

DISS. ETH NO. 26729

Cropping systems and plant-based biopesticides to reduce the risk of *Fusarium* mycotoxins in wheat

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

DIMITRIOS DRAKOPOULOS

MSc, Wageningen University, The Netherlands

born on 04.01.1988

citizen of Greece

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Johan Six, Sustainable Agroecosystems, ETH Zurich, Switzerland

Dr. Susanne Vogelgsang, Ecological Plant Protection in Arable Crops, Agroscope, Switzerland

Dr. Hans-Rudolf Forrer, Ecological Plant Protection in Arable Crops, Agroscope, Switzerland

Prof. Dr. Simon Edwards, Plant Pathology, Harper Adams University, United Kingdom

2020

Summary

Fusarium head blight (FHB) is a devastating fungal disease of cereals worldwide causing significant reductions in yield and, most importantly, severe grain contaminations with mycotoxins, such as deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEN). In most parts of the world, *Fusarium graminearum* is the predominant species of the FHB complex in wheat. The fungus overwinters on infected crop residues, such as maize stalks and wheat straw. Hence, suitable crop rotation with non-host species and management of crop residues with plough are effective agronomic practices to control FHB. However, continuous ploughing has several drawbacks, such as increased risks of soil erosion and soil degradation. Recently, there is a movement towards reduced reliance on synthetic pesticides to minimise the negative impact on the environment and human health. The main objective of this doctoral dissertation was to explore the potential of cropping systems and plant-based biopesticides, botanicals, to reduce *Fusarium* infection and mycotoxin contamination in wheat in a maize-wheat rotation under reduced tillage practices.

First, we investigated the effect of botanicals on suppressing different stages of the life cycle of *F. graminearum* *in vitro*. Aqueous extracts of white mustard seed flours and milled Chinese galls at 2 % concentration reduced mycelium growth by up to 100 %, germination of conidia and ascospores by up to 100 % and 97 %, respectively, perithecia formation on maize stalks by up to 56 % and discharge of ascospores from perithecia by up to 77 %. Furthermore, we quantified the principal glucosinolate component sinalbin of the mustard-based botanicals, i.e. the precursor of p-hydroxybenzyl isothiocyanate, a compound known for its antimicrobial activity. Moreover, we showed that Chinese galls contain different gallotannins as well as gallic and tannic acids, compounds also known for their antimicrobial properties.

Secondly, we investigated prevention strategies to control FHB in a simulated maize-wheat rotation under no-tillage. Maize residues were artificially inoculated with *F. graminearum* and subsequently placed on the soil surface in field plots after wheat sowing. Botanicals or fresh mulch layers were applied onto *F. graminearum*-inoculated maize residues. Botanicals included aqueous extracts of white mustard seed flours and milled Chinese galls. Botanicals were more effective in the second experimental year than the first year reducing DON and ZEN contents in wheat grain by up to 42 % and 78 %, respectively. For the mulch layers, a novel cut-and-carry biofumigation method was used where cover crops grown in separate fields were harvested in autumn, chopped and applied directly onto the inoculated maize residues after wheat sowing. Mulch layers of white mustard, Indian mustard and berseem clover

Summary

consistently decreased mycotoxin contents in both years, i.e. DON by up to 50 %, 58 % and 56 %, and ZEN by up to 76 %, 71 % and 87 %, respectively.

Thirdly, we investigated the effect of maize-intercropping and cover cropping on FHB and mycotoxins in wheat under no-tillage and reduced tillage. In the first experimental year, the use of white mustard and Indian mustard as intercrops in maize decreased the DON content in grain of subsequent winter wheat by 58 % and 32 %, respectively, compared with sole maize and the effects were significant under both no-tillage and reduced tillage. However, maize-intercropping did not significantly reduce mycotoxins in wheat under very high disease pressure, which was the case in the second experimental year. Moreover, we showed that under no-tillage growing cover crops after silage maize, i.e. white mustard, Indian mustard and winter pea, effectively reduced FHB and mycotoxins in the following spring wheat, even to a similar extent as with deep ploughing of the maize debris. Nevertheless, we observed economic trade-offs of both maize-intercropping and cover cropping systems due to increased operating costs.

