



EESTI MAAÜLIKOOOL

Põllumajandus- ja keskkonnainstituut

**Marite Juurik**

**KÕRRELISTE HELELAIKSUSE TEKITAJA *ZYMOSEPTORIA*  
*TRITICI* FUNGITSIIDIRESISTENTSUS**

***ZYMOSEPTORIA TRITICI* FUNGICIDE RESISTANCE IN WHEAT**

Magistritöö

Põllumajandussaaduste tootmise ja turustamise õppekava

Juhendajad: Evelin Loit, PhD

Riinu Kiiker, PhD

Pille Sooväli, PhD

Tartu 2021

Eesti Maaülikool Kreutzwaldi 1, Tartu 51006		Bakalaureusetöö lühikokkuvõte	
Autor: Marite Juurik		Õppekava: Põllumajandussaaduste tootmine ja turustamine	
Pealkiri: Kõrreliste helelaiksuse tekitaja <i>Zymoseptoria tritici</i> fungitsiidiresistentsus			
Lehekülgi: 45	Jooniseid: 11	Tabeleid: 3	Lisasid: 2
<p>Osakond / Õppetool: Taimekasvatuse ja taimebioloogia õppetool          ETIS-e teadusvaldkond ja CERC S-i kood: B390, taimekasvatus, aiandus, taimekaitsevahendid, taimehaigused          Juhendaja(d): Evelin Loit, PhD; Riinu Kiiker, PhD; Pille Soováli, PhD          Kaitsmiskoht ja -aasta: Tartu, 2021</p>			
<p>Populaarse toiduteravilja nisu olulist saagikuse langust põhjustab kõrreliste helelaiksus, mida põhjustab patogeen <i>Zymoseptoria tritici</i>. Fungitsiidide kasutamine aitab pärssida patogeeni elutegevust ja levikut. Peamiselt kasutatakse <i>Z. tritici</i> tõrjeks fungitsiidirühmadest asoolid, suksinaatdehüdrogenaasi inhibiitoreid ja strobiluriini. Töö eesmärgiks oli võrrelda <i>Z. tritici</i> fungitsiidide tundlikkuse arengut 2019. ja 2020. aasta vahel ja määrata 2019. ja 2020. aastatel Eestis levinud <i>Z. tritici</i> populatsioonis fungitsiidiresistentsust põhjustavad märklaudvalkude mutatsioonid. Eesti talinisu põldudel isoleeriti kahel aastal kokku 283 <i>Z. tritici</i> puhaskultuuri. Isolaatidel määrati fungitsiidide tundlikkus mikrotiiterplaadimeetodil asoolide suhtes ning mutatsioonid märklaudvalkude geenides (<i>CYP51</i>, <i>SdhB</i>, <i>SdhC</i> ja <i>CytB</i>). 2019 ja 2020 aasta võrdluses leiti, et asoolide tundlikkus toimeainete suhtes oli Eesti <i>Z. tritici</i> populatsioonis varieeruv. Epoksikonasooli ja mefentriflukonasooli tundlikkus suurenes, protiokonasool-destio tundlikkus vähenes ning esines resistentsus tebukonasooli suhtes. Tundlikkuse vähenemist saab seostada märklaudvalkudes tekkinud mutatsioonidega. Asoolide märklaudvalgus <i>CYP51</i>-s olid levinud mutatsioonid D134G, V136A/C, G379A, I381V ja S524T. Tõusutrendi näitasid D134G, V136C, A379G ja S524T. V136A ja I381V sagedus langes kahe aasta võrdluses. Domineerivaim mutatsioon oli I381V. Kõige tugevam seos on asoolide resistentsuse tekkega mutatsioonil S524T. SDHI märklaudvalgu <i>SdhC</i> mutatsioonid N33T, N34T ja N86S on Eesti <i>Z. tritici</i> populatsioonis levinud. Esmakordselt avastati Eesti populatsioonis valgus <i>SdhB</i> esinev mutatsioon N225I. Ükski <i>SdhC</i> ja <i>SdhB</i> mutatsioonidest ei langeta märkimisväärselt SDHI-de tundlikkust. Strobiluriinide märklaudvalgus <i>CytB</i> olev mutatsioon G143A, mis tekitab resistentsuse, esineb 44 kuni 49 % isolaatidest, kuid varieerub tugevalt maakonniti. Kõrreliste helelaiksuse tõrjeks sobivad Eestis kasutamiseks nii asoolid, SDHI-d kui strobiluriinid, kuid soovitatav on omavahel vahetada erinevaid toimeaineid fungitsiidide resistentsuse tekkeriski minimeerimiseks. Tõrjevahendite valikul tuleks lähtuda ka piirkondlikest eripäradest. Töö vajab edasisi uuringuid, et põllumajandustootjad saaksid ennetada kõrreliste helelaiksuse tekitaja fungitsiidiresistentsust ja kasutada toimeaineid, millele haigustekitaja tundlik on.</p>			
Märksõnad: kõrreliste helelaiksus, fungitsiidiresistentsus, asool, SDHI, strobiluriin, <i>CYP51</i> geen			

Estonian University of Life Sciences Kreutzwaldi 1, Tartu 51006		Abstract of Master's Thesis	
Author: Marite Juurik		Curriculum: Production and Marketing of Agricultural Products	
Title: <i>Zymoseptoria tritici</i> fungicide resistance in wheat			
Pages: 45	Figures: 11	Tables: 3	Appendixes: 2
Department / Chair: Chair of Crop Science and Plant Biology Field of research and (CERC S) code: B390, crop protection Supervisors: Evelin Loit, PhD; Riinu Kiiker, PhD; Pille Sooväli, PhD Place and date: Tartu, 2021			
<p>The significant decrease in the yield of the popular food crop wheat is caused by the Septoria tritici blotch, caused by the pathogen <i>Zymoseptoria tritici</i>. The use of fungicides helps to inhibit the activity and spread of pathogens. Azoles, succinate dehydrogenase inhibitors and strobilurins are mainly used to control <i>Z. tritici</i>.</p> <p>The study aimed to compare the development of susceptibility of the <i>Z. tritici</i> Estonian population to fungicides between 2019 and 2020. Another aim was to determine the mutations in target proteins causing fungicide resistance in the population of <i>Z. tritici</i> prevalent in Estonia in 2019 and 2020.</p> <p>In two years, a total of 283 single spore isolates of <i>Z. tritici</i> were isolated from Estonian winter wheat fields. In each isolate, fungicide susceptibility to azoles was determined by the microtiter plate method and sequencing the pointmutations in target protein genes (<i>CYP51</i>, <i>SdhB</i>, <i>SdhC</i> and <i>CytB</i>).</p> <p>In the comparison of 2019 and 2020, it was found that the sensitivity of azoles varied in the Estonian <i>Z. tritici</i> population. The susceptibility of epoxiconazole and mefentrifluconazole increased, the susceptibility of prothioconazole-destio decreased, and the resistance to tebuconazole prevailed. Decreased sensitivity can be associated with mutations in target proteins. Pointmutations D134G, V136A/C, A379G, I381V and S524T were common in the target protein CYP51. D134G, V136C, A379G and S524T showed an upward trend. The frequency of V136A and I381V decreased in the two-year comparison. The predominant mutation in the population was I381V. The strongest association with azole resistance is with S524T mutation. The SdhC mutations N33T, N34T and N86S of the SDHI target protein are common in the Estonian <i>Z. tritici</i> population. For the first time, the N225I mutation in the SdhB protein was detected in the Estonian population. None of the SdhC and SdhB mutations significantly decrease the sensitivity of SDHIs. The G143A mutation in the strobilurin target protein CytB is present in 44 to 49 % of isolates, but varies widely between the counties.</p> <p>Azoles, SDHIs and strobilurins are suitable for use in Estonia to control the Septoria tritici blotch, but it is recommended to rotate different active ingredients to minimize the risk of developing fungicide resistance. The choice of control measures should also take regional specificities into account. Further research is required to enable farmers to prevent fungicide resistance and to use active substances to which the pathogen is sensitive.</p>			
Keywords: Septoria tritici blotch, fungicide resistance, azole, SDHI, strobilurin, <i>CYP51</i> gene			

# SISUKORD

SISSEJUHATUS.....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	7
1.1 Nisukasvatus.....	7
1.1.1 Nisu agrotehnoloogia .....	9
1.1.2 Taimehaigused nisul.....	10
1.3 Kõrreliste helelaiksus .....	10
1.4 Fungitsiidid.....	13
1.5 Fungitsiidiresistentsus .....	14
2. MATERJAL JA METOODIKA .....	17
2.1 Isolaatide kogumine .....	17
2.2 Fungitsiiditundlikkuse määramine .....	18
2.3 Mutatsioonide määramine märklaudvalkude geenides .....	19
2.4 Statistiline andmetöötlus .....	20
3. TULEMUSED.....	21
3.1 Asooli toimeainete tundlikkus.....	21
3.2 Mutatsioonid <i>CYP51</i> geenis .....	23
3.3 Mutatsioonid <i>Sdh</i> geenis .....	25
3.4 Mutatsiooni G143A esinemine <i>CytB</i> geenis .....	25
4. ARUTELU .....	27
KOKKUVÕTE.....	32
KASUTATUD KIRJANDUS .....	33
LISAD .....	41
Lisa 1. <i>CYP51</i> geenis esinevate mutatsioonide sagedused Eesti <i>Z. tritici</i> populatsioonis 2019-2020.....	42
Lisa 2. Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning juhendajate kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta .....	43

## SISSEJUHATUS

Rahvastikuarvu pideva tõusuga kaasneb ka kasvav nõudlus toidu järele (Global food supply... 2019). Tuhandeid aastaid kasvatatud nisust on saanud üks olulisemaid toiduteravilju kogu maailmas, millest tehakse palju erinevaid tooteid. Taimehaigused aga vähendavad potentsiaalset saaki ja vastutavad märkimisväärsete kadude eest põllumajanduses (Tronsmo *et al.* 2020). Et tagada nisu stabiilselt kõrge saagikus on vaja taime kaitsta haigustekitajate eest. Fungitsiide kasutades saab pärssida või hävitada konkreetset haigust põhjustava patogeeni (McGrath 2004). Fungitsiide on kasutatud juba üle 200 aasta taimede kaitseks seenhaiguste eest (Brent, Hollomon 2007).

Kuna peamiselt kasvatatakse kõrreliste helelaiksuse (patogeen *Zymoseptoria tritici*) suhtes vastuvõtlikke nisusorte, siis on see haigus kujunenud üheks põhiliseks nisu kahjustajaks. *Z. tritici* tõrjele kulutatakse Euroopa Liidus ligi 70 % kogu fungitsiidikuludest põllumajanduses (Brennan *et al.* 2019). Peamised fungitsiidide rühmad kõrreliste helelaiksuse tõrjeks on asoolid (DMI-rühm), suksinaatdehüdrogenaasi inhibiitorid (SDHI rühm) ja strobiluriinid (Qol-rühm). Asoole on Euroopas tõrjeks kasutatud pikaajaliselt, mis võib aga põhjustada märklaudvalgus mutatsioone ja viia resistentsuse tekkele (Jørgensen *et al.* 2018). Varasemalt ei ole leitud Eesti *Z. tritici* populatsioonist mitte ühtegi *Sdh* geeni mutatsiooni (Mäe *et al.* 2020). Strobiluriinide resistentne alleel on aga väga kiiresti Euroopas levinud ja selle osakaal muudkui tõuseb (Torriani *et al.* 2008; Cheval *et al.* 2017; Heick *et al.* 2017).

Uurimistöö eesmärkideks oli:

- 1) võrrelda *Z. tritici* fungitsiidiresistentsuse levikut 2019. ja 2020. aastate vahel Eestis,
- 2) määrata *Z. tritici* fungitsiidiresistentsust põhjustavad mutatsioonid märklaudvalkudes.

Uurimistöö hüpoteesideks on:

- 1) asooli toimeainete suhtes on *Z. tritici* Eesti populatsiooni tundlikkus vähenenud,
- 2) asoolide märklaudvalgu *CYP51* mutatsioonid on levinud *Z. tritici* Eesti populatsioonis,

3) SDHI inhibiitorite märklaudvalgu alaühikute *SdhC* ja *SdhB* mutatsioonid ei ole Eesti *Z. tritici* populatsioonis levinud,

4) strobiluriinide märklaudvalgu *CytB* mutatsioon G143A on Eestis *Z. tritici* populatsioonis levinud.

Töö autor tänab juhendajaid Evelin Loit'u, Riinu Kiiker'it ja Pille Sooväli't töö juhendamise ja suunamise eest. Tänu kuulub ka Andres Mäe'le erialase nõu ja väljaõppe eest ning Taari talule pideva erialase praktika eest. Uurimistöö on valminud Maaeluministeeriumi projekti nr. 10.1-2/177 ja Haridus- ja Teadusministeeriumi projekti "Sordiaretus" nr. 2014-2020.4.01.16-0037 toel.

Uurimistöö põhjal on avaldatud eestikeelne artikkel *Agronoomia* kogumikus (Juurik *et al.* 2021) ja teadusartikkel rahvusvahelises eelretsenseeritud ajakirjas *Microorganisms* (Kiiker *et al.* 2021).

