

Samenvatting

In het kader van het MycoKey-project was dit onderzoek vooral gericht op het zoeken naar nieuwe biocontroleorganismen (BCA's) die gebruikt kunnen worden voor de bestrijding van *Fusarium graminearum* in de pre-harvest fase. MycoKey is een Europees Horizon 2020-project in het kader van de subsidieovereenkomst nr. 678781 dat gericht is op de ontwikkeling van slimme, geïntegreerde, duurzame oplossingen en innovatieve toolkits om de belangrijkste mycotoxinen in economisch belangrijke voedsel- en voederketens te verminderen. Een van de belangrijkste MycoKey-benaderingen is het ontwikkelen van nieuwe preventieve maatregelen en het verbeteren, combineren en verfijnen van bestaande maatregelen.

Bovendien werd dit doctoraatswerk gerealiseerd via een Onderzoeksplatform van de Universiteit Gent, MYTOX genaamd, dat ernaar streeft de huidige mycotoxineproblemen die endemisch zijn in menselijke voeding en veevoer op te lossen door het te integreren in een globaal onderzoekskader, gebaseerd op vier hoofdpijlers. Dit omvat: (i) identificatie, karakterisering en transcriptionele engineering van toxigene schimmels; (ii) preventie en controle van toxigene schimmels in de voedsel- en voederketen; (iii) gerichte en niet-gerichte mycotoxine-analyse en (iv) gezondheidseffecten op de blootstelling aan toxines. Het *Centre of Excellence in Mycotoxicology and Public Health (CoEMPH)* en het *Laboratory of Applied Mycology and Phenomics (LAMP)* waren betrokken bij het werk door middel van een intra-universitaire samenwerking.

In hoofdstuk 1 wordt een korte inleiding gegeven in relatie tot gerapporteerde pre- en post-oogststrategieën om toxigene schimmels te bestrijden en de bijbehorende mycotoxinen te verminderen, met een geactualiseerd overzicht van de gedocumenteerde BCA's die in de afgelopen 30 jaar in de pre-oogstfase zijn gebruikt voor het beheer van toxigene schimmels en de bijbehorende mycotoxinen in vitro en/of in het veld. Dit omvat ook een focus op de verschillende werkingsmechanismen van de meest bestudeerde BCA's en een uitgebreid overzicht van hun vermogen om de mycotoxinebiosynthese te onderdrukken.

Hoofdstuk 2 geeft een algemeen overzicht van het werk en de belangrijkste doelstellingen die tijdens het doctoraatswerk worden nagestreefd. In het eerste deel van hoofdstuk 3 hebben we gescreend op fungale endofyten, een polyfyletische groep van zeer diverse schimmels. Endofytische schimmels zijn aanwezig in weefsels van planten zonder dat ze duidelijke schadelijke effecten veroorzaken. Er werd een screening uitgevoerd op de gewasresten van maïs aangezien deze een matrix vormen die naar verwachting primair inoculum van de ziekteverwekker zal bevatten, alsook verschillende antagonistisch schimmelspecies die aangepast zijn aan de lokale groeiomstandigheden en die als BCA's kunnen worden gebruikt om een schimmelinfectie effectief te voorkomen door het inoculum van de ziekteverwekker te verminderen.

Verscheidende schimmelendofyten uit verscheidende gewasresten en bodemonsters werden geïsoleerd en geïdentificeerd. Talrijke schimmelisolaten, voornamelijk van *Epicoccum* en *Sordaria*, werden getest tegen *F. graminearum* en vergeleken met eerder bekende BCA's zoals *Piriformospora spp.*, een moeilijk te isoleren endofytisch geslacht, zowel *in vitro* als *in planta* (maispottenexperimenten). Dit deel werd uitgevoerd in LAMP (UGent) waar verscheidende protocollen voor screening, identificatie en testen van BCA's reeds zijn opgesteld.

