal de meer fundamentele studie van de biochemische wijzigingen en effecten qua genexpressie bijdragen tot een betere kennis van de verdedigingsmechanismen die betrokken zijn bij de stressrespons van planten. Een betere kennis van deze interacties tussen planten en hun omgeving kan bijdragen tot nieuwe strategieën voor het behoud van opbrengst en kwaliteit van landbouwgewassen onder veranderende klimaatsomstandigheden. Zulke informatie is noodzakelijk om de volledige impact van toekomstige klimaatswijzigingen te kunnen inschatten en begrijpen, om zo tijdig de mogelijke risico's te identificeren en pro-actief de gepaste maatregelen te treffen (EPSO, 2005).

### DOELSTELLINGEN

- Een bijdrage leveren tot de risico-evaluatie van toenemende troposferische  $O_3$  vervuiling door door middel van betrouwbare  $O_3$  dosis-respons relaties voor koolzaad en broccoli. Niet alleen de economische opbrengst, maar ook de kwaliteit van het marktproduct wordt bekeken. Hiervoor worden koolzaad- en broccoligewassen gedurende hun ganse groeiperiode blootgesteld aan verhoogde  $O_3$  concentraties onder condities die de veldomstandigheden zo dicht mogelijk benaderen, gevolgd door een kwantitatieve en kwalitatieve analyse van de eindproducten.
- Ontwikkeling van een fluxmodel voor de berekening van de  $O_3$  opname in koolzaad en broccoli in functie van omgevingsfactoren zoals luchtvochtigheid, lichtintensiteit, temperatuur en plantfenologie. Dit is mogelijk door veldmetingen van stomatale conductiviteit van bladeren te koppelen aan de overeenkomstige uurgemiddelden van deze klimaatsparameters, evolutie van de plantontwikkeling en  $O_3$  concentraties.
- Detectie van wijzigingen in secundaire metabolieten in *Brassica* species ten gevolge van verhoogde  $O_3$  blootstelling tijdens de gewasgroei. Hierbij ligt vooral de nadruk op antioxidantia (vitamine C en E, glutathion (GSH)) en GSL-gehalten omwille van hun belang voor de menselijke en dierlijke gezondheid en voor veiligheid van de voedselketen.

- Er wordt verder geëvalueerd of de gewijzigde kwaliteit van het eindproduct (GSL-gehalte, proteïnegehalte, oliegehalte, ...) mogelijke gevolgen heeft voor de voedselketen. Op basis van de literatuurgegevens zal eveneens een inschatting gemaakt worden of de veranderingen van het secundair metabolisme op bladniveau een invloed kunnen hebben op plant/pathogeen-insect interacties.
- Identificatie van fysiologische en biochemische biomerkers voor  $O_3$  stress. Hiervoor zullen plantfysiologische metingen (zoals fotosynthese en chlorophyl a fluorescentie) gecombineerd worden met biochemische analyses van vitaminen en GSLs op bladniveau.
- Inschatting van de impact van een langdurige blootstelling aan een matige (maar niet acute) verhoging van de troposferische  $O_3$  concentraties op het blad/plant metabolisme en de verdedigingspathways door middel van transcriptoomanalyses.

### CONCLUSIONS

De gevolgen van toenemende troposferische  $O_3$  concentraties op de productie en veiligheid van *Brassica* producten is afhankelijk van de aard van het uiteindelijk marktproduct. Dit wordt duidelijk geïllustreerd door de twee soorten die in deze studie betrokken werden. Koolzaad (*Brassica napus*) is economisch gezien belangrijk omwille van de productie van oliehoudende zaden, broccoli (*Brassica oleracea* cv *italica*) daarentegen wordt gekweekt voor de productie van de verse groenten die geoogst worden alvorens er zaadvorming optreedt.

Onze primaire doelstelling was de ontwikkeling van kwantitatieve  $O_3$  dosis-respons relaties voor risico-evaluatie van de huidige en toekomstige economische gevolgen van  $O_3$  schade aan deze gewassen. Deze dosis-respons functies werden niet alleen bepaald op basis van de gemeten  $O_3$  concentraties in de omgevingslucht maar ook op basis van de biologisch relevante  $O_3$  opname door de plant. Voor deze fluxberekening werd de stomatale conductiviteit van de planten gemodelleerd in functie van klimaatscondities (luchtvochtigheid, temperatuur, lichtintensiteit) en fenologie en dit volgens twee verschillende modellen. Het eerste en meest gebruikte model voor  $O_3$  flux berekening is een empirisch multiplicatief model. Het tweede is een meer mechanistisch model op basis van een gekoppeld fotosynthesemodel. Omdat er geen opvallend verschil in voorspellend vermogen bestond tussen beide modellen, werd uiteindelijk geopteerd voor het empirisch model voor de verdere berekening van de geaccumuleerde  $O_3$  opname.