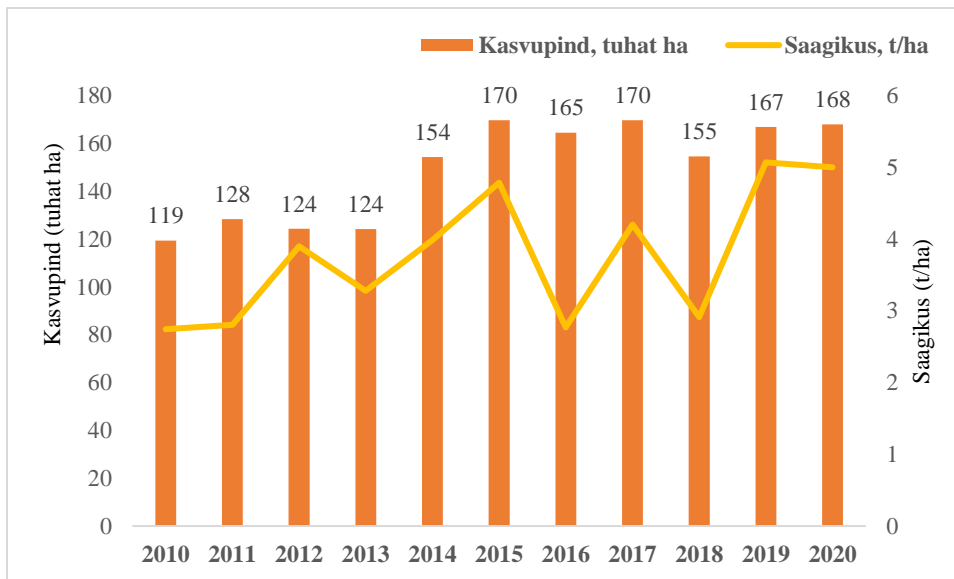
# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Nisukasvatus

Nisu hakati kasvatama 10 000 aastat tagasi, kui mindi üle jahtimiselt ja koriluselt püsivale põllumajandusele. Tegemist oli diploidsete ja tetraploidsete nisudega, mis pärinesid Türgi kaguosast. Võrreldes teiste parasvöötme põllukultuuridega, on nisul optimaalsete kasvutingimuste korral kõrge saagikus. Nisu on hõlpsasti koristatav ja säilitatav ning seda kasutatakse nii toidu- kui söödaviljana üle kogu maailma. 2018. aastal kaardistati 94 % ulatuses heksaploidse nisu genoom, mis on 16 miljardi aluspaari pikkune, sisaldab üle 107 tuhande geeni järjestuse. Nisu genoomijärjestus on sordiaretuse jaoks oluline vahend nisu omaduste ja saagikuse parendamisel. (International Wheat Genome... *et al.* 2018; Shewry 2009)

2015.-2019. aastal kasvatati maailmas nisu keskmiselt 218 miljonil hektaril (ha), Euroopas keskmiselt 62 miljonil ha-l. Kogu maailma keskmine nisu saagikus jäi alla 4 t/ha, samal ajal Euroopa nisu saagikus küündis üle 4 t/ha. Regiooniti vaadeldes on Euroopa nisu saagikusega esirinnas, madalaima tootlikkusega on Okeania ja Aafrika, mis pole nisu kasvatuseks soodsad alad. Suurimad tootjad maailmas aastatel 2015-2019 olid riikidest Hiina, India ja Prantsusmaa. (Food and Agriculture... 2021)

Nisu on põllumajandustootja jaoks oluline tuluallikas tänu kõrgetele (180-190 EUR/t) teravilja kokkuostuhindadele (Eesti Põllumajandus-Kaubanduskoda 2021). Nisu kasvupind Eestis on kõikunud aastatel 2010-2020 119 ja 170 tuhande ha vahel, saavutades rekordpindala 2015. aastal (joonis 1). Kõikumine tuleneb ka külvikorrast, mis on ettenähtud. Saagikus on samuti olnud ebastabiilne, varieerudes 3-5 t/ha vahel. Kuna tava- ja maheviljelusest pärit nisu arvatakse kokku, teeb see maheviljeluse madalama saagikuse tõttu nisu keskmise saagikuse madalamaks.

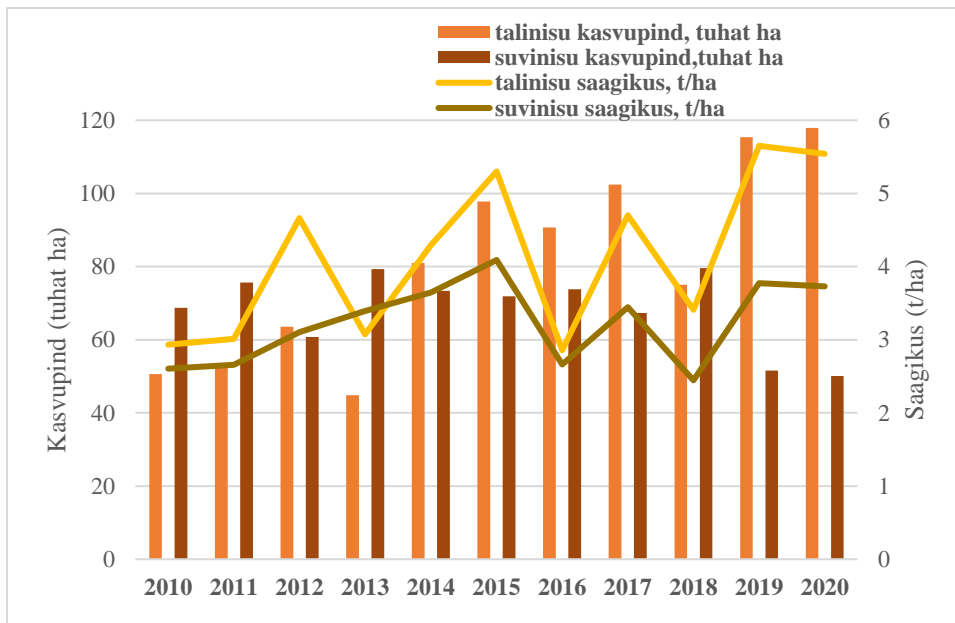


**Joonis 1.** Nisu kasvupind ja saagikus Eestis aastatel 2010-2020. Allikas: STAT.

2014. aastal kasvas nisu kasvupind 30 tuhande ha võrra võrreldes eelneva aastaga, kuna talivilja külvi varjutas 2013. aastal vihmane sügis. Aastad 2015 ja 2017 olid rekordilised saagiaastad nisukasvatuseks soodsate ilmaolude tõttu. Kuigi kasvupind ei vähenenud 2016. aastal, siis märg suvi raskendas talinisu koristust ja langetas saake. 2018. aastal jätsid aga kuumus ja kuivus saagipotentsiaali realiseerimata. Võrreldes eelnevate aastatega püsis 2019. ja 2020. aastatel nisu suur kasvupind ja koguti aegade suurimad teraviljasaagid Eestis. (Maaeluministerium 2021)

Tali- ja suvinisu kasvupindade ja saagikuse võrdlemine viimase 10 aasta jooksul annab arusaama, millised muutused on nisukasvatases toimunud (joonis 2). Kui talinisu saagikus on viimastel aastatel olnud peaaegu 6 t/ha, siis suvinisu puhul on saagikus 4 t/ha ja sedagi vaid parimatel saagiaastatel. Varasemalt kasvatati suvinisu rohkem kui talinisu, kuid alates 2014. aastast on talinisu kasvupind olnud suurem ning viimastel aastatel lausa kaks korda suurem suvinisu kasvupindalast. See näitab järjest suurenevat trendi taliviljade kasvatamisel tänu meie kliimasse paremini sobivatele stabiilsematele ja vastupidavamate omadustega sortide kättesaadavusele ja kasvatamisele (Koppel *et al.* 2020).





**Joonis 2.** Tali- ja suvinisu kasvupind ja saagikus Eestis aastatel 2010-2020. Allikas: STAT.

### 1.1.1 Nisu agrotehnoloogia

Parasvöötmes toimub nisu saagikoristus aprillist septembrini ja lõunapoolkeral oktoobrist jaanuarini. (Curtis *et al.* 1982; Grains Research... 2016). Eestis kasvatatakse nii tali- kui ka suvinisu. Talinisu külvatakse sügisel, taim püsib talv läbi põllul, läbib vernalisatsiooni ning saak koristatakse suvel juulikuus. Suvinisu külvatakse kevadel ning saagikoristus toimub enamasti augustis. Talinisu on sageli suurema saagikusega, kuid suvinisul on kõrgemad kvaliteedinäitajad. (Jabran *et al.* 2017; Koppel, Ingver 2008)

Idanemine algab seemne vee imemisega endasse ja lõpeb idujuure ilmumisega. Nisu idanemine sõltub temperatuurist, optimaalne temperatuurivahemik on 12-25°C. Taimede kasvuks optimaalne temperatuur on +25°C, kuid nisu on suuteline kasvama ka minimaalselt +3°C ja maksimaalselt +31°C juures. Kolmveerand kogu nisu pindalast maailmas saab aastas keskmiselt 375-875 mm sademeid, siiski kasvatatakse nisu ka kohtades, kus sademete hulk on äärmuslikum (250-1750 mm aastas). Optimaalseks tootmiseks on vajalik niiskuse kättesaadavus terve kasvuperioodi vältel, kuid liigsed sademed põhjustavad saagikuse langust.

Varustades nisu toitainetega on võimalik tõsta saagikust ja kvaliteeti. Kuid peab arvestama, et vajadus sõltub mullaviljakusest, kliimatingimustest, sordi omadustest ja oodatavast saagist. Nisu vajab kasvuks ja arenguks lämmastikku, fosforit, kaaliumit, väävlit, boori, rauda ja tsinki. Talinisu puhul tekib suurim toitainete vajadus kevadise maksimaalse vegetatiivse kasvu ajal. Üle 80 % toitainetest vajab taim pähiku loomisel saagipotentsiaali realiseerimiseks. (Pandey *et al.* 2020; Roy *et al.* 2006)

### 1.1.2 Taimahaigused nisul

Nisu ohustavad mitmed taimahaigused, mis langetavad saagikust. Peamisteks taimahaigusteks on nisul kõrreliste jahukaste (*Blumeria graminis*), roostehaigused (*Puccinia triticina*, *P. graminis*, *P. striiformis*), laiksused (*Zymoseptoria tritici*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Cochliobolus sativus*), fusarioos (*Fusarium spp.*) ja lumiseen (*Microdochium nivale*). Kuid nisu võivad kimbutada ka kõrreliste juuremädanik (*Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium spp.*), silmlaiksus (*Oculimacula yallundae*), nõgahaigused (*Ustilago tritici*, *Tilletia laevis*, *T. caries*) ja tungaltera (*Claviceps purpurea*). (Achieving... 2017; Figueroa *et al.* 2017; Sooväli, Kann 2018)

### 1.3 Kõrreliste helelaiksus

*Zymoseptoria tritici* (teleomorf *Mycosphaerella graminicola*) põhjustatud kõrreliste helelaiksust (joonis 3) peetakse kõige laastavamaks haiguseks parasvöötmes kasvanud nisul, peamiselt talinisel (Fones *et al.* 2020). Saagikuse langus võib olla 30-50 % (Berraies *et al.* 2014). *Z. tritici* peremeestaimedeks on harilik nisu (*Triticum aestivum L.*) ja durum nisu (*T. turgidum ssp. durum L.*) (Orton *et al.* 2011). Täielikult haiguskindlaid sorte ei kasvatata ja seetõttu suudab patogeen peremeestaimet nakatada, pärssides selle vastureaktsioone nakatumisel (Duba *et al.* 2018). Haigustekitaja leviku ja nakkuse jaoks on optimaalne temperatuurivahemik 15–20°C. Niiske ja vihmane ilm on soodne *Z. tritici* levikuks, niiskus

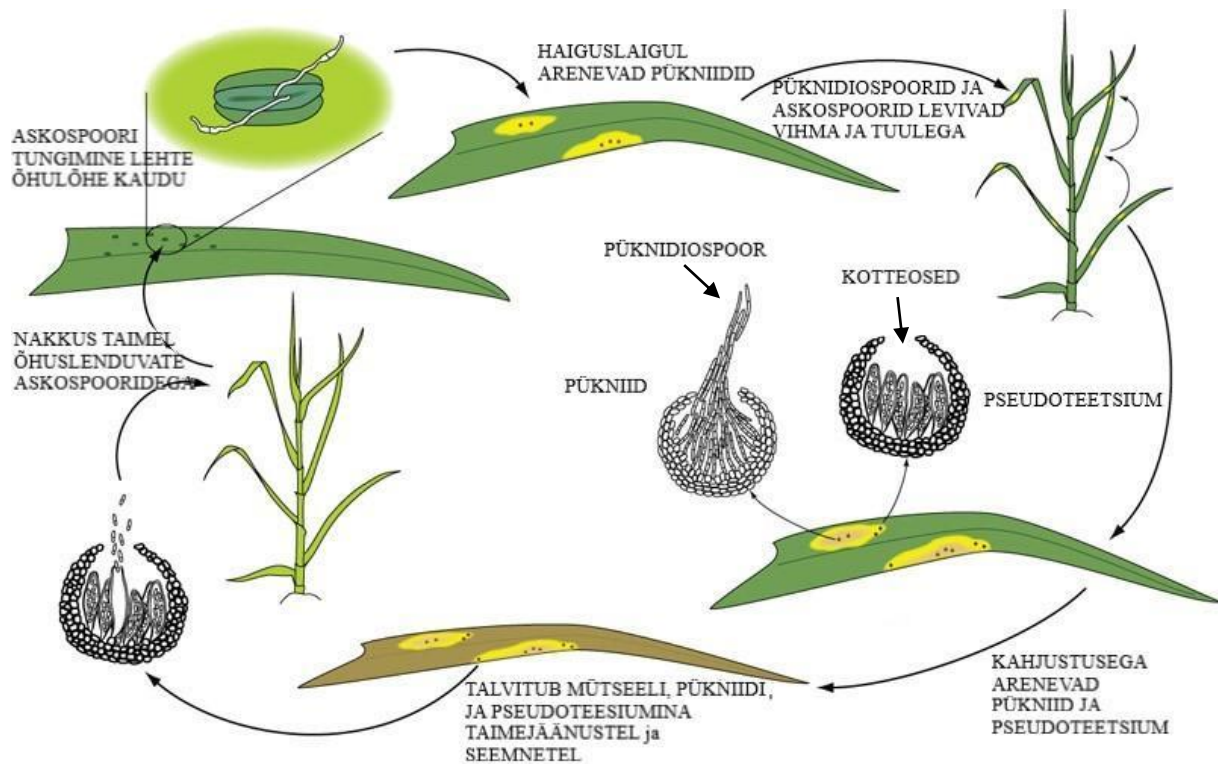
aitab askosporidel kergemini lehepinna kinnituda ja areneb rohkem pükniide (Jørgensen *et al.* 2014). Pikaajaliste uuringute alusel mõjutavad kliimamuutused *Z. tritici* populatsioone ja haiguse intensiivistumist (Bearchell *et al.* 2005).



