

Projekti „Fungitsiidiresistentsuse levik nisu helelaiksust ja odra ramularioosi põhjustavate haigustekitajate *Zymoseptoria tritici* ja *Ramularia collo-cygni* populatsioonides“ lõpparuanne:

Projektijuht...Andres Mäe.....
(ees- ja perekonnanimi)

Asutus:Eesti Taimkasvatuse Instituut
(programmis lubatud taotleja)

Projektijuhi kontaktandmed: tel. +372 671 1560, J. Aamisepa 1, 48309, Jõgeva vald, Eesti
andres.mae@etki.ee

(telefon, posti ja e-posti aadress)

Projektitulemuste lühikokkuvõte: Käesoleva projekti raames analüüsiti fungitsiidiresistentsuse levikut kahe fütopatogeense seene, *Ramularia collo-cygni* (*Rcc*) ja *Zymoseptoria tritici* (*Zt*) populatsioonides kolme aastase perioodi vältel, 2020 – 2022 a. Mainitud perioodi vältel säilitasid oma efektiivsuse kaks asooli rühma toimeainet, mefentriflukonasool ja protiokonasool, mis kuuluvad ka kõige enam kasutatavate preparaate koostisesse. SDHI rühma toimeainetest osutusid efektiivseteks fluksapüroksaad ja biksafeen. Mõlema rühma testitud toimeained osutusid efektiivseteks nii *Zt* kui ka *Rcc* tõrjes, kuid esines üksikuid isolaate, mis osutusid resistentseteks testitud toimeainete suhtes. Ajavahemikus 2020-2022 a. oli strobiluriinide resistentsusele viitava mutatsiooni G143A keskmine sagedus *Zt* populatsioonis üle 70%, *Rcc* populatsioonis üle 90 %.

Põldudel on soovituslik kasutada fungitsiide, kus on omavahel kombineeritud erinevate toimerühmade preparaate, et vältida populatsioonis üksikute kõrge resistentsusega *Zt* ja *Rcc* isolaatide paljunemist ja levimist. Strobiluriini rühma preparaate on soovitatav kindlasti kombineerida nii asooli kui ka SDHI rühma preparaatidega. Strobiluriini rühma preparaatidest on soovitatav eelistada püraklostroobiini sisaldavaid fungitsiide asoksüstroobiini sisaldavatele preparaatidele.

(tulemused, soovitusel, kuni 600 tähekohta)

Projektitulemuste lühikokkuvõte inglise keeles: The goal of this investigation was to survey the resistance of *Zymoseptoria tritici* and *Ramularia collo-cygni* Estonian populations towards DMI-, SDHI- and QoI- class fungicides during the 3 years period 2020 – 2022. During the test period, two single DMIs (prothioconazole and mefentrifluconazole) were tested. The efficiency of two most common SDHIs (bixafen and fluxapyroxad) was also tested during the same period. In 2020 we also tested boscalid but as the performance of this fungicide was inferior to fluxapyroxad, boscalid was replaced with bixafen starting from 2021. The mutation G143A is known to reduce the sensitivity to strobilurin class fungicides. Across Estonia the average frequency of G143A was over 80% in *Zt* and 90% in *Rcc* population.

Combinations of azoles and SDHIs, proved to be the most effective solution in control of both pathogens to avoid the spread of single isolates with high resistance in the population. While using strobilurins containing products it is recommended to use pyraclostrobin containing fungicides instead of azoxystrobin.

(tulemused, soovitusel, kuni 600 tähekohta)

Projekti eluviimiseks kasutatud töökohtade arv, tööülesannete kirjeldus ja jaotus uurimisgrupi liikmete vahel.

Andres Mäe, ETKI, taimekaitseosakond, vanemteadur. Fütopatogeensete seente monitooring, proovide kogumine. Saadud tulemuste analüüs ja aruande vormistamine.

Marite Juurik, ETKI, taimekaitseosakond, agronoom. Saadud tulemuste analüüs ja aruande vormistamine. Fütopatogeensete seente monitooring, proovide kogumine, puhaskultuuride isoleerimine. PCR ja KASP PCR analüüsid, sekveneerimisproovide ettevalmistamine.