Bij een stijging van de 7 en 12-uurgemiddelde  $O_3$  concentraties tot 51 à 75 ppb, zoals voorspeld binnen de komende 100 jaar (Assessment Report Four van IPCC (Meehl *et al*, 2007)), wordt een daling van de zaadopbrengst van zomerkoolzaad verwacht tot 30%. De olieproductie zal zelfs nog nadeliger beïnvloed worden ten gevolge van een extra afname van het oliepercentage. Aangezien koolzaadolie de derde belangrijkste bron is van plantaardige olie, vertegenwoordigt zulke daling een belangrijk economisch verlies voor de sector. Dit effect heeft uiteraard ook gevolgen voor de inschatting van biodieselproductie in een toekomstig klimaat.



## OFFQ - Resultaten

### Impact van troposferisch ozon op de voedsel- en voederkwaliteit van Brassicaceae

Bovendien bleek er een verschuiving op te treden in de samenstelling van de vetzuren wat een invloed kan hebben op de nutritionele waarde van koolzaadolie.

Oleïnezuur (18:1), dat zowat 60% van het totale vetzuurgehalte vertegenwoordigt, vertoonde een significante afname onder invloed van O<sub>3</sub>, dit ten voordele van het essentieel, polyonverzadigd vetzuur linoleïnezuur (18:3). Het percentage verzadigde vetzuren nam toe, terwijl er een afname werd vastgesteld van het percentage mono-onverzadigde vetzuren. Na olie-extractie blijft het proteïnerijke koolzaadmeel over voor gebruik als voedersupplement. Meestal is het oliegehalte en het proteïnegehalte omgekeerd evenredig, en deze verhouding werd ook in deze studie bevestigd: verhoogde O<sub>3</sub> opname tijdens het groeiseizoen ging gepaard met een significante toename van het proteïnegehalte in de zaden.

Hogere O<sub>3</sub> concentraties zorgden eveneens voor een toename van het vitamine E gehalte in de zaden. De was te wijten aan een toename van  $\gamma$ -TOC maar niet van  $\alpha$ -TOC, de meest actieve vorm van vitamine E met betrekking tot de menselijke gezondheid. De toename van  $\gamma$ -TOC zou wel een impact kunnen hebben op de kwaliteit van koolzaadolie o.a. qua houdbaarheid. Er werden geen wijzigingen in GSL-gehalten of -samenstelling van de zaden vastgesteld en er zijn dus ook geen gevolgen te verwachten met betrekking tot de veiligheid van diervoeder. Het dient echter opgemerkt te worden dat de GSL-gehalten van de gebruikte cultivar (Ability) zeer laag liggen, en bijgevolg zijn significante verschillen moeilijker vast te stellen. Daarom zou het ook interessant zijn om dit fenomeen verder te onderzoeken in bepaalde winterkoolzaad cultivars, die van nature uit een hoger GSL-gehalte bevatten.

Ondanks het feit dat een hogere O<sub>3</sub> blootstelling geen invloed had op het versgewicht van de broccoli, werd een duidelijk effect vastgesteld met betrekking tot de kwaliteit van deze groente. Er was een sterke tendens tot toename van de concentratie aan alifatische GSLs (glucoiberine en glucoraphanine), maar dit had geen gevolgen op het totale GSL-gehalte, omdat het gepaard ging met een vermindering van de indol GSLs (vooral glucobrassicine en neoglucobrassicine).

Bij een gemiddelde toename van 40 ppb O<sub>3</sub> gedurende 8 uur per dag gedurende bijna het ganse groeiseizoen, werd de verhouding van alifatische t.o.v. indol GSLs in broccoli significant verhoogd van 0.97 tot 1.72, wat een positief effect zou kunnen hebben op de anticarcinogene eigenschappen van deze groente. Andere positieve gevolgen voor de kwaliteit van broccoli waren een toename van het antioxidans GSH en van het proteïnegehalte. De effecten voor de opbrengst van koolzaad en broccoli werden gerelateerd aan de invloed van verhoogde O<sub>3</sub> blootstelling op het verloop van de gewasontwikkeling en de evolutie van de fysiologische karakteristieken van het bovenste bladerdek doorheen het groeiseizoen. De vermindering in zaadopbrengst in koolzaad kan in verband gebracht worden met de versnelde afname in de fotosynthesecapaciteit ten gevolge van een vervroegde senescentie. Het ontbreken van opbrengsteffecten in broccoli kan verklaard worden door het feit dat de CO<sub>2</sub> assimilatie van de meest actieve broccolibladeren nog geen hinder ondervond van de verhoogde O<sub>3</sub> blootstelling op het tijdstip van de oogst.