**Joonis 3.** *Zymoseptoria tritici* nakatanud taimed talinisupõllul. Foto autor: Riinu Kiiker.

*Z. tritici* kuulub kottseente hõimkonda. Patogeeni esmane levik toimub kotteoste ja mittesuguliste püknidiosporidega tuule ning vihma abil (Orton *et al.* 2011). *Z. tritici* elutsükkel jaguneb kaheks – sümptomiteta endofüütne ja nekrotroofne faas (joonis 4). Sümptomiteta faasis toimub esmalt taime koloniseerimine seene poolt. Sisenedes õhulõhede kaudu, asustab seen rakkudevahelised alad (Rudd 2015; Brennan *et al.* 2019). Nekrotroofs faasis areneb patogeen peremeestaimes kuni 4 nädalat, sümptomid ilmnevad enamasti 10-14 päeva pärast nakatumist. Esialgu tekivad lehtedele klorootilised täpid, mis tähendab leherakkude suremist. Järgneb ulatuslikum klorootiline kahjustus ja seente mittesuguline sporuleerumine pükniidides, milledes moodustunud püknidiosporid levivad edasi ja nakatavad ülemisi taimekudesid ja naabertaimi. Nekroos omakorda takistab taimede arengut ja vähendab taimede fotosünteesimisvõimet. (Dean *et al.* 2012; Orton *et al.* 2011; Sooväli, Kann 2018)

*Z. tritici* metsiktüüp ja võrdlusisolaat kõikides *Z. tritici* populatsiooniuringutes on IPO323, mis isoleeriti Hollandis 1984. aastal sordilt 'Arminda.' Metsiktüübi genoom on sekveneeritud ja sisaldab 21 kromosoomi, millest 8 võivad kaduda ilma patogeeni mõjutamata. Leiti, et genoom sisaldas väga vähe taimerakkude seinu lõhustavate ensüümide geene, mis iseloomustab hoopis endofüüte. (Goodwin *et al.* 2011)



**Joonis 4.** *Z. tritici* elutsükkel (Ponomarenko *et al.* 2011).

### 1.3.1 Helelaiksuse tõrje

Talinisu külviaeg võiks olla võimalikult hiline, et taimedel oleks sügisel lühem kokkupuuteaeg askosporidega ja kasvuperioodi alguses kevadel oleks taimed võimalikult vähe nakatunud. Kuna *Z. tritici* talvitub taimejäänustel, siis üheks tõrjemeetmeks on kõrrejäanuste hävitamine. Minimeeritud harimine suurendab nakatumise riski, eriti kui kõrrejäanused on hävitamata (Curtis *et al.* 2002). On leitud, et erinevate omadustega nisusortide segud vähendavad *Z. tritici*

esinemist ja nakkuse ulatust (Kristoffersen *et al.* 2020; Vidal *et al.* 2017). Kasvatamisel tuleks eelistada haiguskindlaid ja Eesti tingimuste jaoks aretatud sorte (Brown *et al.* 2015; Koppel *et al.* 2021). Kuid tuleb arvestada, et sordiresistentsus on ajas muutuv, kuna patogeeni virulentsus muutub (Vagndorf *et al.* 2018). Suurema kaitse taimedele annab fungitsiidide kasutamine seemnete puhtimisel ning lehestiku ja pähikute pritsimine taime kasvuajal. (Agriculture and... 2021; Sooväli, Kann 2018)

## 1.4 Fungitsiidid

Fungitsiidsete omadustega kemikaale on teatud juba palju aastaid. Esimesed fungitsiidid, mis baseerusid väävli- ja vaseühenditel, avastati 19. sajandil. Läbi aastate on fungitsiidid märkimisväärselt arenenud, viimastel aastatel on jõutud konkreetse ülesandega molekulide disainini. (Lucas 2020)

Kaasaegsed selektiivsed fungitsiidid on kohtspetsiifilised, mistõttu seonduvad need spetsiifiliste märklaudvalkudega ja häirivad teatud olulisi rakuprotsesse. Varasemalt kasutatud fungitsiidid toimivad mitmetele rakuprotsessidele inhibeerivalt. Kohtspetsiifilise fungitsiidi tundlikkuse vähenemine võib ilmneda märklaudvalgu muutumisel, aga mittespetsiifilise fungitsiidi puhul on selleks vaja mitmeid muutusi. Kohtspetsiifilised fungitsiidid on väga aktiivsed ühendid ja sageli süsteemsed, andes sellega hea kontrolli haiguse üle juba väikeste koguste kasutamise puhul. (Lucas *et al.* 2015)

Kõrreliste helelaiksusele suunatud tõrjele kulutatakse Euroopa Liidus kogu fungitsiidikuludest 70 % (Brennan *et al.* 2019). Tõrjeks kasutatakse peamiselt kolme rühma fungitsiide – asoole (DMI-rühm), suksinaatdehüdrogenaasi inhibiitoreid (SDHI rühm) ja strobiluriine (Qol rühm) (tabel 1).

**Tabel 1.** Uuritavate fungitsiidi rühmade toimeviisid (Lucas *et al.* 2015)

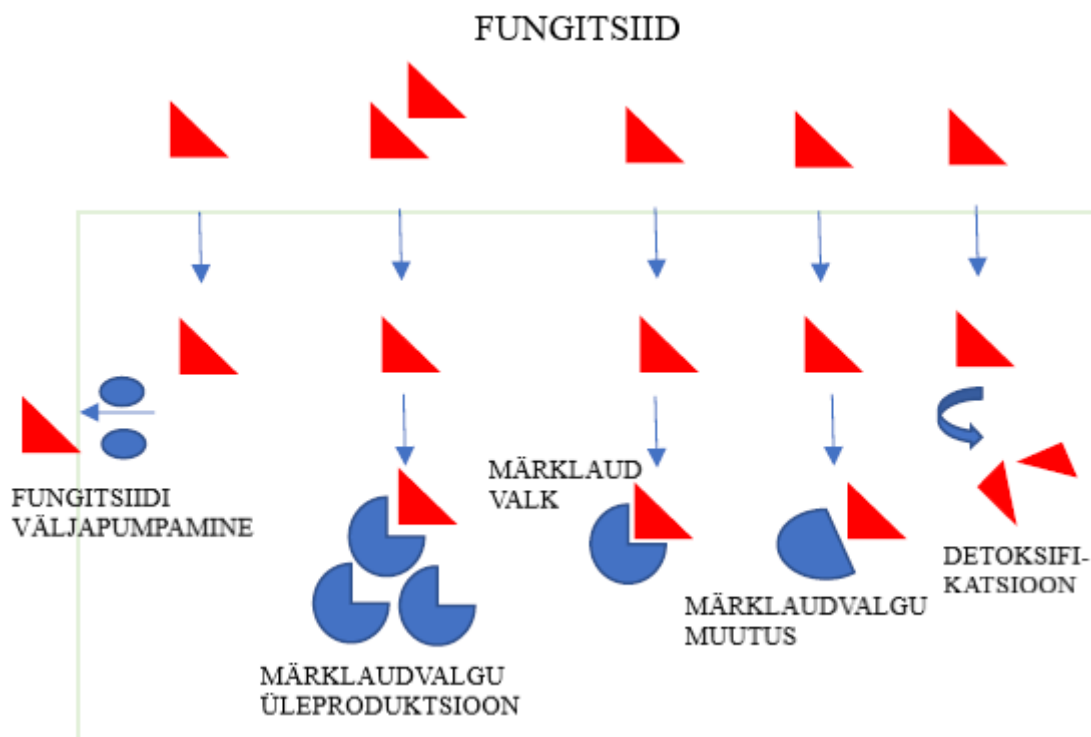
Fungitsiidirühm	Mõjutatav rakufunktsioon	Märklaudvalk
Asoolid	membraani biosüntees	sterool 14 $\alpha$ -demetülaas (CYP51)
SDHI-d	rakuhingamine	suktsinaatdehüdrogenaas (SDH)
Strobiluriinid	rakuhingamine	mitokondriaalne tsütokroom b (CytB)

## 1.5 Fungitsiidiresistentsus

Fungitsiidiresistentsus on seene populatsiooni indiviidide kohandumine fungitsiidi toimeainete suhtes nii, et need ei mõju enam seene kasvule ja arengule pärssivalt (Leadbeater 2014). Fungitsiidiresistentsus hakkas levima 1970. aastatel, kui võeti laiemalt kasutusele uute kohtspetsiifiliste toimeviisidega kemikaalide klassid (Brent 2012). Kohtspetsiifiliste fungitsiidide resistentsuse teket mõjutavad fungitsiidi toimeviis ja kõrge efektiivsus ning patogeeni bioloogia ja epidemioloogia (Lucas *et al.* 2015).

Fungitsiidiresistentsuse püsimiseks patogeeni populatsioonis on vajalik resistentsust põhjustavate geenmutatsioonide levimine ja püsimine läbi mitme kasvuperioodi (Georgopoulos, Skylakakis 1986). Algselt võib resistentne mutant olla 1:1000 miljonist. Järjepideval fungitsiidide kasutamisel võib resistentsete mutantide osakaal suureneeda. Kui populatsioonis 1:100st kuni 1:10st on resistentne mutant, siis võib esineda raskusi haigustõrjel ja resistentsete patogeenide olemasolu on lihtsamini tuvastatav. Mida efektiivsem on fungitsiid, seda aeglasemalt suureneb resistentsete mutantide arv populatsioonis. (Brent, Hollomon 2007) Fungitsiidisegude kasutamist ja toimeainete vahetamist peetakse resistentsuse ennetamisel olulisteks võteteks (Torriani *et al.* 2015), lisaks on suudetud tõsta selle võttega nisu saagikust (Wieczorek *et al.* 2015).

Seentel esineb nelja erinevat fungitsiidiresistentsuse tekkemehhanismi (joonis 5). Kõige levinum on märklaudvalgu muutus, mis takistab fungitsiidiga seondumist ehk tekib sihtkoha resistentsus. Tekkemehhanismideks võivad olla ka fungitsiidi transportimine rakust välja, märklaudvalgu üleproduktioon, mistõttu on efektiivseks tõrjeks vaja kasutada suuremaid fungitsiidi kulunorme ning fungitsiidi lagunemine metaboolsete ensüümide abil ehk detoksifikatsioon. (Brent, Hollomon 2007; Lucas *et al.* 2015)



**Joonis 5.** Fungitsiidiresistentsuse toimetehhanismid taimerakus.

Laia toimespektriga asoolidel põhinevad fungitsiidid tulid turule 1980ndate alguses (Maintaining the effectiveness... 2002). Asoolide resistentsus on osaliselt tingitud punktmutatsioonidest CYP51 ensüümis, mis vastutab väga olulise rakumembraani valgu ergosterooli sünteesi eest. Kui see protsess häiritud on, siis on takistatud ka seene normaalne kasv ja areng (Marichal *et al.* 1999). CYP51 ensüümi mutatsioonidest on viimastel aastatel Euroopa populatsioonides levinud D134G, V136A, V136C, A379G, I381V ja S524T, millest viimane mutatsioon on seotud oluliselt suurema resistentsuse levikuga (Heick *et al.* 2020; Jørgensen *et al.* 2020).

SDHI esimese põlvkonna fungitsiide kasutati rohkem kui 40 aastat tagasi, kuid alates 2003ndast aastast on uue põlvkonna SDHI-d suurenenud spektri ja tugevusega ning neid arendatakse pidevalt edasi. SDHI märklaudvalk on suksinaatdehüdrogenaas (SDH), mis koosneb neljast alaühikust (A, B, C ja D), kuid SDHI molekul seondub B, C ja D alaühikutega. Märklauda mutatsioonid, mis vähendavad tundlikkust fungitsiidide suhtes võivad areneda kõigis kolmes alaühikus. Viimaste aastate jooksul on Euroopa populatsioonis kõige enim levinud mutatsioonid C-T79N ja C-N86S SDH C alaühikus. On esinenud ka teisi mutatsioone: C-N33T,

C-N34T, C-T79N, CW80S, C-N86S, B-N225T, B-T268I ja C-H152R (FRAC. SDHI fungicides, 2021; FRAC. Succinate Dehydrogenase Inhibitor... 2020).

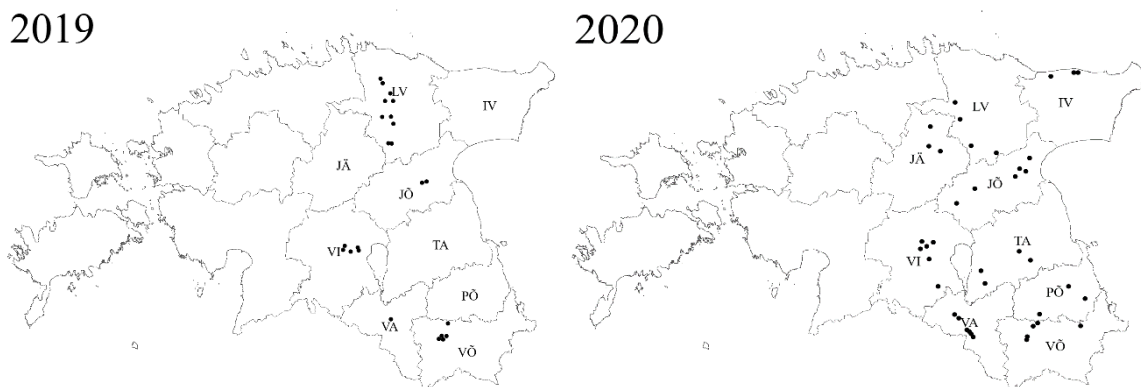
Strobiluriine kasutatakse seenhaiguste tõrjel alates 1990ndatest. Strobiluriinid on molekulid, mis pärsivad taimepatogeene blokeerides nende võimet energiat toota. Strobiluriinide suhtes tekib resistentsus juba ühe spetsiifilise mutatsiooni esinemise korral, *Z. tritici* CytB valgus mutatsioon G143A, kus 143 koodonis on glütsiin asendatudalaniiniga (Fraaije *et al.* 2005). Strobiluriinide rühma liikmete puhul on tegemist ristresistentsusega, mis tähendab, et kui tekib resistentsus ühe toimeaine suhtes, siis esineb resistentsus ka teiste sama rühma toimeainete suhtes (FRAC. Qol fungicides, 2021).