Riinu Kiiker, ETKI, taimekaitseosakond, teadur. Puhaskultuuride isoleerimine, PCR analüüsid, isolaatide fungitsiidiresistentsuse testimine, tulemuste töötlemine ja analüüs. Mikroitiiterplaadi katsete tulemuste analüüs, EC50 arvutamine (kasutatakse GraphPad Prism Software programmi)

Liia Kann, Reet Budell, Regina Pütsepp ja Thea Blumberg osalesid monitooringul, proovide kogumisel ja esmasel ettevalmistusel puhaskultuuride ning DNA isoleerimiseks .

Projektis esitatud eesmärkide saavutamine (sh kasutatud metoodika):

Projekti eesmärgiks oli analüüsida *Zymoseptoria tritici* (Zt) ja *Ramularia collo-cygni* (Rcc) populatsioonides fungitsiidiresistentsust taimekaitses enam kasutatavate toimeainete suhtes. Kuna põhiliseks resistentsuse tekke põhjuseks on mutatsioonid, mis muudavad märklaudvalgu tundetuks toimeaine suhtes, siis:

1. analüüsisime resistentsust põhjustavate mutatsioonide olemasolu kolme kõige enam kasutatava fungitsiidi rühma märklaudvalkudes – CYP51 (asoolid), SdhC (SDHI inhibiitorid) ja Cytb (QoI).
2. analüüsisime ka insertioonide esinemist CYP51 ja MFS geenide promootorpiirkonnas, mis võivad suurendada patogeeni fungitsiidiresistentsust.
3. testisime mikroitiiterplaatidel patogeeni isolaatide tundlikkust asoolide (protiokonasooldestio ja mefentriflukonasool) ja suksinaatdehüdrogenaasi inhibiitorite (biksafeeni, boskaliidi ja fluksapüroksaadi) suhtes.

Proovide võtmine.

Joonistel 1 ja 2 on näidatud maakonnad ja põllud, kust koguti uuritavate taimehaigustega nakatunud lehed.

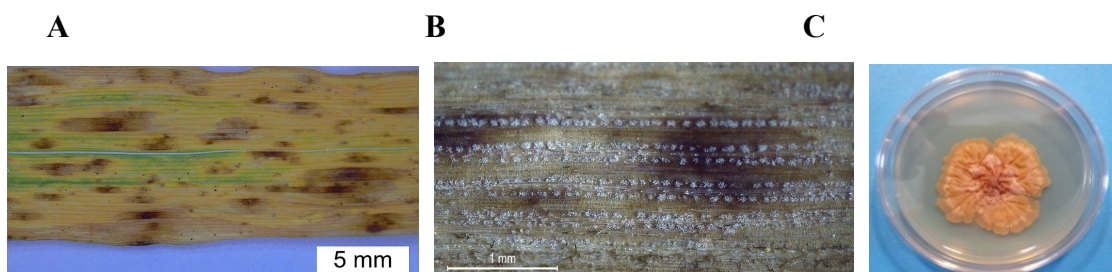


Joonis 1. 2020-2022 a. proovivõtu põllud, kust koguti *Rcc* nakatunud lehed. IV – Ida-Viru mk., JÕ – Jõgeva mk., JÄ – Järva mk., LV – Lääne-Viru mk., PÕ – Põlva mk., PÄ – Pärnu mk., TA – Tartu mk., VA – Valga mk., VI – Viljandi mk., VÕ – Võru mk

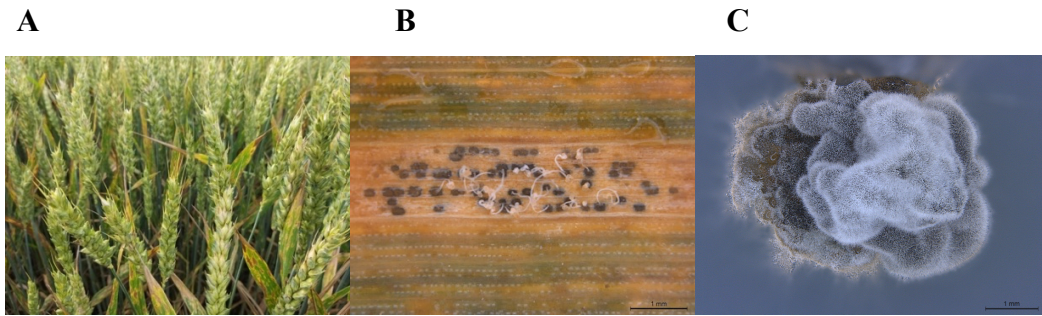


Joonis 2. 2020-2022 a. proovivõtu põllud, kust koguti *Z. tritici* nakatunud lehed. IV – Ida-Viru mk., JÕ – Jõgeva mk., JÄ – Järva mk., LV – Lääne-Viru mk., PÕ – Põlva mk., PÄ – Pärnu mk., TA – Tartu mk., VA – Valga mk., VI – Viljandi mk., VÕ – Võru mk.