Dit kan het gevolg zijn van de beperkte blootstelling aan O<sub>3</sub> (in tijd en concentratie), maar mogelijkwijze waren de effecten op biomassaproductie nog onvoldoende significant omwille van het vroege oogsttijdstip nog vóór de eigenlijke afrijping van het gewas.

De meeste effecten van een langdurige chronische O<sub>3</sub> blootstelling worden pas in een laat ontwikkelingsstadium waargenomen en dat was ook het geval voor blad-antioxidantia. Maar ook hier reageerden de beide plantsoorten op een verschillende manier. In koolzaad werd in het algemeen een toename vastgesteld, vooral dan van de wateroplosbare antioxidantia. In broccoli daarentegen zorgde O<sub>3</sub> voor een afname van het TOC-gehalte in de bladeren. In overeenstemming met de groenten werd ook in de bladeren een verhoging waargenomen van de ratio van alifatische t.o.v. indol GSLs, maar deze tendens kon statistisch niet bevestigd worden. De Microarray resultaten worden gekenmerkt door een grote variatie in genexpressieniveaus tussen de verschillende plantsoorten afkomstig van de veldexperimenten. In combinatie met het lage O<sub>3</sub> blootstelling vormt dit wellicht de oorzaak dat er slechts weinig wijzigingen in de pathways konden gevonden worden.

De opregulatie van genen uit fotosysteem I kon dan ook niet bevestigd worden met RT-PCR. Er werden wel duidelijke effecten vastgesteld op enzyme activiteit en metabolietniveaus die betrekking hebben op het antioxidatieve systeem. Deze effecten zijn het meest uitgesproken tijdens de generatieve ontwikkelingsfase van koolzaad. Over het algemeen nemen de enzyme activiteiten van de enzymen die in rechtstreeks contact staan met ROS toe, met name APX, waar de toegenomen activiteiten post transductieel wordt geregeld. Tijdens de generatieve fase beschikken de bladeren van koolzaad ook over grotere hoeveelheden ASC en GSH. De toegenomen redox status wordt in stand gehouden door een genetische opregulatie van de MDHAR activiteit.

Deze resultaten geven duidelijk aan dat een toename van de troposferische O<sub>3</sub> concentraties niet enkel een invloed zal hebben op het primair plantmetabolisme (vb productie van proteïnen en vetzuren) maar dat ook het secundair metabolisme en antioxidatieve defensiemechanismen wijzigingen kunnen ondergaan (antioxidantia en GSLs). De afname van de zaadproductie bij *Brassica napus* is van economisch belang, maar er dient een onderscheid gemaakt te worden tussen het verlies aan olieproductie en de toename in proteïneconcentratie.

De wijzigingen in de vetzuursamenstelling kunnen gevolgen hebben voor de nutritionele waarde van koolzaadolie, daar waar de afname van  $\gamma$ -TOC een invloed kan hebben op de oxidatieve stabiliteit en houdbaarheid. Voor *Brassica oleracea* cv Italia is het een heel ander verhaal. De productie van verse broccoligroenten zal blijkbaar weinig of geen hinder ondervinden van een toenemende O<sub>3</sub> verontreiniging. In tegendeel zelfs: het zou de kwaliteit van deze producten zelfs ten goede kunnen komen. Vooral de toename van de verhouding van alifatische t.o.v. indol GSLs kan belangrijk zijn voor de anticarcinogene eigenschappen waarvoor de consumptie van broccoli hoog aanbevolen wordt.



# OFFQ - Resultaten

Impact van troposferisch ozon op de voedsel- en voederkwaliteit van Brassicaceae

## BIJDRAGE AAN EEN BELEID GERICHT OP DUURZAME ONTWIKKELING

Het wordt reeds lang erkend dat een verhoging van de troposferisch O<sub>3</sub> concentraties schadelijk is voor de landbouw- en tuinbouwproductie en wijzigingen kan teweeg brengen in de kwaliteit van de marktproducten. Vanwege het beleid bestaat een sterke vraag naar een kwantitatieve evaluatie van deze schade voor de berekening van kosten-baten analyses ter reductie van emissies van luchtverontreinigingscomponenten (Holland *et al.*, 2006). Dank zij dit project zijn deze gegevens thans beschikbaar voor twee belangrijke Brassica-gewassen: *Brassica napus* (zomerkoolzaad) en *Brassica oleracea* cv Italica (broccoli).