## 2. MATERJAL JA METOODIKA

### 2.1 Isolaatide kogumine

Proovid koguti põllumajandusühistu Kevili tootjate ja Eesti Taimakasvatuse Instituudi talinisu monitooringu põldudelt aastatel 2019-2020 (joonis 6). Kogumine toimus kasvuperioodil juunist augustini. 2019. aastal isoleeriti 104 *Z. tritici* isolaati viiest maakonnast (Jõgeva, Lääne-Viru, Viljandi, Võru ja Valga maakond) ja 2020. aastal 179 isolaati üheksast maakonnast (Järva, Jõgeva, Lääne- ja Ida-Viru, Tartu, Põlva, Viljandi, Võru ja Valga maakond).



**Joonis 6.** Proovid koguti Jõgeva (JÕ), Järva (JÄ), Lääne-Viru (LV), Ida-Viru (IV), Tartu (TA), Viljandi (VI), Valga (VA), Põlva (PÕ) ja Võru (VÕ) maakondadest aastatel 2019 ja 2020.

Igalt põllult koguti 10-20 patogeeniga nakatanud nisulehte, mis kuivatati toatemperatuuril. Seejärel *Z. tritici* puhaskultuuri isoleerimiseks asetati lehed Petri tassi niisutatud filterpaberile ja jäeti toatemperatuurile (20°C) 24 tunniks. Üksikud püknidiospoorid külvati steriilse nõelaga kartuli-dekstroos agarsöötmele, kuhu oli lisatud 0,01 % antibiootikumi streptomütsiin (joonis 7). Petri tasse inkubeeriti temperatuuril 17-20°C. Püknidiospooridest tekkisid üksikkolooniad (puhaskultuurid) 5-6 päeval, mis külvati veelkord ümber uuele kartuli-dekstroos agarsöötmele. Puhaskultuure säilitati pikaajaliselt 20 % glütseroolis -80°C juures.



**Joonis 7.** Nisu lehel olevad pükniidid ja pükniidiospoorid vahetult enne söötmele külvamist.  
Foto autor: Marite Juurik

## 2.2 Fungitsiiditundlikkuse määramine

Esmalt valmistati *Z. tritici* eoste suspensioon, kasutades kuue päeva vanuseid *Z. tritici* isolaate ja 10 ml steriilset destilleeritud vett Falcon tuubis. Segu ühtlustamiseks loksutati suspensiooni 10 minutit raputis (Heidolph, Schwabach, Saksamaa) 2000 rpm juures. Eoste kontsentratsioon lahjendati  $2,5 \times 10^4$  eoseni 1 ml-s vees.

Fungitsiidide tundlikkust asoolide suhtes määrati *Z. tritici* isolaatidel mikrotiiterplaadimeetodil. Testitavateks toimeaineteks olid epoksikonasool, protiokonasool-destio ja mefentriiflukonasool. Vaid 2019. aastal testiti tebukonasooli juhuslikult valitud isolaatidel. Iga toimeaine segati eraldi kahekordse kartuli deskstroosi (PDB) lahusega ja tehti lahjendusterida, et mikrotiiterplaadil oleksid vastavad fungitsiidi kontsentratsioonid (ppm):

- 1) epoksikonasool – 30; 6; 1,2; 0,240; 0,048; 0,010; 0,002; ja 0;
- 2) protiokonasool-destio – 6; 2; 0,670; 0,220; 0,074; 0,025; 0,008; ja 0;
- 3) mefentriiflukonasool – 3; 1; 0,330; 0,110; 0,037; 0,012; 0,004; ja 0;
- 4) tebukonasool – 90; 30; 10; 3,3; 1,1; 0,37; 0,12; ja 0.

96 kannuga mikrotiiterplaadile lisati igasse kannu 100 µl patogeeni suspensiooni ja 100 µl fungitsiidi lahjendust. Igat isolaati analüüsiiti kahes korduses ühel plaadil ning Hollandi isolaat IPO323 (asoolidele tundlik) lisati referentsisolaadina. Mikrotiiterplaadid pakiti fooliumisse ja hoiti pimedas +20°C juures kuus päeva. Enne proovide optilise tiheduse (OD) mõõtmist plaatidel Tecan Sunrise neelduvuslugejaga (Tecan, Männedorf, Šveits) lainepikkusel 620 nm, kontrolliti visuaalselt plaatide saastatust bakterite ja seentega.

### 2.3 Mutatsioonide määramine märklaudvalkude geenides

*Z. tritici* puhaskultuuridest eraldati DNA Zhang *et al.* 2010 termolüüsi meetoodika järgi. Isolaatides uuriti *CYP51*, *CytB* ja *Sdh* geenide mutatsioone. *CYP51* geenimutatsioonide D134G, V136A/C, G379A, I381V ja S524T ning *CytB* geenimutatsiooni G143A määramiseks kasutati konkureeriva alleeli spetsiifilise polümeraasi ahelreaktsiooni (KASP) genotüpiseerimist, mis on kirjeldatud Kildea *et al.* 2014 poolt. Analüüsid viidi läbi Applied Biosystems ViiATM 7 Real-time PCR masinaga (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) tootja protokoll järgi.

*Sdh* alaühik B ja C järjestused saadi Fraaije *et al.* 2012 ja Rehfus *et al.* 2018 protokollide järgi. *SdhB* amplifikatsiooniks kasutati praimereid Mgsdhbf1 ja Mgsdhbr1 ning *SdhC* amplifikatsiooniks KES 584 ja KES 550 (tabel 2). PCR reaktsioon viidi läbi 25 µl-s, kus 10,9 µl oli MilliQ vesi, 5,0 µl 5-kordne DreamTaq PCR puhvrit (Thermo Fisher Scientific Inc.), 100 µM dNTP-d, pärisuunalist ja vastassuunalist praimerit (mõlemat 0,2 µM), 0,2 µl DreamTaq DNA polümeraasi (Thermo Fisher Scientific Inc.), 1,0 µl *Z. tritici* proovide DNA-d ja ülejäänud hulgas steriilset vett.

**Tabel 2.** *SdhB* ja *SdhC* geenide amplifikatsiooniks kasutatud praimerid

<b>Praimer</b>	<b>Geen</b>	<b>Praimerjärjestus 5'-3'</b>	<b>Viide</b>
Mgsdhbf1	<i>SdhB</i>	ACTCTTCTCACATACCACACA	Fraaije <i>et al.</i> 2012
Mgsdhbr1	<i>SdhB</i>	CTTTCCAATCATCTCGTTCCAT	Fraaije <i>et al.</i> 2012
KES 584	<i>SdhC</i>	ATGTTGGCACAGAAGCTCAC	Rehfus <i>et al.</i> 2018
KES 550	<i>SdhC</i>	TTACGATTCCATACTTCAGAAAGGC	Rehfus <i>et al.</i> 2018

Amplifikatsioon teostati termotsükleris Eppendorf Mastercycler nexus X2 (Eppendorf, Viin, Austria) järgmise programmi järgi: 95°C juures 5 minutit, 35 tsükli 95°C juures 60 sekundit, 62°C juures 30 sekundit, 72°C juures 90 sekundit, ning 5 minutit 72°C juures..

PCR saadused sekveneeriti, kasutades samu primereid, Applied Biosystems 3730 DNA analüsaatoriga Eesti Biokeskuses, Tartus. Järjestusi võrreldi BioEdit programmis IPO323 geeni järjestustega, määrati märklaudgeenis olevad mutatsioonid, mis põhjustavad *Sdh* valgu alaühikutes aminohappelise järjestuse muutusi: C-N33T, C-N34T, C-T79N, C-W80S, C-N86S, C-H152R, B-N225I ja B-T268I.

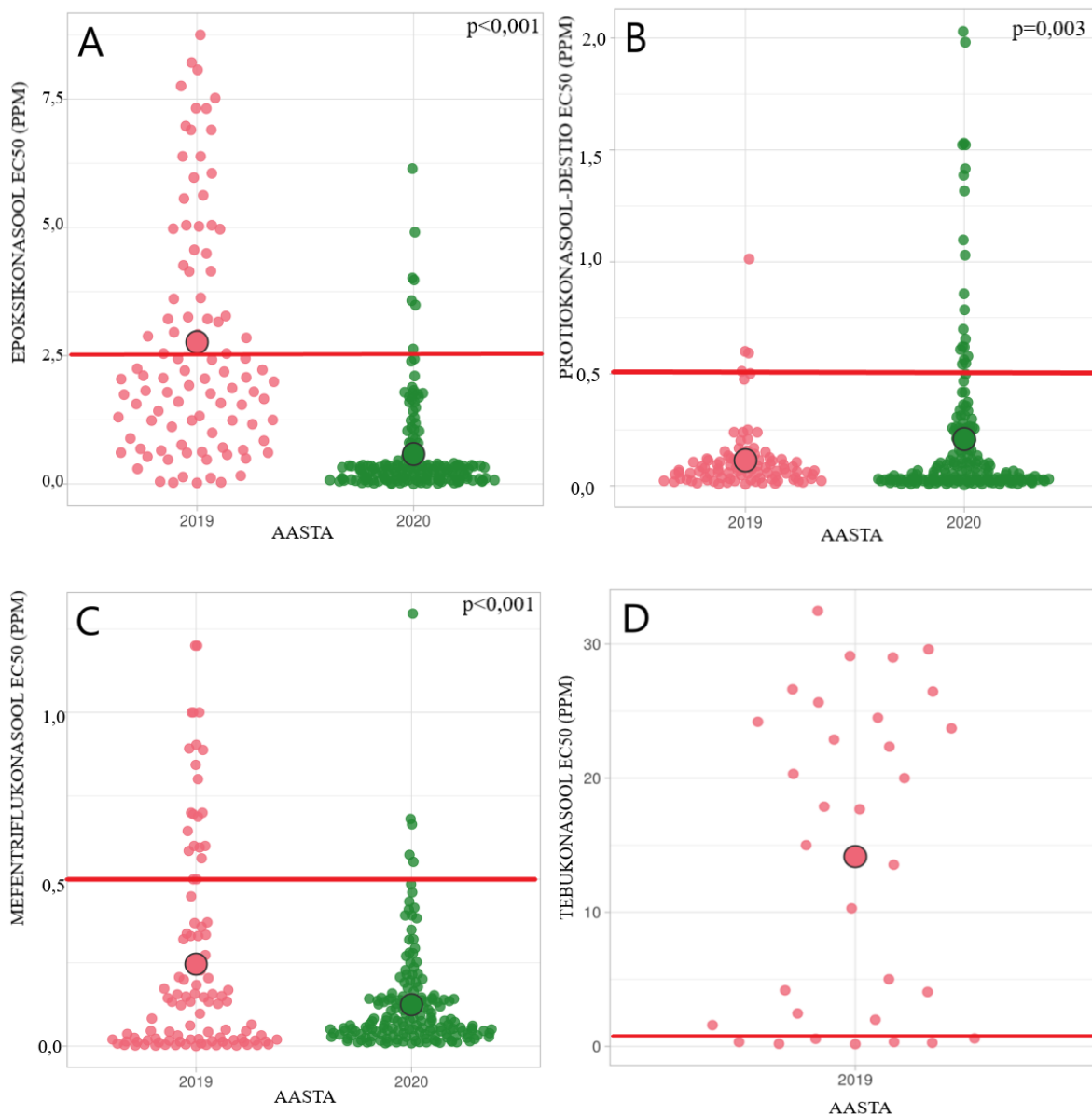
## 2.4 Statistiline andmetöötlus

Statistilised analüüsid viidi läbi MS Office Excel 2020 ja GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, US) kasutades. Mikrotiiterpladikatsede analüüsimisel arvutati mittelineaarse regressiooni meetodil iga isolaadi kohta fungitsiidi EC50 väärtus, mis näitab fungitsiidi kontsentratsiooni, mis inhibeerib patogeeni kasvu 50 % võrra. Tegemist on kõige sagedamini kasutatava parameetriga patogeeni tundlikkuse hindamiseks fungitsiidi suhtes (Li *et al.* 2015). EC50 väärtuste visualiseerimiseks kasutati rakendust SuperPlotsOfData Shiny (Goedhart, 2020). Welchi t-testiga hinnati 2019. ja 2020. aasta *Z. tritici* populatsioonide omavahelisi EC50 väärtusi. Pearsoni korrelatsioonanalüüsi kasutati logaritmitud asoolide toimeainete paaride EC50 väärtuste võrdlemiseks. Fisheri täpse testiga (*Fisher exact test*) leiti 2019. ja 2020. aasta *Sdh* geeni mutatsioonide olulisustõenäosus.