Fütopatogeensete seente puhaskultuuride isoleerimiseks koguti nakatunud talinisu ja suviodra lehti, kus olid moodustunud konidiofoorid (joonis 3 ja 4).



Joonis 3. *Rcc* puhaskultuuri isoleerimine. **A.** *Rcc*-ga nakatunud odraleht, **B.** *Rcc* konidiofoorid, **C.** *Rcc* puhaskultuur PDA söötmel.



Joonis 4. *Z. tritici* puhaskultuuri isoleerimine. **A.** *Z. tritici* g nakatunud nisutaimed, **B.** *Z. tritici* „idanevad“ pükniidid, **C.** *Z. tritici* puhaskultuur PDA söötmel.

Kolme aasta jooksul isoleeriti kokku 600 *Zt* ja 184 *Rcc* puhaskultuuri (tabel 1 ja 2).

Tabel 1. 2020 - 2022 a. nakatunud nisu taimedelt isoleeritud *Z. tritici* puhaskultuurid.

2020		2021		2022	
Maakond	Testitud isolaatide arv	Maakond	Testitud isolaatide arv	Maakond	Testitud isolaatide arv
Ida-Viru mk	7	Ida-Viru mk	20	Ida-Viru mk	21
Järva mk	16	Järva mk	33	Järva mk	26
Jõgeva mk	15	Jõgeva mk	30	Jõgeva mk	30
Lääne-Viru mk	9	Lääne-Viru mk	29	Lääne-Viru mk	25
Põlva mk	8	Põlva mk	26	Pärnu mk	18
Tartu mk	15	Tartu mk	50	Põlva mk	24
Valga mk	10	Valga mk	20	Tartu mk	25
Viljandi mk	13	Viljandi mk	24	Valga mk	25
Võru mk	10	Võru mk	17	Viljandi mk	25
				Võru mk	29
Kokku	103	Kokku	249	Kokku	248

Tabel 2. 2020 - 2022 a. nakatunud odra taimedelt kogutud *Rcc* proovid.

2020		2021		2022	
Maakond	Testitud isolaatide arv	Maakond	Proovide arv	Maakond	Testitud isolaatide arv
Ida-Viru mk	7	Ida-Viru mk	4	Ida-Viru mk	3
Järva mk	8	Järva mk	9	Järva mk	5
Jõgeva mk	15	Jõgeva mk	6	Jõgeva mk	29
Lääne-Viru mk	7	Lääne-Viru mk	8	Lääne-Viru mk	5
Põlva	15	Põlva	1	Pärnu mk	12
Rapla mk	6	Tartu mk	4	Põlva mk	3
Tartu mk	20	Valga	2	Tartu mk	7
Viljandi mk	30	Viljandi mk	5	Viljandi mk	5
Võru mk	7	Võru mk	7		
				Kokku	69
Kokku	115	Kokku	46		

Erandina ei õnnestunud isoleerida *Rcc* puhaskultuure 2021 a., kuna tingituna ebasoodsatest ilmastikutingimustest patogeen ei jõudnud põldudel kasvufaasi, kus oleks toimunud konidiofooride moodustumine. Seega kasutati 2021. a *Rcc* proovidenäa patogeeniga nakatunud odralehti, millest eraldati toataalne DNA ja määrati *Rcc* hulk qPCR meetodikaga. Proovide

kogumine toimus igal aastal juulist kuni augustini. Proovide kogumiseks kasutati ETKI transporti ja proovivõtuvahendeid.

Laborianalüüsid.

Puhaskultuuride isoleerimine.