Fourthly, we investigated direct control strategies with mustard-based botanicals to combat *F. graminearum* using *in vitro* and *in planta* experimental systems. *In vitro*, the botanicals showed equal or higher efficacies in inhibiting mycelium growth than the fungicide treatment. Under controlled environment in the growth chamber, botanicals based on white mustard were as effective as the fungicide treatment in reducing DON in grain. The antifungal activity of the mustard may be attributed to its bioactive matrix containing isothiocyanates and phenolic acids. Nevertheless, under field conditions, only the application of fungicide significantly decreased FHB infection and DON in grain.

In conclusion, we shed light on alternative, environmentally sustainable crop protection strategies utilising innovative cropping systems and botanicals to reduce the risk of *Fusarium* mycotoxins in wheat. Cereal growers could benefit from the developed prevention strategies, i.e. cut-and-carry biofumigation, application of botanicals, cover cropping and intercropping, by decreasing the risk of mycotoxin contamination in harvest products and thus improving grain yield and quality. Innovation in cropping systems may lead to additional costs for growers, which results in conflicts between farm profitability and food safety goals. This conflict could be addressed by appropriate agricultural policies at both producer and consumer levels, fostering sustainable cultivation systems that contribute to safe food and feed.

Zusammenfassung

Die Ährenfusariose (AF) ist eine verheerende Pilzkrankheit in Getreide, welche weltweit zu grossen Ernteverlusten führt. Noch bedeutender ist die damit zusammenhängende Belastung von Körnern mit Mykotoxinen, wie zum Beispiel Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZEN). In den meisten Ländern der Welt ist *Fusarium graminearum* die vorherrschende Art innerhalb des AF-Komplexes in Weizen. Dieser Pilz überdauert in infizierten Ernterückständen von Mais und Weizen. Eine angepasste Fruchtfolge mit Nicht-Wirtspflanzen sowie die Bearbeitung der Ernterückstände mit dem Pflug sind daher wirksame Anbaumethoden zur Bekämpfung der AF. Wiederholtes Pflügen birgt jedoch mehrere Nachteile, wie zum Beispiel ein erhöhtes Risiko von Erosion und Reduktion der Bodenfruchtbarkeit. Zudem wird seit einigen Jahren angestrebt, den Einsatz von synthetischen Pflanzenschutzmitteln zu verringern, um deren negativen Auswirkungen auf die Umwelt und die menschliche Gesundheit zu vermindern. Das Hauptziel dieser Dissertation war die Untersuchung des Potenzials von Anbausystemen und Naturstoffen (Pflanzen-basierte Biopestizide) zur Reduktion von *Fusarium*-Infektionen und Mykotoxin-Belastungen in einer Mais-Weizen-Fruchtfolge ohne Pflugeinsatz.

Zunächst prüften wir die *in vitro*-Wirkung von Naturstoffen auf die Unterdrückung verschiedener Stadien im Lebenszyklus von *F. graminearum*. Wässrige Extrakte aus gemahlener Weissenf-Samen und gemahlener Chinesischer Galle (2 %) reduzierten das Myzelwachstum um bis zu 100 %, die Keimung von Konidien und Askosporen um bis zu 100 % bzw. 97 %. Zudem wurde die Bildung von Perithezien auf Maisstängeln um bis zu 56 % und das Ausschleudern der Askosporen aus den Perithezien um bis zu 77 % reduziert. Zusätzlich quantifizierten wir in den Senf-basierten Naturstoffen den Gehalt von Sinalbin, dem Hauptbestandteil der Senfölglycoside (Glucosinolate). Sinalbin ist die Vorläufersubstanz von p-Hydroxybenzylisothiocyanat, ein Stoff, der für seine antimikrobielle Wirkung bekannt ist. Ebenso stellten wir fest, dass Chinesische Galle verschiedene Gallotannine, Gallussäuren und Tanninsäuren enthält. Auch diese Substanzen verfügen über antimikrobielle Effekte.