### 3. TULEMUSED

#### 3.1 Asooli toimeainete tundlikkus

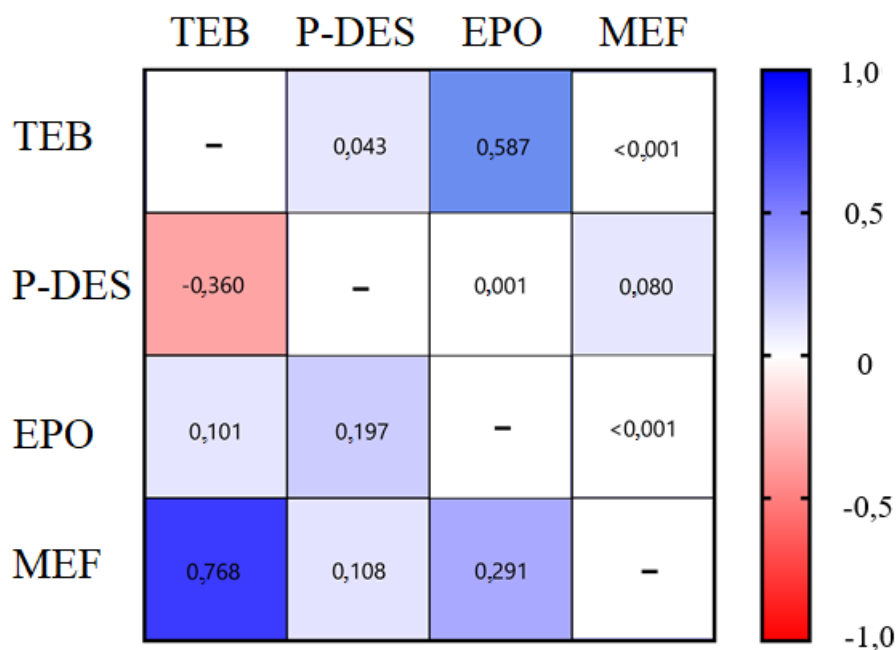
DMI-rühma fungitsiidide tundlikkuse testimiseks Eesti *Z. tritici* populatsioonis kasutati epoksikonasooli, protiokonasooli-destiot, mefentriflukonasooli ja tebukonasooli. Iga isolaadi kohta arvutati EC50 väärtused ja analüüsiti tulemusi aastate vahel, kui EC50 väärtused tõusevad, siis populatsiooni tundlikkus väheneb toimeaine suhtes. Aastatel 2019-2020 täheldati märkimisväärset tundlikkuse tõusu epoksikonasooli ja mefentriflukonasooli suhtes, mille keskmised EC50 väärtused langesid 2,76-lt 0,58 ppm-le ( $t(116)=9,1$ ;  $p<0,001$ ) ja 0,25-lt kuni 0,12 ppm-ni ( $t(131)=3,63$ ;  $p<0,001$ ) (joonis 8). Samal perioodil protiokonasool-destio tundlikkus langes, keskmine EC50 väärtus tõusis 0,11-lt kuni 0,21 ppm-ni ( $t(255)=2,99$ ;  $p=0,003$ ) (joonis 8). Tebukonasooli toimet testiti vaid juhuslikult valitud isolaatidel 2019. aastal ja selle keskmine EC50 väärtus oli kõrge, keskmiselt 14,15 ppm.



**Joonis 8.** Epoksikonasooli, protikonasool-destio, mefentriflukonasooli ja tebukonasooli EC50 väärtused Eesti *Z. tritici* populatsioonis 2019-2020. Punasega joonega on märgitud resistentsuspiir, Taani Aarhus Ülikooli T. M. Heicki uuringute avaldamata andmetel.

2019. aasta isolaatide seas oli mefentriflukonasooli suhtes kõrge EC50 väärtusega 22 isolaati Jõgeva (kesk. EC50=0,41 ppm) ja Lääne-Viru maakonnast (kesk. EC50=0,3 ppm). Edasised analüüsid näitasid, et nende *Z. tritici* isolaatide tundlikkus oli vähenenud tebukonasooli, aga mitte epoksikonasooli ja protikonasool-destio suhtes. Pearsoni korrelatsioonanalüüs kinnitas, et tebukonasooli ja mefentriflukonasooli tundlikkus on tugevas positiivses korrelatsioonis ( $r=0,768$ ,  $p<0,001$ ) (joonis 9). Märkimisväärne seos tuvastati ka epoksikonasooli ja mefentriflukonasooli ( $r=0,291$ ,  $p<0,001$ ) tundlikkuse ning epoksikonasooli ja protikonasool-

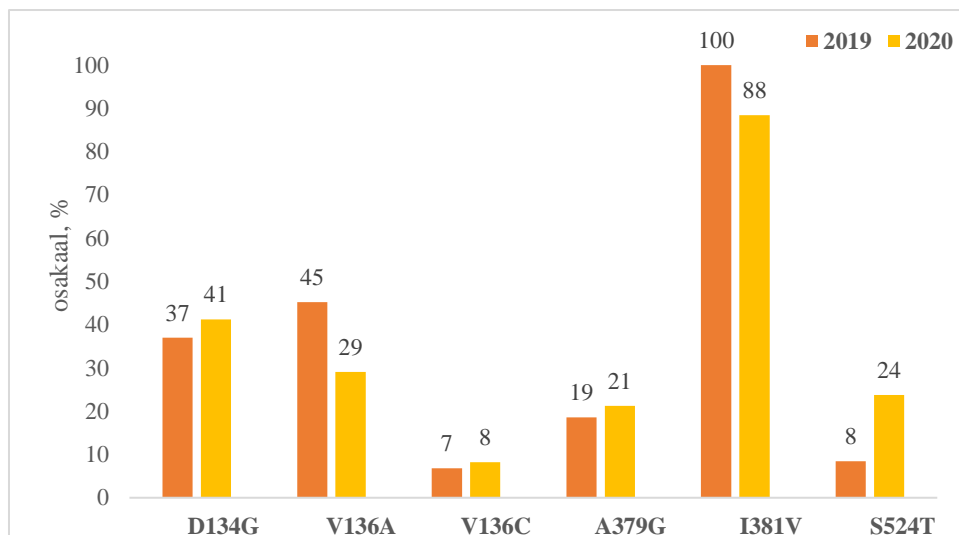
destio ( $r=0,197$ ,  $p=0,001$ ) tundlikkuse vahel. Seevastu tebukonasooli ja protiokonasool-destio tundlikkus oli Eesti *Z. tritici* populatsioonis negatiivses korrelatsioonis ( $r=-0,36$ ,  $p=0,04$ ).



**Joonis 9.** Korrelatsioonimaatriks tebukonasooli (TEB), protiokonasool-destio (P-DES), epoksikonasooli (EPO) ja mefentriflukonasooli (MEF) fungitsiidi tundlikkuse vahel Eesti *Z. tritici* populatsioonis. Pearsoni korrelatsioonikordaja ( $r$ ) väärtused on diagonaalist allpool ja  $p$ -väärtused diagonaalist ülalpool.

### 3.2 Mutatsioonid *CYP51* geenis

Kõrgenenud EC50 väärtuseid asoolide suhtes on seostatud mitmete mutatsioonidega *CYP51* geenis. KASP analüüs näitas, et kõige olulisemaid *CYP51* geenis olevad mutatsioonid (D134G, V136A, V136C, A379G, I381V ja S524T) esinevad *Z. tritici* Eesti populatsioonis (joonis 10).



**Joonis 10.** Levinumad mutatsioonid *CYP51* geenis Eesti *Z. tritici* populatsioonis 2019.-2020. a.

Mutatsioon I381V domineeris üle Eesti ja esines maakonniti 86-100 % ulatuses, välja arvatud Tartumaal, kus oli 2020. aastal vaid 38 % isolaatidest mutatsiooniga (LISA 1). Mutatsioonid D134G, V136A, V136C, A379G ja S524T, mis on hiljuti tekkinud ka mujal Euroopa *Z. tritici* populatsioonides, erinesid maakonniti märkimisväärselt. Populatsiooni tasandil oli D134G, V136C, A379G ja S524T mutatsioonidega *Z. tritici* isolaatide proportsioon suurenenud 2020. aastal, kuid V136A ja I381V näitasid 2020. aastal hoopis vähenemist populatsioonis võrreldes 2019. aastaga. Mõlemal aastal oli kõige domineerivamatel isolaatidel (39 % 2019. aastal ja 27 % 2020. aastal) spetsiifilise KASP analüüsi alusel ainult üks mutatsioon (I381V) *CYP51* geenis. Populaarsuselt teine oli mutatsioonide kombinatsioon A379G ja I381V (14 % 2019. aastal ja 15 % 2020. aastal), millele järgnes D134G, V136A ja I381V kombinatsioon (15 % 2019. aastal ja 11 % 2020. aastal).

Kõrgemad EC50 väärtused epoksikonasooli suhtes ( $EC_{50} > 3$  ppm) esinesid isolaatides, millel olid *CYP51* geenis mutatsioonide kombinatsioonid D134G, V136A, I381V ja S524T; V136A, I381V ja S524T; A379G, I381V ja S524T. Märkimisväärselt oli vähenenud tundlikkus mefentriflukonasooli ja tebukonasooli suhtes *Z. tritici* isolaatides koos A379G, I381V ja S524T mutatsioonide kombinatsiooniga geenis *CYP51* (mefentriflukonasool  $EC_{50} = 0,82$  ppm; tebukonasool  $EC_{50} = 24,75$  ppm). See sama kolme mutatsiooni A379G, I381V ja S524T kombinatsioon tuvastati *CYP51* geenis 2019. aastal kaheksal Lääne-Viru maakonna isolaadil ja 2020. aastal seda ei esinenudki.



### 3.3 Mutatsioonid *Sdh* geenis

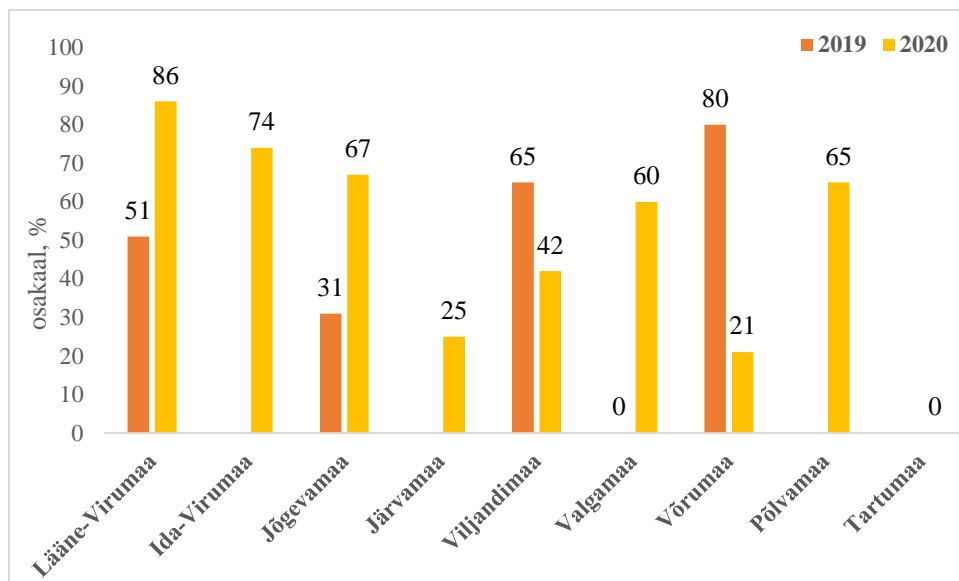
Mitmeid mutatsioone *Sdh* alaühikutes B ja C on seostatud kõrgeenenud EC50 väärtustega SDHI toimeainete suhtes. *SdhC* valgus tuvastati oluline erinevus mutatsioonide esinemisel aastate vahel, 2019. aastal esinesid mutatsioonid N33T ja N34T 65 %-l isolaatidel ja 2020. aastal 55 %-l isolaatidel (tabel 3) ( $p < 0,001$ ). 2019. aastal esines mutatsioon N86S vaid 2 %-l isolaatidest *Z. tritici* populatsioonis, kuid 2020. aastal tõusis sagedus 9 %-ni ( $p < 0,001$ ). *SdhB* valgus paiknev mutatsioon N225I oli haruldane ja avastati esmakordselt alles 2020. aastal 4 %-l isolaatidest ( $p = 0,007$ ). Mujal Euroopa riikides tuntud mutatsioone C-T79N, C-W80S, C-H152R ja B-T268I Eesti *Z. tritici* populatsioonis ei tuvastatud.

**Tabel 3.** *Sdh* geenis esinevad mutatsioonid Eesti *Z. tritici* populatsioonis 2019-2020.

Geen		<i>SdhC</i>			<i>SdhB</i>
Mutatsioon		N33T (%)	N34T (%)	N86S (%)	N225I (%)
Aasta	2019	65	65	1	0
	2020	55	55	9	4

### 3.4 Mutatsiooni G143A esinemine *CytB* geenis

Tundlikkus strobiluriinide suhtes määrati mutatsiooni G143A olemasolu abil geenis *CytB*, kasutades KASP analüüsi. Mutatsioon esines ligikaudu pooltel isolaatidel, 2019. aastal 44 % ja 2020. aastal 49 % ( $p = 0,46$ ). Maakondade lõikes mutatsioonisagedused erinesid (joonis 11). 2019. aastal puudus mutatsioon G143A Valgamaal ja 2020. aastal Tartumaal. 2019. aastal domineeris mutatsioon Võru, Viljandi ja Lääne-Viru maakondades, 2020. aastal aga Lääne-Viru, Ida-Viru, Jõgeva ja Põlva maakondades.



**Joonis 11.** Mutatsiooni G143A protsentuaalne esinemine *Z. tritici* populatsioonis Eesti maakondades 2019-2020.

## 4. ARUTELU

Seenhaigused peavad silmitsi seisma muutuva keskkonnaga ning muude erinevate väljakutsetega, sealhulgas kohanema resistentsete sortide, fungitsiidide ja bioloogiliste tõrjevahenditega. Käesolevas töös uuriti kõrreliste helelaiksusetekitaja *Z. tritici* Eesti populatsiooni asoolide tundlikkuse muutusi ja mutatsioonide levikut fungitsiidide märklauvalkude geenides.

Eestist isoleeritud 282 *Z. tritici* isolaadi uurimisel tuvastati, et asoolide tundlikkus on aastati erinev. Epoksikonasooli tundlikkus on aastatel 2014-2018 järk-järgult vähenenud nii Põhja- kui ka Balti riikides, keskmised EC50 väärtused on tõusnud 0,07 ppm-lt 2,19 ppm-ni (Heick *et al.* 2017; Mäe *et al.* 2020). Eestis täheldati epoksikonasooli tundlikkuse langust kuni 2019. aastani (keskmine EC50=2,95), kuid 2020. aastal tundlikkus suurenes oluliselt (EC50=0,58 ppm). Võrreldes 2019. aastaga oli 2020. aastal vaid vähestel isolaatidel EC50 väärtus suurem kui 2 ppm. Erinevalt epoksikonasoolist vähenes protiokonasool-destio tundlikkus 2020. aastal võrreldes 2018. ja 2019. aastatega (Mäe *et al.* 2020). Sarnast suundumust epoksikonasooli ja protiokonasool-destio tundlikkuse vahel märgati ka Taanis ja Rootsis aastatel 2012-2019. See võib viidata sellele, et ensüüm CYP51 ei muteeru enam ja sel puudub võimalus välja arendada täiendav resistentsus epoksikonasooli ja protiokonasooli suhtes (Heick *et al.* 2020). PÜ Kevili andmetel tehakse Eestis talinisule kasvuperioodil 2-4 korda haigustõrjet kõige rohkem asooli sisaldavate preparaatidega (M.Värnik, avaldamata andmed). Kevili tootjad kasutavad peamiselt erinevate fungitsiidirühma kuuluvate toimeainetega segupreparaate. Kuna epoksikonasooli kasutusluba lõpeb Eestis 2021. aasta lõpuga, siis populaarseid preparaate nagu Viverda (BASF) ja Tango Super (BASF) enam kasutada ei saa (Põllumajandus- ja toiduamet 2021). Protiokonasooli esindavatest preparaatidest olid levinud 2019. aastal Kevili tootjate poolt Curbatur (Bayer), Input (Bayer) ja Prosaro (Bayer), mis peaksid analüüsitud *Z. tritici* proovide põhjal veel efektiivsed olema kõrreliste helelaiksuse tõrjel.