Ramularia collo-cygni. Igalt valitud suviodra põllult koguti 10 fütopatogeense seenega nakatunud lehte (joonis 3A). Nakatunud lehtede alumisel pinnal tekkivad iseloomulikud põõsakujujulised konidiofoorid (joonis 3B). Üksikud idanenud koniidid külvati steriilse nõelaga kartuldekstroos agarsöötmele (PDA/potato dextrose agar), kuhu oli lisatud 0,01% streptomütsiini. Petri tase inkubeeriti temperatuuril 17°C pimedas. Koniididest tekkisid üksikkolooniad 7–8 päeva pärast, millest 2 nädala möödumisel arenesid välja *Rcc* puhaskultuurid (joonis 3C). Puhaskultuure säilitati 0,25XPDB (potato dextrose broth) vedelsöötmes + 4° C juures.

Zymoseptoria tritici. Igalt valitud talinisu põllult koguti 10 fütopatogeense seenega nakatunud lehte (joonis 4A). Nakatunud lehed asetati petri tassi niisutatud filterpaberile ja jäeti toatemperatuurile 20° C juurde 24 tunniks idanema (joonis 4B). Seejärel külvati üksikud idanenud eosed steriilse nõelaga PDA söötmele, kuhu oli lisatud 0,01% streptomütsiini. Petri tase inkubeeriti temperatuuril 17–20°C. Pükniididest tekkisid üksikkolooniad (puhaskultuurid) 5–6 päeval, mis 2 nädala möödudes andis puhaskultuuri (joonis 4C). Puhaskultuure säilitati 20% glütseroolis -80°C juures.

DNA eraldamine fütopatogeensete seente isolaatides ja nakatunud lehtedest.

Igast PDA agarsöötmele kasvatatud *Zt* või *Rcc* isolaadist võeti DNA eraldamiseks 100mg seenemassi, mis homogeniseeriti ühtlaseks suspensiooniks mikrotsentrifuugituubis. DNA eraldamiseks kasutati termolüüsi (kuumutamine 85°C juures 30 minutit) (Zhang *et al.* 2010). Kontrollproovideks kasutati *Zt* tüve IPO323 ja *Rcc* tüve DK05 (genoomid ei sisalda fungitsiidiresistentsust põhjustavaid mutatsioone märklaudvalkudes). Alates 2022 a. kasutame DNA eraldamiseks DNA/RNA robotit QIAcube®-HTK (Qiagen, Düsseldorf, Germany).

Kuna 2021 a. *Rcc* konidiofoore moodustada ei suutnud, siis analüüsisime *Rcc* DNA hulka haigustunnustega odra taimede lehtedes. Selleks eraldasime nakatunud taimede lehtedest totaalse DNA (taime DNA + *Ramularia collo-cygni* DNA). DNA eraldamiseks võeti 100 mg nakatunud lehemassi, mis homogeniseeriti ühtlaseks suspensiooniks mikrotsentrifuugituubis. DNA eraldamiseks kasutasime kommertsiaalset komplekti Plant DNA Mini Kit (Qiagen, Düsseldorf, Germany) ja selle protokollit.

PCR analüüs mutatsioonide tuvastamiseks.

Asooli-resistentsust põhjustavate mutatsioonide tuvastamine märklaudvalgus CYP51 KASP-PCR iga (Zt) ja Sanger sekveneerimisel (Rcc).

Zt isolaatides analüüsiti *CYP51* geenimutatsioonide D134G, V136A/C, G379A, I381V ja S524T esinemist. *CYP51* amplifikatsiooniks kasutati primereid SepC51_D134G, SepC51_V136A, SepC51_V136C, SepC51_A379G SepC51_I381V ja SepC51_S524T. Mutatsioonide määramiseks kasutati konkureeriva alleeli spetsiifilise polümeraasi ahelreaktsiooni (KASP) genotüpiseerimismetoodikat, mis on kirjeldatud Kildea *et al.* 2014 poolt. Analüüsid viidi läbi Bio Rad CFX384 (Hercules, California 94547, USA) masinaga, tootja protokoll järgi. Tulemusi analüüsiti kasutades programmi CFX Maestro 2.0 Software for Windows PC (KASP-PCR metoodika rakendamine on ETKI-s võimalik alates 2021 a.).