In het tweede deel van dit onderzoek hebben we het effect van deze endofyten op de productie van zearalenon-, deoxynivalenol- en 15-acetyldeoxynivalenolniveaus onderzocht, aangezien dit belangrijke mycotoxinen zijn die door *F. graminearum* worden geproduceerd. Aangezien planten verscheidende detoxificatiemechanismen bezitten bestaande uit bijvoorbeeld glucosylering van trichothecenen, werd ook het effect van de geïsoleerde schimmel endofyten op het deoxynivalenol-3-glucosideniveau beoordeeld. Met state-of-the-art faciliteiten zoals vloeistofchromatografie-tandem-massaspectrometrie aan de CoEMPH (UGent) was het haalbaar om dit deel te voltooien door bepaling en kwantificering van de secundaire metabolieten van *F. graminearum* in één enkele run.

De verkregen resultaten vertoonden een aanzienlijke variabiliteit in de antischimmelwerking, zowel tussen de soorten als tussen de isolaten binnen één soort. Bovendien was het effect op het mycotoxinegehalte variabel en niet noodzakelijkerwijs gerelateerd aan de antischimmelwerking, met uitzondering van het zearalenongehalte, dat consequent werd verlaagd door de endofyten. Deze resultaten benadrukken het grote potentieel van bepaalde endofytische schimmelstammen als nieuwe BCA's in de gewasproductie.

In hoofdstuk 4 werd een niet-gerichte analyse met behulp van vloeistofchromatografie-hoge resolutie-massaspectrometrie toegepast om het effect van exometabolieten van de twee geselecteerde endofytische zwammen *E. nigrum* en *S. fimicola* op het *F. graminearum* metabolisme te onderzoeken onder een geoptimaliseerde *in-vitro* test. De groei van *F. graminearum* werd geremd na de blootstelling aan de exo-metabolieten. Bovendien werd de kleur van het mycelium gewijzigd, wat wijst op een verandering in het secundaire metabolisme van de ziekteverwekker. Univariante en multivariante analyse toonde een aantal interessante metabolische componenten aan die significant verschilden tussen de behandelde- en controlemonsters. De identificatie van deze componenten werd echter niet bereikt na gebruik van de beschikbare database voor metabolietidentificatie. Dit werk geeft aan dat de exo-metabolieten een biocontrole-effect uitoefenen, dit wil zeggen dat de geselecteerde endofyten meer dan één werkingsmechanisme hebben.

Als controlestrategie na de oogst werd in hoofdstuk 5 het effect van superkritische kooldioxide- en ultravioletlichtbehandelingen van het type C beoordeeld om de kieming van *Aspergillus flavus* in verse pistache en *F. graminearum* in tarwe en maïs te inactiveren of af te remmen. Superkritische koolstofdioxide heeft het potentieel om toxische schimmels in landbouwproducten te verminderen. Met

deze technologie werd een volledige remming van de schimmelgroei en sporenkieming van *F. graminearum* bereikt. Bovendien werd een verlaging van het aantal bacteriën voor *A. flavus* bereikt na het aanbrengen van de superkritische kooldioxide bij 45 °C. Er werd echter geen effect op de mycotoxineproductie waargenomen. Langere behandelingen in combinatie met drogen kunnen een effectieve manier zijn om de kieming van *A. flavus* sporen, schimmelgroei en aflatoxineproductie te inactiveren.

Hoofdstuk 6 geeft een algemene conclusie en plaatst de resultaten van deze thesis in een bredere internationale context en relevantie. Het hoofdstuk begint met een korte inleiding over de geschiedenis van sommige mycotoxinen en hun producerende toxigene schimmels. Verder wordt het effect van de huidige wereldwijde vraagstukken zoals klimaatverandering en het lopende onderzoek naar het mogelijke effect van de klimaatverandering op het mycotoxineonderzoek door middel van referenties en stellingen behandeld. Als algemeen toekomstperspectief komen ook de voedselveiligheid en de implementatie van de BCA's in de voedingsindustrie aan bod. Exposomics, dat tegenwoordig een hot topic is, wordt ook besproken en de huidige uitdagingen voor het gebruik van exposomics in het mycotoxine onderzoek wordt gepresenteerd.