Mefentriflukonasooli tundlikkust on jälgitud Eesti *Z. tritici* populatsiooni suhtes alates 2019. aastast. Toimeainet võiks soovitada kõrreliste helelaiksuse tõrjeks, kuna selle efektiivsus püsis *Z. tritici* populatsioonis kõrge (2019. aastal EC50=0,29 ppm; 2020. aastal EC=0,12 ppm), kuid

esines nii suurema kui väiksema tundlikkusega isolaate. 2020. aastal tuli Eestis müügile esimene toimeainena mefentriflukonasooli sisaldav preparaat (Revytrex, BASF), mida ka PÜ Kevili tootjad on soetanud kõrreliste helelaiksuse tõrjeks (M. Värnik, avaldamata andmed). Taanis läbi viidud uuringud mefentriflukonasooli toimeaine kasutamisel on näidanud kõrget efektiivsust (86-94 %) haigustõrjel põllukatsetes (Heick *et al.* 2020).

Probleem tekib siis kui patogeenil tekib ristresistentsus, ehk resistentsus mitme fungitsiidi suhtes samaaegselt (Brent ja Hollomon 2007). See võib olla seotud konkreetsete geenmutatsioonidega, näiteks vähenenud tundlikkus mitmete asoolide suhtes on seotud mutatsioonidega D134G, V136A/C, A379G, I381V ja S524T *CYP51* geenis (Jørgensen *et al.* 2020; Heick *et al.* 2020). Töös leiti, et tebukonasooli ja mefentriflukonasooli tundlikkuse vahel on Eesti *Z. tritici* populatsioonis tugev positiivne seos, mis ei ole kasulik kõrreliste helelaiksuse edasisel tõrjel. Sama tulemust kinnitas ka Heick *et al.* 2020 Taani *Z. tritici* populatsiooni analüüsid, mis näitas väga tugevat ristresistentsust mefentriflukonasooli, difenokonasooli ja tebukonasooli vahel. Kuid madala tebukonasooli tundlikkusega isolaadid võivad olla väga erineva tundlikkusega mefentriflukonasooli suhtes (Heick *et al.* 2020). Uuringud on näidanud, et varasemate aastate jooksul tebukonasooli efektiivsus haigustõrjel järjest langes, kuna seda toimeainet kasutati palju (Jørgensen *et al.* 2018; Jørgensen *et al.* 2020), kuid hiljaaegu leiti Põhja-Euroopas, et tebukonasooli tundlikkus on hakanud uuesti suurenema *Z. tritici* populatsioonis (Heick *et al.* 2020). Tebukonasooli kasutamine üksikpreparaadina ei ole majanduslikult mõistlik, kuna analüüsid näitasid Eestis 2019. aastal väga kõrget resistentsust, mistõttu on otstarbekas seda toimeainet kasutada kombinatsioonis teistega. Põllumajandustootjate poolt levinud Zantara (Bayer) on juba segatud SDHI toimeainega biksafeen, mis tõstab preparaadi efektiivsust. Kasutusel olev Orius 250 EW (ADAMA) on aga üksikpreparaat ja vajab kindlasti segamist teise fungitsiidirühma preparaadiga, et saavutada soovitud tulemust. Siiski kõrreliste helelaiksuse tõrjes näitab mefentriflukonasool suuremat efektiivsust kui tebukonasool oma spetsiifiliste molekulaarsete omaduste tõttu (Heick *et al.* 2020).

Põhjuseid võib olla mitmeid, miks asoolide suhtes tundlikkus ei vähene enam nii kiiresti kui varasemalt. Esmalt võib põhjus olla selles, et *CYP51* geen ei muteeru enam, samas ka kõige vähem tundlike mutatsioonide kombinatsioonide kohastumisvõime ja püsimine populatsioonis on madalad, mida võivad mõjutada ilmastikutingimused, peremeestaimede sordiomadused ja fungitsiidide kasutamine. Uuringud on näidanud, et *CYP51* geenis üksiknukleotiidsest muutusest põhjustatud polümorfismid (SNPs) on olulised asooliresistentsuse tekkeks. Kuid

peab arvestama, et mitte kõik muutused geenis ei ole võrdselt olulised. (Cools ja Fraaije 2012; Cools *et al.* 2011; Leroux ja Walker 2010).

*CYP51* geenis esinevad mutatsioonid võivad esineda üksi või mitmekaupa ning seeläbi mõjutada patogeeni tundlikkust fungitsiidide suhtes (Cools *et al.* 2011). Eesti *Z. tritici* populatsioonis olid *CYP51* geenis aastatel 2019–2020 kõige olulisemad mutatsioonid D134G, V136A, V136C, A379G, I381V ja S524T. Neid kõiki on avastatud ka resistentsetes isolaatides (Cools ja Fraaije 2012), mistõttu on oluline just neid mutatsioone uurida. Kõige levinum mutatsioon on I381V, kuigi selle sagedus langes 100 %-lt 2019. aastal 88 %-ni 2020. aastal. Mutatsioon A379G, mis esineb kombinatsioonis mutatsiooniga I381V, esines 20 % isolaatidel. Kogu Euroopas on I381V puhul tegu laialtlevinud mutatsiooniga *Z. tritici* populatsioonides (Jørgensen *et al.* 2018; Heick *et al.* 2017), mida on seostatud tebukonasooli efektiivsuse langusega (Fraaije *et al.* 2007). Kõrge resistentsusega isolaatidel on mutatsioon I381V kombinatsioonis alati paaris deletsiooniga Y459/G460 või punktmutatsioonidega aminohapete positsioonidel 459 või 461 (Leroux *et al.* 2007). Kombinatsioon A379G ja I381V on Euroopas enim levinud *CYP51* geeni mutatsioonide kombinatsioon (Stammler ja Semar 2011).

Eesti *Z. tritici* populatsioonis toimus V136A mutatsiooni sageduse vähenemine 45 %-lt 30 %-ni, millel on seos leitud epoksikonasooli, protiokonasooli ja teiste asoolide tundlikkuse langusega ning mis on tõstnud tebukonasooli ja difenokonasooli tundlikkust (Leroux ja Walker 2011). Tõrjel asoolide segamisel SDHI-dega vähenes mutatsioonide V136A ja V136C esinemine (Wieczorek *et al.* 2015). Mutatsioonide D134G, V136C ja S524T esinemine tõusis Eesti populatsioonis eelmiste aastatega võrreldes (Mäe *et al.* 2020). D134G mutatsioon leiti esmakordselt 2008. aastal kombinatsioonis V136A ja I381V mutatsioonidega (Stammler *et al.* 2008). Kõige sagedamini Eestis esinevaid mutatsioonide kombinatsioone (D134G, V136A ja I381V; A379G ja I381V) leitakse ka teistes Euroopa riikides (Huf *et al.* 2018).

Mutatsioon S524T on üks hilisemalt tekkinud mutatsioone, mida Eesti *Z. tritici* populatsioonis esines veel vähe (8 % 2019. a, 24 % 2020. a). See mutatsioon kujutab suurt ohtu asoolide kasutamisele, kuna on näidatud tugevat seost asoolide tundlikkuse vähenemisele (Cools ja Fraaije 2012). Irimaal on tegu ühe levinuma mutatsiooniga, mis esineb teistega kombinatsioonis (S. Kildea, avaldamata andmed). Leiti, et kui isolaatidel vähenes tundlikkus mefentriflukonasooli suhtes, siis esines geenis *CYP51* mutatsioonide kombinatsioon A379G, I381V ja S524T, kuid sellise mutatsioonide kombinatsiooni ja mefentriflukonasooli tundlikkuse vähenemise seost pole varasemalt üheski teises uurimistöös leitud.

Erinevad molekulaarsed mehhanismid annavad resistentsuse SDHI klassi fungitsiidide suhtes, kõige sagedasemad on SDH valgu mutatsioonid (Scalliet *et al.* 2012). Aastatel 2012–2015 teatati mitmes Euroopa riigis viiest erinevast *Sdh* geenmutatsioonist, C-T79N, C-W80S, C-N86S, B-N225T ja B-T268I, mis põhjustasid vähest resistentsust SDHI rühma fungitsiidide suhtes (FRAC. Succinate Dehydrogenase... 2020). Irimaal oli laialdase C-T79N mutatsiooni levikuga vähenenud SDHI-de efektiivsus (S. Kildea, avaldamata andmed). Lisaks näitas seal mutatsiooni C-H152R esinemine kõrget resistentsust SDHI-de suhtes (Dooley *et al.* 2016). Eesti isolaatidel ei ole leitud *SdhC* alaühikus mutatsioone C-T79N ja C-H152R. 2018. aastal läbi viidud uuringus ei leitud Eesti *Z. tritici* populatsioonist mitte ühtegi *Sdh* geeni mutatsiooni (Mäe *et al.* 2020). 2019. ja 2020. aastal leiti Eesti populatsioonist mutatsioonide kombinatsioon C-N33T ja C-N34T, mis oli ka kõige levinum. Euroopas on leitud sama kombinatsiooni ning nende isolaatide tundlikkus on olnud SDHI-de suhtes peamiselt kõrge (Yamashita ja Fraaije 2017; Dooley *et al.* 2016). Eestis suurenes 2020. aastal C-N86S mutatsiooni levik ning üksikutes isolaatides leiti esmakordselt mutatsiooni B-N225I. Mutatsiooni C-N86S puhul ei lange SDHI-de tundlikkus niivõrd kui eelnevalt mainitud C-H152R puhul (Rehfus *et al.* 2018), kuid tegu on viimastel aastatel enim levinud mutatsiooniga Euroopas (Succinate Dehydrogenase... 2020). On teada, et mutatsioon B-N225I on vähe esinev ning seostatud tänaseni madala resistentsus faktoriga (Succinate Dehydrogenase... 2020). Võrreldes Põhjamaadega (Taani, Rootsi, Soome) on Balti riikides rohkem erinevate toimeainetega SDHI fungitsiidide müügil, mis annab eelise vahetada toimeained ja vältida resistentsuse teket (Heick 2019).

Strobiluriinid olid väga tõhusad 1990ndatel (Gisi *et al.* 2002), kuid juba 2000ndatel ilmnis *Z. tritici* populatsioonides resistentsus (Fraaije *et al.* 2005). Kõrge keskmise EC50 väärtusega isolaatidel on *CytB* geenis leitud mutatsioon G143A, mis annab resistentsuse strobiluriinide suhtes (Jørgensen 2008), teadaolevalt on neil ka kõrge ristresistentsuse tase erinevate strobiluriinide vahel (Gisi *et al.* 2002). Resistentne alleel on väga kiiresti Euroopas levinud ja selle osakaal muudkui tõuseb (Torriani *et al.* 2008; Cheval *et al.* 2017; Heick *et al.* 2017). Eesti *Z. tritici* populatsioonis tuvastati mutatsioon G143A esimest korda 2018. aastal (Mäe *et al.* 2020). Kuigi Eestis kasutatakse endiselt strobiluriine haigustõrjeks, siis G143A mutatsiooni esinemine on olnud küllaltki stabiilne - 2018. a 50 % (Mäe *et al.* 2020), 2019. a 44 % ja 2020. a 49 %. Aastate võrdluses varieerus G143A mutatsiooni esinemine vähe, kuid maakondade võrdluses näiteks Tartu maakonnas mutatsiooni ei esinenud, aga Lääne-Viru maakonnas oli mutatsiooniga isolaate koguni 86 %, mistõttu peab rohkem asukohapõhiselt lähenema

strobiluriinide tundlikkuse vähenemise ennetamisele. 2019. aastal kasutasid PÜ Kevili tootjad Eestis kõrreliste helelaiksuse tõrjeks vaid ühte preparaati Viverdat (BASF), milles oli strobiluriinide toimeaine püraklostrobiin segatud asooli ja SDHI toimeainega, kuid see läheb 2021. aastal müügist välja. Kuigi turul on ka strobiluriini toimeainega üksikpreparaate, siis ei soovitaks neid ainult üksinda tõrjes kasutada (Torriani *et al.* 2008).

Patogeen säilib nii taimejäänustel kui seemnetes, seega tasub haigustõrjele ja ennetusele olulist tähelepanu pöörata. Varasemalt on leitud, et hilisem külv tagab väiksema nakatumise (Gladders *et al.* 2005), kuna taime jõuab rünnata vähem *Z. tritici* eoseid. Vihmast ilma vältides püütakse aga pigem külvata varem ja seetõttu toimub juba sügisel haigustekitajaga nakatumine. Esmane nakatumine tuleneb peamiselt nisu taimejäänustest lendunud askosporidega, mida saab ära hoida piisava viljavaheldusega (Suffert *et al.* 2011). Nisu nisu järel kasvatamine jätab tahtmatult põllule nakkusallikaid taimejäänuste näol, sealt on askosporid valmis levima ka teistele lähedal asuvatele põldudele või jäävad ootama uut nisu külvi (Jørgensen *et al.* 2014). Minimeeritud harimise korral haiguste elutsükli ei katkestata, kündmine aga aitab viia taimejäänused mulda ja häirida sel viisil patogeenide tavapärasest säilimist. Patogeenil on lihtsam levida hõreda külvi puhul, kui taimed ei asetse liialt tihedasti (Bjerre *et al.* 2006). Kinnitumine on lehele aga hõlpsam laiuva kasvulaadi ja suurema lehepinna tõttu. Soodsa nakatumise loob ka varajane üleväetamine lämmastikuga (300 kg/ha) (Leitch ja Jenkins 1995; Wiik *et al.* 2009), mistõttu peab kinni pidama eelkõige lubatud väetamisajast ja -normist. Üleväetamine mitte ainult ei loo soodsat keskkonda haigustele, vaid on ka majanduslikult ebaotstarbekas.