Rcc isolaatides analüüsiti *CYP51* mutatsioonide I325T ja I328L esinemist. *CYP51* amplifikatsiooniks kasutati primereid KES2230 and KES2231 (Rehfus *et al.* 2019). Amplifikatsioon teostati termotsükleris Eppendorf Mastercycler nexus X2 (Eppendorf, Viin, Austria) järgmise programmi järgi: 95°C juures 5 minutit, 35 tsüklit 95°C 30 sekundit, 62°C juures 30 sekundit, 72°C juures 120 sekundit ja seejärel veel 5 minutit 72°C juures. Mutatsioonide tuvastamiseks saadud PCR produktid puhastati ja saadeti sekveneerimiseks Eesti Biokeskuse tuumiklaborisse. Sekveneerimisel saadud DNA nukleotiidseid järjestusi võrreldi BLASTN programmi abil andmebaasis olevate nukleotiidsete järjestustega (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

SDHI-resistentsust põhjustavad mutatsioonid märklaudvalgus SdhC ja SdhB.

Zt isolaatides analüüsiti mutatsioonide C-N33T, C-N34T, C-T79N, C-I29V ja C-H152R esinemist SdhC valgus ja N-225I ja T268I mutatsioonide esinemist SdhB valgus (Dooley *et al.* 2016; Dubous *et al.* 2013). *SdhC* amplifikatsiooniks kasutati KES 584 ja KES 550 (Rehfus *et al.* 2018) ning *SdhB* amplifikatsiooniks primereid Mgsdhbf1 ja Mgsdhbr1 (Fraaije *et al.* 2012). Amplifikatsioon teostati termotsükleris Eppendorf Mastercycler nexus X2 (Eppendorf, Viin, Austria) järgmise programmi järgi: 95°C juures 5 minutit, 35 tsüklit 95°C juures 60 sekundit, 62°C juures 30 sekundit, 72°C juures 90 sekundit ja seejärel veel täiendavalt 5 minutit 72°C juures.

Rcc isolaatides analüüsiti mutatsioonide olemasolu nii SdhB kui SdhC valgus. *SdhB* amplifikatsiooniks kasutati primereid SdhB_Rcc_Final_F and SdhB_Rcc_Final_R ning *SdhC* amplifikatsiooniks SdhC_Rcc_Final_F and SdhC_Rcc_Final_R (Piotrowska *et al.* 2017). Amplifikatsioon teostati termotsükleris Eppendorf Mastercycler nexus X2 (Eppendorf, Viin, Austria) järgmise programmi järgi: 95°C juures 5 minutit, 35 tsüklit 95°C 30 sekundit, 57°C

(SdhB) või 50° C (SdhC) juures 30 sekundit, 72° C juures 30 sekundit ja seejärel veel täiendavalt 5 minutit 72° C juures.

Mutatsioonide tuvastamiseks saadud PCR produktid puhastati ja saadeti sekveneerimiseks Eesti Biokeskuse tuumiklaborisse. Sekveneerimisel saadud DNA nukleotiidseid järjestusi võrreldi BLASTN programmi abil andmebaasis olevate nukleotiidsete järjestustega (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Strobiluriini-resistentsust põhjustavad mutatsioonid märklaudvalgus Cytb.

Zt isolaatides analüüsiti mutatsiooni G143A esinemist CytB valgus. Mutatsioon G143A annab püsiva 100% resistentsuse kogu selle rühma fungitsiidide suhtes (Fraaije *et al.* 2005). *CytB* geenmutatsiooni G143A määramiseks kasutati konkureeriva alleeli spetsiifilise polümeraasi ahelreaktsiooni (KASP) genotüpiseerimist, mis on kirjeldatud Kildea *et al.* 2014 poolt. KASP-PCR jaoks kasutati praimerit SepCytb_G143A. Analüüsid viidi läbi Bio Rad CFX384 (Hercules, California 94547, USA) masinaga, tootja protokoll järgi. Tulemusi analüüsiti kasutades programmi CFX Maestro 2.0 Software for Windows PC.

Rcc isolaatides analüüsiti CYP51 mutatsioonide F129L, G137R ja G143A esinemist. CYP51 amplifikatsiooniks kasutati primereid RCCcytobF ja RCCcytobR (Matusinsky *et al.* 2010). Amplifikatsioon teostati termotsükleris Eppendorf Mastercycler nexus X2 (Eppendorf, Viin, Austria) järgmise programmi järgi: 95° C juures 5 minutit, 35 tsükli 95° C 30 sekundit, 55° C juures 30 sekundit, 72° C juures 120 sekundit ja seejärel veel täiendavalt 5 minutit 72° C juures.