Bij een stijging van de 7 en 12-uurgemiddelde O<sub>3</sub> concentraties tot 51 à 75 ppb, zoals voorspeld binnen de komende 100 jaar (Assessment Report Four van IPCC (Meehl *et al.*, 2007)), wordt een daling van de zaadopbrengst van zomerkoolzaad verwacht tot 30%. De olieproductie zal zelfs nog nadeliger beïnvloed worden ten gevolge van een extra afname van het oliepercentage. Dit effect heeft uiteraard ook gevolgen voor de inschatting van biodieselproductie in een toekomstig klimaat. Op basis van deze studie ligt de kritische AOT40 (Geaccumuleerde O<sub>3</sub> concentraties boven 40 ppb) ter voorkoming van 5% zaad- of oliereductie voor koolzaad op respectievelijk 3.7 en 3.2 ppm h, berekend voor de periode vanaf de opkomst tot oogst van het gewas. Dit betekent dat de huidige kritische grenswaarde van 3 ppm h voor landbouwgewassen voldoende is voor de bescherming van de koolzaadproductie.

Voor de kwantificatie van O<sub>3</sub> effecten op opbrengst en kwaliteit dient eerder voorkeur gegeven te worden aan een index die gebaseerd is op de eigenlijke O<sub>3</sub> opname i.p.v. omgevingsconcentraties. Tot nu toe was deze fluxmodellering enkel beschikbaar voor tarwe en aardappel, maar dankzij dit project is zo'n model nu ook voor koolzaad en broccoli beschikbaar voor de risico-evaluatie van O<sub>3</sub> schade voor landbouwgewassen. De kritische grenswaarde voor O<sub>3</sub>-opname waarboven 5 % verlies aan zaad- of olieproductie te verwachten valt, werd berekend op een POD<sub>6</sub> (Geaccumuleerde fytotoxische O<sub>3</sub> dosis boven een grenswaarde van 6 nmol s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> geprojecteerd bladoppervlak (PLA)) van respectievelijk 4.4 en 3.9 mmol m<sup>-2</sup> PLA.

Deze kritische grenswaarden, zowel op basis van de O<sub>3</sub> concentraties als van de eigenlijke plantopname, kunnen getoetst worden aan de gemodelleerde O<sub>3</sub> concentraties en fluxberekeningen die via EMEP (European Monitoring and Evaluation Programme) beschikbaar zijn voor 50 km x 50 km in Europa. Op die manier is het mogelijk gebieden te identificeren waar een risico bestaat voor O<sub>3</sub> schade aan koolzaadgewassen, zowel in het heden als in de toekomst.

Dit project maakt ook duidelijk dat er niet enkel met de kwantitatieve opbrengstreducties dient rekening gehouden te worden, maar dat ook de kwalitatieve waarde van de marktproducten moet bekeken worden om tot een correcte risico-evaluatie te komen en betrouwbare economische extrapolaties. Afhankelijk van de aard van deze kwaliteitsaspecten met betrekking tot industriële verwerking en gezondheid van de consument kan een verhoging van de troposferische O<sub>3</sub> concentraties zowel positieve als negatieve gevolgen hebben voor land- en tuinbouwproducten.

## CONTACT INFORMATIE

### Coördinator

#### **Karine Vandermeiren**

Centrum voor onderzoek in  
Diergeneeskunde en Agrochemie  
(CODA/CERVA)  
Département d'Echochimie agricole  
Leuvensesteenweg 17  
B-3080 Tervuren  
Tel: +32 (0)2 769.22.33  
Fax: +32 (0)2 769.23.05  
kavan@var.fgov.be  
<http://www.var.fgov.be>

### Partners

#### **Yves Guisez**

Universiteit Antwerpen (UA)  
Department Biologie  
Research Group of Plant Physiology  
(PPG)  
Campus Groenenborger  
Groenenborgerlaan 171  
B-2020 Antwerpen  
Tel: +32 (0)3 265.35.91  
Fax: +32 (0)3 264.34.17  
yves.guisez@ua.ac.be

#### **Reinhart Ceulemans**

Universiteit Antwerp  
Department Biologie  
Research Group of Plant and Vegetation  
Ecology (PVE)  
Campus Drie Eiken  
Universiteitsplein 1  
B-2160 Wilrijk  
Tel: +32 (0)3 820.22.89  
Fax: +32 (0)3 820.22.71  
reinhart.ceulemans@ua.ac.be