Kuna haigustõrjel on märkimisväärne roll teravilja saagikusele ja kvaliteedile, siis tasub roteerida erinevate toimeainete ja -viisidega fungitsiide, et vähendada fungitsiidiresistentsuse ohtu *Z. tritici* populatsioonides (Dooley *et al.* 2015; Jørgensen *et al.* 2018; Heick *et al.* 2020). Efektiivsel tõrjel tuleb lähtuda piirkonna iseärasustest, Eestis saab kasutada selleks olemasoleva töö andmeid, kuid vajalik on uuringuid iga-aastaselt jätkata.

## KOKKUVÕTE

Asoolide intensiivne kasutamine põhjustab asooliresistentsuse arengut, mida näitab *CYP51* mutatsioonide laialdane levik *Z. tritici* Eesti populatsioonis. Mikroitiiterplaadialalüüs erinevate fungitsiiditoimeainete mõju hindamiseks näitasid epoksikonasooli, mefentriiflukonasooli tundlikkuse suurenemist ja protiokonasool-destio tundlikkuse vähenemist ning resistentsust tebukonasooli suhtes Eesti *Z. tritici* populatsioonis.

*Sdh* geeni mutatsioonidest on ulatuslikult levinud C-N33T ja C-N34T, märksa väiksem esinemine on mutatsioonidel C-N86S ja B-N225I.

G143A mutatsioon *CytB* geenis on levinud 44 % (2019. a) ja 49 % (2020. a) Eesti *Z. tritici* populatsiooni isolaatidel ning mutatsiooni esinemine erineb maakondade lõikes.

Helelaiksuse tõrjel tuleks fungitsiidide valikul lähtuda *Z. tritici* märklaudvalkude mutatsioonide levimusest nii Eestis üldiselt kui ka täpsemalt maakonniti. Ettevaatlik tuleks olla asoolide üksikpreparaatide kasutamisel, pigem vahetada kasutatavaid toimeaineid ja kasutada kombineeritult SDHI ja strobiluriinide rühma fungitsiididega. Ka vähese hulga resistentsete isolaatide puhul populatsioonis peaks tähelepanu pöörama, kuna asoolide pikaajaline või laialdane kasutamine võib populatsioonis suurendada asooliresistentsust. *Sdh* geenist leitud mutatsioonid ei ole näidanud märgatavat SDHI-de efektiivsuse langust, mistõttu on nende kasutamine tõrjeks põhjendatud. G143A mutatsiooni stabiilne esinemine *CytB* geenis võimaldab strobiluriinide kasutamist kõrreliste helelaiksuse tõrjeks, kuid seda kombinatsioonis teiste fungitsiidi rühmadega resistentsuse tekkeriski vähendamiseks.

Vajalik on uuringuid jätkata, et hinnata kõrreliste helelaiksuse tekitaja *Z. tritici* fungitsiidiresistentsuse arengut Eestis. Mida rohkem hõlmata erinevaid piirkondi, seda laialdasem teadmine saadakse tervikuna. Preparaatide ja toimeainete vahetumise tõttu on tarvis anda iga-aastaselt infot põllumajandustootjatele, kuidas need toimivad kõrreliste helelaiksuse tõrjel.



## KASUTATUD KIRJANDUS

Achieving sustainable cultivation of wheat. (2017). /Koost. P. Langridge. London: Burleigh Dodds Science Publishing. 686 lk.

Agriculture and Horticulture Development Board. Septoria tritici in winter wheat. [veebileht] <https://ahdb.org.uk/septoriatritici> (09.04.2021)

**Bearchell, S.J., Fraaije, B.A., Shaw, M.W., Fitt, B.D.** (2005). Wheat archive links long-term fungal pathogen population dynamics to air pollution — Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 102, pp. 5438-5442.

**Berraies, S., Gharbi, M.S., Rezgui, S., Yahyaoui, A.** (2014). Estimating grain yield losses caused by septoria leaf blotch on durum wheat in Tunisia — Chilean journal of Agricultural research. Vol. 74.

**Bjerre, K.D., Jørgensen, L.N., Olesen, J.E.** (2006). Site-Specific management of crop diseases — *Site-specific management of crop diseases: Principles and Applications*. No. 1, pp. 207-251.

**Brennan, C.J., Benbow, H.R., Mullins, E., Doohan, F.M.** (2019). A review of the known unknowns in the early stages of septoria tritici blotch disease of wheat — *Plant Pathology*. Vol. 68, pp. 1427-1438.

**Brent, K.J., Hollomon, D.W.** (2007). Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed? Brussels: Fungicide Resistance Action Committee. <https://www.frac.info/docs/default-source/publications/monographs/monograph-1.pdf> (31.03.2021)

**Brent, K.** (2012). Fungicide resistance in crop protection: risk and management. Wallingford: CABI.

**Brown, J.K.M., Chartrain, L., Lasserre-Zuber, P., Saintenac, C.** (2015). Genetics of resistance to *Zymoseptoria tritici* and applications to wheat breeding—*Fungal Genetic Biology*. Vol. 79, pp. 33–41.

**Cheval, P., Siah, A., Bomble, M., Popper, A.D., Reignault, P., Halama, P.** (2017). Evolution of QoI resistance of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in Northern France — Crop Protection. Vol. 92, pp. 131-133.

**Cools, H.J., Fraaije, B.A.** (2012). Update on mechanisms of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola* and implications for future control —*Pest Management Science*. Vol. 69, pp. 150-155.

**Cools, H.J., Mullins, J.G.L., Fraaije, B.A., Parker, J.E., Kelly, D.E., Lucas, J.A., Kelly, S.L.** (2011). Impact of Recently Emerged Sterol 14 $\alpha$ -Demethylase (CYP51) Variants of *Mycosphaerella graminicola* on Azole Fungicide Sensitivity —*Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 77, pp. 3830-3837.

**Curtis, B.C., Rajam, S., Macpherson, H.G.** (2002) Bread Wheat: Improvement and Production —*FAO Plant Production and Protection Series*. No. 30.

**Dean, R., Van Kan, J.A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K.E., Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G.D.** (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology —*Molecular Plant Pathology*. Vol. 13, pp. 414-430.

**Dooley, H., Shaw, M.W., Mhenni-Ciz, J., Spink, J., Kildea, S.** (2016). Detection of *Zymoseptoria tritici* SDHI-insensitive field isolates carrying the SdhC-H152R and SdhD-R47W substitutions —*Pest Management Science*. Vol.72, pp. 2203-2207.

**Dooley, H., Shaw, M.W., Spink, J., Kildea, S.** (2015). The effect of succinate dehydrogenase inhibitor/azole mixtures on selection of *Zymoseptoria tritici* isolates with reduced sensitivity —*Pest Management Science*. Vol. 72, pp. 1150-1159.

**Duba, A., Goriewa-Duba, K., Wachowska, U.** (2018). A Review of the Interactions between Wheat and Wheat Pathogens: *Zymoseptoria tritici*, *Fusarium spp.* and *Parastagonospora nodorum* — *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 19 (4), pp. 1138.

Eesti Põllumajandus-Kaubanduskoda. Teraviljainfo. [veebileht] <https://epkk.ee/teraviljainfo/> (13.05.2021)

**Figuroa, M., Hammond-Kosack, K.E., Solomon, P.S.** (2017). A review of wheat diseases— a field perspective —*Molecular Plant Pathology*. Vol. 16, pp. 1523-1536.

**Fones, H.N., Bebbler, D.P., Chaloner, T.M., Kay, W.T., Steinberg, G., Gurr, S.J.** (2020). Threats to global food security from emerging fungal and oomycete crop pathogens — *Nature Food*. Vol. 1, pp. 455-456.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT. [veebileht] <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (31.03.2021)

**Fraaije, B.A., Bayon, C., Atkins, S., Cools, H.J., Lucas, J.A., Fraaije, M.W.** (2012). Risk Assessment Studies on Succinate Dehydrogenase Inhibitors, the New Weapons in the Battle to Control Septoria Leaf Blotch in Wheat. — *Molecular Plant Pathology*. Vol. 13, pp. 263-275.

**Fraaije, B.A., Cools, H.J., Fountaine, J., Lovell, D.J., Motteram, J., West, J.S., Lucas, J. A.** (2005). Role of Ascospores in Further Spread of QoI-Resistant Cytochrome b Alleles (G143A) in Field Populations of *Mycosphaerella graminicola* — *Phytopathology*. Vol. 95, pp. 933-941.

**Fraaije, B.A., Cools, H.J., Kim, S.H., Motteram, J., Clark, W.S., Lucas, J.A.** (2007). A novel substitution I381V in the sterol 14 alpha-demethylase (CYP51) of *Mycosphaerella graminicola* is differentially selected by azole fungicides — *Molecular Plant Pathology*. Vol. 8, p. 245-254.

FRAC. Succinate Dehydrogenase Inhibitor (SDHI) Working Group. [veebileht] [https://www.frac.info/docs/default-source/working-groups/sdhi-fungicides/sdhi-meeting-minutes/minutes-of-the-2020-sdhi-meeting-jan-june-september-2020-with-recommendations-for-2020.pdf?sfvrsn=d7b8499a\\_2](https://www.frac.info/docs/default-source/working-groups/sdhi-fungicides/sdhi-meeting-minutes/minutes-of-the-2020-sdhi-meeting-jan-june-september-2020-with-recommendations-for-2020.pdf?sfvrsn=d7b8499a_2) (06.05.2021)

FRAC. SDHI Fungicides. Introduction and general information. [veebileht] <https://www.frac.info/frac-teams/working-groups/sdhi-fungicides/information> (25.03.2021)

FRAC. QoI Fungicides. Introduction and general information. [veebileht] <https://www.frac.info/frac-teams/working-groups/qol-fungicides> (25.03.2021)

**Georgopoulos, S.G., Skylakakis, G.** (1986). Genetic variability in the fungi and the problem of fungicide resistance — *Crop Protection* Vol. 5, pp. 299–305.

**Gisi, U., Sierotzki, H., Cook, A., McCaffery, A.** (2002). Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides — *Pest Management Science*. Vol. 58, pp. 859-867.

**Gladders, P., Paveley, N.D., Barrie, I.A., Hardwick, N.V., Hims, M.J., Langton, S., Taylor, M.C.** (2005). Agronomic and meteorological factors affecting the severity of leaf blotch caused by *Mycosphaerella graminicola* in commercial wheat crops in England — *Annals of Applied Biology*. Vol. 138, pp. 301-311.

Global food supply and demand. (2019). Euroopa Liit: Agriculture and Rural Development. [https://ec.europa.eu/info/sites/default/files/food-farming-fisheries/farming/documents/market-brief-food-challenges-sep2019\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/info/sites/default/files/food-farming-fisheries/farming/documents/market-brief-food-challenges-sep2019_en.pdf)

**Goedhart, J.** (2020). SuperPlotsOfData – a web app for the transparent display and quantitative comparison of continuous data from discrete conditions. [arvutitarkvara]

**Goodwin, S. B., M'barek, S.B., Dhillon, B., Wittenberg, A.H.J., Crane, C.F., Hane, J.K., Foster, A.J., Van der Lee, T.A.J., Grimwood, J., Aerts, A., Antoniw, J., Bailey, A., Bluhm, B.,**

**Bowler, J., Bristow, J., van der Burgt, A. jt.** (2011). Finished Genome of the Fungal Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola* Reveals Dispensome Structure, Chromosome Plasticity, and Stealth Pathogenesis — *PLOS Genetics*. Vol 7.

Grains Research & Development Corporation. Wheat Northern Region – GrowNotes. [veebileht]  
<https://grdc.com.au/resources-and-publications/grownotes/crop-agronomy/northernwheatgownotes>

**Heick, T.M.** (2019). *Zymoseptoria tritici* – resistance in Scandinavia 2018. *NORBARAG meeting*. Malmö, 7.-8. märts.

**Heick, T.M., Justesen, A.F., Jørgensen, L.N.** (2017). Resistance of wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* to DMI and QoI fungicides in the Nordic-Baltic region - a stat — *European Journal of Plant Pathology*. Vol. 149, pp. 669-682.

**Heick, T.M., Matzen, N., Jørgensen, L.N.** (2020). Reduced field efficacy and sensitivity of demethylation inhibitors in the Danish and Swedish *Zymoseptoria tritici* populations — *European Journal of Plant Pathology*. Vol. 157, pp. 625-636.

**Huf, A., Rehfus, A., Lorenz, K.H., Bryson, R., Voegelé, R.T., Stammler, G.** (2018). Proposal for a new nomenclature for CYP51 haplotypes in *Zymoseptoria tritici* and analysis of their distribution in Europe — *Plant Pathology*. Vol. 67, pp. 1706-1712.

**International Wheat Genome Sequencing Consortium, Appels, R., Eversole, K., Stein, N., Feuillet, C., Keller, B., Rogers, J., Pozniak, C.J., Choulet, F., Distelfeld, A., Poland, J., Ronen, G., Sharpe, A.G., Barad, O., Baruch, K., Keebel-Gagner, G., Mascher, M., Ben-Zvi, G., Josselin, A.-A., jt.** (2018). Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome — *Science*. Vol. 361.

**Jabran, K., Mahmood, K., Melander B., Bajwa, A. A., Kudsk, P.** (2017). Advances in Agronomy: Weed Dynamics and Management in Wheat. Vol. 145, pp. 97-166.

**Jørgensen, L.N.** (2008). Resistance situation with fungicides in cereals — *Zemdirbyste-Agriculture*. Vol. 95, pp. 373-378.

**Jørgensen, L.N., Hovmøller, M.S., Hansen, J.G., Lassen, P., Clark, B., Bayles, R., Rodemann, B., Flath, K., Jahn, M., Goral, T., Czembor, J., Cheyron, P., Maumene, C., De Pope, C., Ban, R., Nielsen, G.C., Berg, G.** (2014). IPM Strategies and Their Dilemmas Including an Introduction to [www.eurowheat.org](http://www.eurowheat.org) — *Journal of Integrative Agriculture*. Vol. 13, pp. 265-281.