Mutatsioonide tuvastamiseks saadud PCR produktid puhastati ja saadeti sekveneerimiseks Eesti Biokeskuse tuumiklaborisse. Sekveneerimisel saadud DNA nukleotiidseid järjestusi võrreldi BLASTN programmi abil andmebaasis olevate nukleotiidsete järjestustega (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsioon (qPCR) *Rcc* DNA sisalduse määramiseks nakatunud suviõdra lehtedes.

qPCR teostati reaalaaja-PCR süsteemiga Bio Rad CFX384 (Hercules, California 94547, USA), kasutades CFX Maestro 2.0 Software for Windows PC tarkvara ja SYBR Green reagenti. qPCR standardite valmistamiseks kasutati *R. collo-cygni* DNA lahust kontsentratsiooniga 50 000 pg/μL, millest valmistati kalibratsioonistandard (0,64; 3; 16; 80; 400; 2000; 10 000 pg). Nakatunud odralehtede proovides *R. collo-cygni* DNA hulga kvantiteerimiseks kasutati qPCR meetodit, mis on kirjeldatud Taylor *et al.* 2010 poolt. Ainuke erinevus seal kirjeldatud meetodist seisnes selles, et reaktsioon viidi läbi mahus 10 μL 384

kannuga mikrotiiterplaadil. Kõigi analüüsitavate DNA proovide kontsentratsioon reaktsiooni kohta oli 10 ng/ μ L (matriits DNA). Amplifikatsioonireaktsioonid viidi läbi kogumahus 10 μ L, mis sisaldas 10 ng matriits DNA-d, 2 μ L 5X SYBR Green põhisegu, 0,4 μ L iga praimerit (20 pmol), 0,15 μ L probe ja 6,05 μ L steriilset H₂O. Reaktsioonitingimused koosnesid järgmistest etappidest: esmane denatureerimisetapp 10 minutit temperatuuril 95°C, millele järgneb 50 tsükli temperatuuril 95°C 20 s, 55°C 10 s ja 72°C 20 s. Kõiki standardilahjendusi ja proove amplifitseeriti kolmes korduses. Võimaliku DNA saastuse avastamiseks kasutati negatiivset kontrolli, mille qPCR segus olid olemas kõik komponendid peale märklaud DNA. Tulemusi analüüsiti kasutades programmi CFX Maestro 2.0 Software for Windows PC.

Zymoseptoria tritici ja Ramularia collo-cygni isolaatide fungitsiidiresistentsuse hindamine mikrotiiterplaadil.

Fungitsiidiresistentsuse hindamiseks kasutati Aarhuse Ülikooli Agroökoloogia (Taani) osakonnas välja töötatud meetodikat (Heick *et al.* 2017). Seda meetodikat kasutavad ka teised Põhja-Euroopa maad (Norra, Rootsi, Soome). Ühtse meetodika kasutamine võimaldab võrrelda omavahel erinevates maades saadud analüüside tulemusi ja hinnata resistentsuse levikut Põhjamaade regioonis.

Eraldatud *Zt* isolaate kasvatati 17°C juures PDA söötmel 5–7 päeva. Seejärel suspendeeriti iga katsesse võetud *Zt* isolaat 10 ml destilleeritud vees. Suspensioon lahjendati nii, et eoste arv iga isolaadi proovis oleks 2,5X10⁴ mL⁻¹. *Rcc* isolaate kasvatati 17°C juures 2XPDB vedelsöötmes 20 päeva. Kuna aga *Rcc* kunstlikult söötmel eoseid ei produtseeri, siis kasutati homogeniseeritud hüüfide suspensiooni. Ka siin lahjendati iga isolaadi hüüfide suspensiooni nii, et hüüfi tükide arv oleks 2,5X10³ mL⁻¹. Fungitsiidide lahjendused valmistati 2XPDB vedelsöötmes (*Zt*) või destilleeritud vees (*Rcc*). Lõppkontsentratsioonid olid (ppm): 6; 2; 0,670; 0,220; 0,074; 0,025; 0,008; 0, protiokonasool-destiol, püraklostrobiin ja asoksüstrobiin; 3; 1; 0,33; 0,11; 0,037; 0,012; 0,004; 0, mefentrifluokonasoolil ja fluksapüroksaadil; 10; 3,3; 1,1; 0,37; 0,12; 0,041; 0,014; 0, boskaliidil ja biksafeenil . 96 kannuga mikrotiiterplaadi igasse kannu pipeteeriti 100 μ L patogeeni suspensiooni ja 100 μ L vastava fungitsiidi lahjendust. Iga isolaat oli samal plaadil kahes korduses. Kontrollidena kasutati fungitsiidi tundlikke tüvesid *Zt* IPO323 ja *Rcc* DK05. Katse kuuendal (*Rcc*) või seitsmendal päeval (*Zt*) mõõdeti plaatide kannukestes proovide absoluutne optiline tihedus (OD, 620nm) Tecan Sunrise mikrotiiterplaadilugejaga (Tecan, Männedorf, Switzerland), kasutades Magellan tarkvara. Esitatud on kahe korduse keskmine tulemust, standardviga oli