Zweitens untersuchten wir Vermeidungsstrategien zur Bekämpfung der AF in einer simulierten Mais-Weizen-Fruchtfolge ohne Bodenbearbeitung. Maiserntereste wurden künstlich mit *F. graminearum* inokuliert und nach der Weizenaussaat in Feldparzellen auf die Bodenoberfläche ausgebracht. Zur Behandlung der *F. graminearum*-infizierten Maiserntereste wurden entweder Naturstoffe oder frisches Mulchmaterial verwendet. Die Naturstoffe bestanden aus wässrigen Extrakten von Weissenf und Chinesischer Galle. Die Wirkung der Naturstoffe war im zweiten Versuchsjahr stärker als im ersten Jahr und reduzierte den DON- und den ZEN-Gehalt in Weizenkörnern um bis zu 42 % bzw. 78 %. Für die Mulchbehandlung

Zusammenfassung

wurde eine neuartige «cut-and-carry» Biofumigationmethode verwendet. Dazu wurden Gründüngerpflanzen in separaten Feldern angebaut, im Herbst geerntet, gehäckselt und nach der Weizensaat direkt auf die inokulierten Maisernteste appliziert. Mulchmaterial aus Weissenf, Braunsenf und Alexandrinerklee verringerten die Mykotoxingehalte in beiden Versuchsjahren bei DON um bis zu 50 %, 58 % bzw. 56 % und bei ZEN um bis zu 76 %, 71 % bzw. 87 %.

Drittens ermittelten wir die Wirkung von Mais-Untersaaten und Zwischenfrüchten auf den AF-Befall und die Mykotoxin-Belastung in Weizen sowohl ohne als auch mit reduzierter Bodenbearbeitung. Im Vergleich zu Maisanbau ohne Untersaat verringerten Untersaaten mit Weissenf und Braunsenf im ersten Versuchsjahr den DON-Gehalt in den Körnern des nachfolgenden Weizens um bis zu 58 % bzw. 32 % und die Wirkungen waren bei beiden Bodenbearbeitungssystemen statistisch gesichert. Jedoch führten die Untersaatensysteme im zweiten Jahr mit sehr hohem Krankheitsdruck nicht zu einer signifikanten Mykotoxinreduktion. Der Anbau der Zwischenfrüchte Weissenf, Braunsenf oder Wintererbse nach der Maisernte reduzierte den AF-Befall und die Mykotoxingehalte im direkt gesäten Sommerweizen effizient und die Wirkung war sogar vergleichbar mit dem tiefen Unterpflügen der Maisernteste. Aufgrund der erhöhten Betriebskosten stellten wir jedoch bei den Anbausystemen mit Untersaaten und Zwischenfrüchten wirtschaftliche Nachteile fest.

Viertens überprüften wir sowohl *in vitro* als auch *in planta* die Wirkung von Senf-basierten Naturstoffen als direkte Bekämpfungsmassnahme gegen *F. graminearum*. *In vitro* hemmten die Naturstoffe das Myzelwachstums ebenbürtig oder sogar stärker als die Fungizid-Behandlung. Unter kontrollierten Bedingungen in Klimakammern reduzierte der Naturstoff Weissenf den DON-Gehalt in Weizenkörnern ebenso stark wie das Fungizid. Die antifungale Wirkung ist vermutlich auf die bioaktive Matrix mit Isothiocyanaten und Phenolsäuren zurückzuführen. Unter Feldbedingungen konnte jedoch nur die Fungizidbehandlung die AF-Infektion und den DON-Gehalt signifikant verringern.

Abschliessend ist es uns gelungen, Aufschluss über alternative und ökologische Pflanzenschutz-Strategien zu erhalten, welche das Risiko von Fusarium-Mykotoxinen in Weizen mittels innovativer Anbausysteme und Naturstoffen verringern. Im Rahmen von nachhaltigen Pflanzenschutzmassnahmen könnten Getreideproduzenten von den hier entwickelten Vermeidungsstrategien profitieren, namentlich «cut-and-carry»-Biofumigation, Einsatz von Naturstoffen sowie der Anbau von Untersaaten oder Zwischenfrüchten. Dadurch wird das Risiko von Mykotoxinbelastungen in Ernteprodukten verringert, wodurch gleichzeitig der Ertrag und die Qualität verbessert wird. Da innovative Anbausysteme zusätzliche Kosten für die Produzenten verursachen, könnte ein Zielkonflikt zwischen der Wirtschaftlichkeit des

Zusammenfassung

Betriebs und der Lebensmittelsicherheit entstehen. Dieser Konflikt könnte durch geeignete agrarpolitische Massnahmen auf Ebene der Produzenten und der Konsumenten bewältigt werden, um nachhaltige Anbausysteme zu fördern, die einen Beitrag zu sicheren Lebens- und Futtermitteln leisten.