**Jørgensen, L.N., Matzen, N., Heick, T.M., Havis, N., Holdgate, S., Clark, B., Blake, J., Glazek, M., Korbas, M., Danielewicz, M., Maumene, C., Rodemann, B., Weigand, S., Kildea, S., Bataille, C., Brauna-Morževska, Gulbis, K., Ban, R., Berg, G., Semaskine, R., Stammler, G.**

(2020). Decreasing Azole Sensitivity of *Z. Tritici* in Europe Contributes to Reduced and Varying Field Efficacy — *Journal of Plant Diseases and Protection*. Vol. 128, pp. 287-301.

**Jørgensen, L.N., Matzen, N., Hansen, J.G., Semaskiene, R., Korbas, M., Danielewicz, J., Glazek, M., Maumene, C., Rodemann, B., Weigand, S., Hess, M., Blake, J., Clark, B., Kildea, S., Batailles, C., Ban, R., Havis, N., Treikale, O. (2018).** Four azoles' profile in the control of Septoria, yellow rust and brown rust in wheat across Europe — *Crop Protection*. Vol. 105, pp. 16-27.

**Juurik, M., Kiiker, R., Põllumaa, L., Mäe, A. (2021).** Fungitsiidi resistentsus nisu helelaiksust põhjustava patogeeni *Zymoseptoria tritici* Eesti populatsioonis. — *Agronoomia 2021. /Koost. I. Tupits, Ü. Tamm, S. Tamm, A. Toe, E. Vanamb. Jõgeva. Eesti Taimekasvatuse Instituut, lk 158-164.*

**Kiiker, R., Juurik, M., Heick, T.M., Mäe, A. (2021).** Changes in DMI, SDHI, and QoI Fungicide Sensitivity in the Estonian *Zymoseptoria tritici* population between 2019 and 2020 — *Microorganism*. Vol. 814. No. 9.

**Kildea, S., Mehenni-Ciz, J., Spink, J., O'Sullivan, E. (2014).** Changes in the frequency of Irish *Mycosphaerella graminicola* CYP51 variants 2006-2011 — *Modern Fungicides and Antifungal Compounds*. Vol. 7, pp. 143-144.

**Koppel, R., Ingver, A. (2008).** A comparison of the yield and quality traits of winter and spring wheat — *WHEAT AGRONOMIJAS VĒSTIS (Latvian Journal of Agronomy)*. No. 11, pp. 83-89.

**Koppel, R., Ingver, A., Ardel, P., Kangor, T., Kennedy, H.J., Koppel, M. (2020).** The variability of yield and baking quality of wheat and suitability for export from Nordic–Baltic conditions — *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B – Soil & Plant Science*. Vol. 70, pp. 628-639.

**Koppel, R., Islamov, B., Raamets, R. (2021).** Uus talinisu sort 'Perenaise' — *Agronoomia 2021. / Koost. I. Tupits, Ü. Tamm, S. Tamm, A. Toe, E. Vanamb. Jõgeva. Eesti Taimekasvatuse Instituut, lk 74-80.*

**Kristoffersen, R., Jørgensen, L.N., Eriksen, L.B., Nielsen, G.C., Kiær, L.P. (2020).** Control of Septoria tritici blotch by winter wheat cultivar mixtures: Meta-analysis of 19 years of cultivar trials — *Field Crops Research*. Vol. 249.

**Leadbeater, A.J. (2014).** Plant Health Management: Fungicides and Antibiotics — *Food Science*. Pp. 408-424.

**Leitch, M.H., Jenkins, P.D. (1995).** Influence of nitrogen on the development of Septoria epidemics in winter wheat – *Journal of Agricultural Sciences*. Vol. 124, pp. 361-368.

**Leroux, P., Albertini, C., Gautier, A., Gredt, M., Walker, A.-S.** (2007). Mutations in the CYP51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 $\alpha$ -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola* — *Pest Management Science*. Vol. 63, pp. 688-698.

**Leroux, P., Walker, A.-S.** (2010). Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14 $\alpha$ -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola* — *Pest Management Science*. Vol. 67, pp. 44-59.

**Li, J.-L., Liu, X.-Y., Xie, J.-T., Di, Y.-L., Zhu, F.-X.** (2015). A Comparison of Different Estimation Methods for Fungicide EC<sub>50</sub> and EC<sub>95</sub> Values — *Journal of Phytopathology*. Vol. 163, pp. 238-244.

**Lucas, J. A.** (2020). *Plant Pathology and Plant Pathogens*. Wiley-Blackwell. 432 lk.

**Lucas, J.A., Hawkins, N.J., Fraaije, B.A.** (2015). Chapter Two – The Evolution Of Fungicide Resistance — *Advances in Applied Microbiology*. Vol. 90, pp. 29-92.

Maaeluministeerium. Eesmärgid, tegevused. Ülevaated. [veebileht]  
<https://www.agri.ee/et/eesmargid-tegevused/pollumajandus-ja-toiduturg/ulevaated> (29.04.2021)

Maintaining the effectiveness of DMI fungicides in cereal disease control strategies. (2002). Belfast: The Queen's University of Belfast.  
<https://projectblue.blob.core.windows.net/media/Default/Research%20Papers/Cereals%20and%20Oils/eed/pr275.pdf> (06.05.2021)

**Marichal, P., Koymans, L., Willemsens, S., Bellens, D., Verhasselt, P., Luyten, W., Borgers, M., Ramaekers, F.C.S., Odds, F.C., Bossche, H.V.** (1999). Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 $\alpha$ -demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans* — *Microbiology*. Vol. 145, pp. 2701-2713.

**McGrath, M.T.** (2004). What are Fungicides — *The Plant Health Instructor*.

**Mäe, A., Fillinger, S., Sooväli, P., Heick, T.M.** (2020). Fungicide Sensitivity Shifting of *Zymoseptoria tritici* in the Finnish-Baltic Region and a Novel Insertion in the MFS1 Promoter — *Plant Science*. Vol. 1, pp. 1-10.

**Orton, E.S., Deller, S., Brown, J.K.M.** (2011). *Mycosphaerella graminicola*: from genomics to disease control — *Molecular Plant Pathology*. Vol. 12, pp. 413-424.

**Pandey, M., Shetha, J., Subedi, S., Shah, K.** (2020). Role of Nutrients in Wheat: A Review — *Tropical Agrobiodiversity*. Vol. 1, pp. 18-23.

**Ponomarenko, A., Goodwin, S.B., Kema, G.H.J.** (2011). Septoria tritici blotch (STB) of wheat — *Plant Health Instructor*.

Põllumajandus- ja toiduamet. Taimekaitse. Taimekaitsevahendite register. [veebileht] <https://portaal.agri.ee/avalik/#/taimekaitse/taimekaitsevahendid-otsing/et> (20.05.2021)

**Rehfus, A., Strobel, D., Bryson, R., Stammler, G.** (2018). Mutations in *sdh* Genes in Field Isolates of *Zymoseptoria Tritici* and Impact on the Sensitivity to Various Succinate Dehydrogenase Inhibitors —*Plant Pathology*. Vol. 67, pp. 175-180.

**Roy, R.N., Finck, A., Blair, G.J., Tandon, H.L.S.** (2006). Plant nutrition for food security: A guide for integrated nutrient management. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 349 lk.

**Rudd, J. J.** (2015). Previous bottlenecks and future solutions to dissecting the *Zymoseptoria tritici*–wheat host-pathogen interaction —*Fungal Genetics and Biology*. Vol. 79, pp. 24-28.

**Scalliet, G., Bowler, J., Luksch, T., Kirchhofer-Allan, L., Stenhauer, D., Ward, K., Nikalus, M., Verras, A., Csukai, M., Daina, A., Fonne-Pfister, R.** (2012). Mutagenesis and Functional Studies with Succinate Dehydrogenase Inhibitors in the Wheat Pathogen *Mycosphaerella graminicola* —*Plos ONE*. Vol. 7.

**Shewry, P.R.** (2009). Darwin review: Wheat. —*Journal of Experimental Botany*. Vol. 60, No. 6, pp. 1537-1553.

**Sooväli, P., Kann, L.** (2018). Põllukultuuride kahjustajad ja nende tõrje. Jõgeva: Trükikoda Paar. 55 lk.

**Stammler, G., Carstensen, M., Koch, A., Semar, M., Strobel, D., Schlehner, S.** (2008). Frequency of different CYP51-haplotypes of *Mycosphaerella graminicola* and their impact on epoxiconazole-sensitivity and -field efficacy —*Crop Protection*. Vol. 27, pp. 1448-1456.

**Stammler, G., Semar, M.** (2011). Sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* (anamorph: *Septoria tritici*) to DMI fungicides across Europe and impact on field performance —*Bulletin OEPP*. Vol. 41, pp. 149-155.

**Suffert, F., Sache, I., Lannou, C.** (2011). Early stages of septoria tritici blotch epidemics of winter wheat: build-up, overseasoning, and release of primary inoculum —*Plant Pathology*. Vol. 60, pp. 166-177.

**Torriani, S.F.F., Brunner, P.C., McDonald, B.A., Sierotzki.** (2008). QoI resistance emerged independently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella graminicola* —*Pest Management Science*. Vol. 65, pp. 155-162.

**Torriani, S.F.F., Melichar, J.P.E., Mills, C., Pain, N., Sierotzki, H., Courbot, M.** (2015). *Zymoseptoria tritici*: A major threat to wheat production, integrated approaches to control — *Fungal Genetics and Biology*. Vol. 79, pp. 8-12.

**Tronsmo, A.M., Collinge, D.B., Djurle, A., Munk, L., Yuen, J., Tronsmo, A.** (2020). *Plant Pathology and Plant Diseases*. CABI. 400 lk.

**Vagndorf, N., Heick, T.M., Justesen, A.F., Andersen, J.R., Jahoor, A., Jørgensen, L.N., Orabi, J.** (2018). Population structure and frequency differences of CYP51 mutations in *Zymoseptoria tritici* populations in the Nordic and Baltic regions — *European Journal of Plant Pathology*. Vol. 152, pp. 327–341.

**Vidal, T., Boixel, A.L., Durand, B., de Vallavieille-Pope, C., Huber, L., Saint-Jean, S.** (2017). Reduction of fungal disease spread in cultivar mixtures: Impact of canopy architecture on rain-splash dispersal and on crop microclimate — *Agricultural and Forest Meteorology*. Vol. 246, pp. 154-161.

**Zhang, Y.J., Zhang, S., Liu, X.Z., Wen, H.A., Wang, M.** (2010). A simple method of genomic DNA extraction suitable for analysis of bulk fungal strains — *Letters in Applied Microbiology*. Vol. 21, pp. 114-118.

**Wiik, L.** (2009). Control of fungal diseases in winter wheat. PhD thesis. Department of Plant Protection Biology. Alnarp. 108 pp.

**Wieczorek, T.M., Berg, G., Semaškienė, R., Mehl, A., Sierotzki, H., Stammler, G., Justen, A.F., Jørgensen, L.N.** (2015). Impact of DMI and SDHI fungicides on disease control and CYP51 mutations in populations of *Zymoseptoria tritici* from Northern Europe — *European Journal of Plant Pathology*. Vol. 143, pp. 1-11.

**Yamashita, M., Fraaije, B.** (2017). Non-target site SDHI resistance is present as standing genetic variation in field populations of *Zymoseptoria tritici* — *Pest Management Science*. Vol. 74, pp. 672-681.



## **LISAD**

**Lisa 1. CYP51 geenis esinevate mutatsioonide sagedused Eesti *Z. tritici* populatsioonis 2019-2020.**

Maakond	D134G (%)		V136A (%)		V136C (%)		A379G (%)		I381V (%)		S524T (%)	
	2019	2020	2019	2020	2019	2020	2019	2020	2019	2020	2019	2020
Lääne-Viru	12	33	33	24	22	19	33	33	100	95	20	24
Ida-Virumaa	NA*	5	NA	5	NA	0	NA	42	NA	100	NA	0
Jõgevamaa	0	38	0	38	0	25	31	8	100	92	0	33
Järvamaa	NA	60	NA	55	NA	0	NA	10	NA	90	NA	40
Viljandimaa	46	62	46	48	12	14	23	48	100	86	12	19
Valgamaa	67	40	67	33	0	0	6	0	100	100	0	33
Võrumaa	60	42	80	5	0	16	0	16	100	95	10	16
Põlvamaa	NA	29	NA	35	NA	0	NA	24	NA	100	NA	35
Tartumaa	NA	62	NA	19	NA	0	NA	10	NA	38	NA	14
<b>Keskmine</b>	<b>37</b>	<b>41</b>	<b>45</b>	<b>29</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>19</b>	<b>21</b>	<b>100</b>	<b>88</b>	<b>8</b>	<b>24</b>

Märkused:

1. roheline – 1-20 %.
2. kollane – 21-50 %.
3. punane – 51-100 %.
4. sinine – 0 %.
5. NA\* - väärtus puudub.

## Lisa 2. Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning juhendajate kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Mina, Marite Juurik,  
(sünnipäev 30/12/1996)

1. annan Eesti Maaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud lõputöö Kõrreliste helelaiksuse tekitaja *Zymoseptoria tritici* fungitsiidiresistentsus, mille juhendajateks on Evelin Loit, Riinu Kiiker ja Pille Sooväli,

- 1.1. salvestamiseks säilitamise eesmärgil,
  - 1.2. digiarhiivi DSpace lisamiseks ja
  - 1.3. veebikeskkonnas üldsusele kättesaadavaks tegemiseks
- kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Lõputöö autor \_\_\_\_\_  
allkiri

Tartu, 21.05.2021.

**Juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta**

Luban lõputöö kaitsmisele.

Evelin Loit

21.05.2021

---

(juhendaja nimi ja allkiri) (kuupäev)

Riinu Kiiker

21.05.2021

---

(juhendaja nimi ja allkiri) (kuupäev)

Pille Sooväli

21.05.2021

---

(juhendaja nimi ja allkiri) (kuupäev)