kõikide tulemuste juures alla 10%. EC_{50} väärtuste arvutamisel kasutati programmi GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Statistiline andmetöötlus.

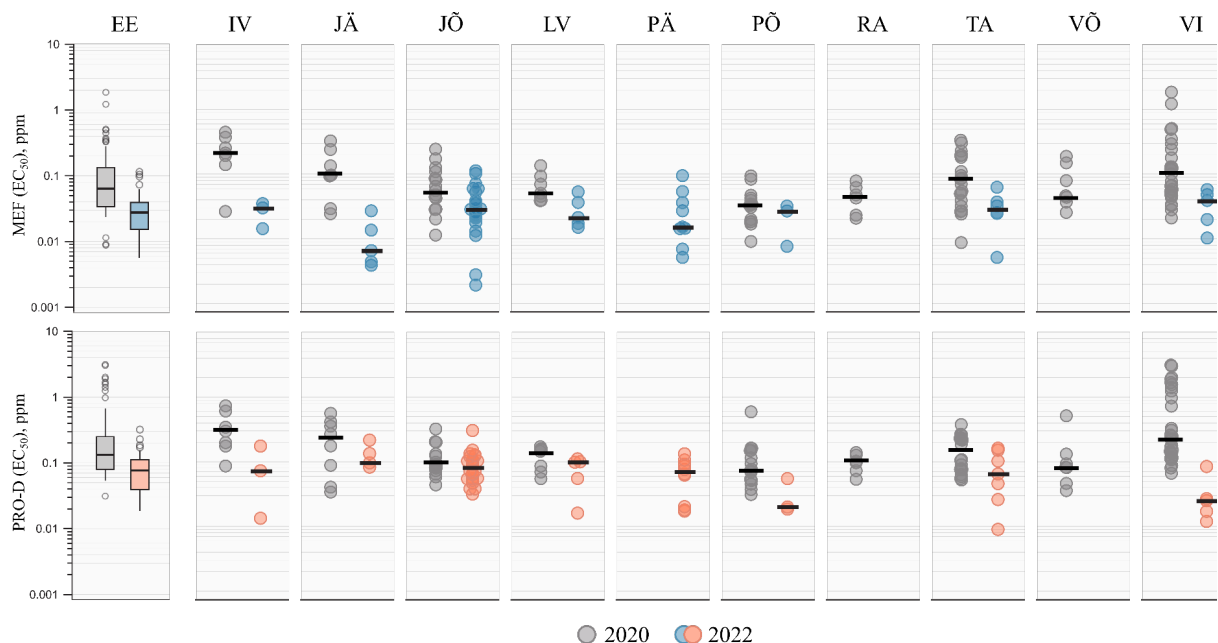
Statistilised analüüsid viidi läbi MS Office Excel 2020 ja GraphPad Prism 9.3.1. (GraphPad Software, La Jolla, CA, US) kasutades. Mikroitiiterplaadikatse analüüsimisel arvutati mittelineaarse regressiooni meetodil iga isolaadi kohta fungitsiidi EC_{50} väärtus, mis näitab fungitsiidi kontsentratsiooni, mis inhibeerib patogeeni kasvu 50% võrra. Tegemist on kõige sagedamini kasutatava parameetriga patogeeni tundlikkuse hindamiseks fungitsiidi suhtes (Li *et al.* 2015). EC_{50} väärtuste visualiseerimiseks kasutati andmetöötlustarkvara Igor Pro (WaveMetrics). Welchi t-testiga võrreldi eri aastate, Kruskal-Wallis testi ja Dunn'i post-hoc testiga eri aastate/maakondade keskmisi EC_{50} väärtuseid.

Uuringu tulemused

Fungitsiidiresistentsus *Ramularia collo-cygni* populatsioonis.

1.1. *Ramularia collo-cygni* populatsiooni resistentsus DMI rühma fungitsiidide suhtes.

DMI (asooli) rühma kuuluvatest toimeainetest analüüsisime erinevate *Rcc* isolaatide tundlikkust mefentriflukonasooli ja protiokonasool-destio suhtes. Nimetatud toimeained kuuluvad viimastel aastatel nii Eestis kui ka mujal Euroopas enimkasutatud preparaatide koostisesse. *Rcc* Eesti populatsiooni kahe aasta mefentriflukonasooli keskmised EC_{50} väärtused olid vastavalt 0,064 ppm 2020 a. ja 0,027 ppm 2022 a. Aastate vahel esinesid olulised erinevused ($t=4,638$; $df=116,0$; $p<0,001$) (joonis 5; tabel 3A).



Joonis 5. *Rcc* mefentriflukonasooli (MEF) ja protiokonasool-destio (PRO-D) EC_{50} (ppm) taseme varieeruvus maakondade lõikes. ●, ●, ● tähistab isolaati; – karpdiagrammil ja hajuvusdiagrammil olev joon tähistab mediaankeskmist EC_{50} väärtust. Maakondade lühendid nagu joonis 1.

Maakondades olid *Rcc* populatsioonide mefentriflukonasooli keskmised EC_{50} väärtused $< 0,5$ ppm. Üksikuid isolaate, kus mefentriflukonasooli $EC_{50}>0,5$ ppm isoleeriti ainult Viljandimaalt kogutud proovidest 2020 a. ($EC_{50}=1,8$ ppm). 2022 a. ei õnnestunud ühestki maakonnast saada *Rcc* isolaati, mille mefentriflukonasooli $EC_{50}>0,5$ ppm (joonis 5; tabel 3A).

Tabel 3. Mefentriflukonasooli (MEF) **A**, ja protiokonasool-destio (PRO-D) **B** EC₅₀ keskmised kontsentratsioonid (ppm) *Rcc* Eesti populatsioonis maakondade kaupa 2020. ja 2022 a. Esitatud on ka iga maakonna EC₅₀ minimaalne ja maksimaalne kontsentratsioon (ppm).

A

Toimeaine	Tunnus	2020	IV	JÕ	JÄ	LV	PÕ	RA	TA	VI	VÕ	PÄ
MEF	MEDIAAN	0,064	0,212	0,056	0,096	0,051	0,034	0,045	0,077	0,101	0,046	x
	MIN	0,009	0,027	0,011	0,024	0,039	0,009	0,021	0,009	0,021	0,026	
	MAX	1,854	0,446	0,244	0,328	0,136	0,094	0,079	0,335	1,854	0,189	
		2022	IV	JÕ	JÄ	LV	PÕ	RA	TA	VI	VÕ	PÄ
MEF	MEDIAAN	0,027	0,030	0,029	0,007	0,021	0,027	x	0,029	0,039	x	0,015
	MIN	0,002	0,014	0,002	0,004	0,015	0,008		0,01	0,01		0,005
	MAX	0,111	0,035	0,111	0,027	0,053	0,032		0,062	0,057		0,094

B

Toimeaine	Tunnus	2020	IV	JÕ	JÄ	LV	PÕ	RA	TA	VI	VÕ	PÄ	
PRO-D	MEDIAAN	0,133	0,299	0,091	0,223	0,146	0,076	0,099	0,147	0,227	0,082	x	
	MIN	0,031	0,086	0,044	0,034	0,055	0,031	0,054	0,052	0,066	0,036		
	MAX	3,138	0,733	0,322	0,563	0,171	0,592	0,139	0,377	3,138	0,515		
		Tunnus	2022	IV	JÕ	JÄ	LV	PÕ	RA	TA	VI	VÕ	PÄ
PRO-D	MEDIAAN	0,075	0,075	0,085	0,099	0,102	0,021	x	0,068	0,027	x	0,073	
	MIN	0,000	0,014	0,033	0,000	0,017	0,020		0,010	0,013		0,018	
	MAX	0,309	0,179	0,309	0,221	0,114	0,057		0,166	0,088		0,137	

Rcc isolaatide protiokonasool-destio keskmine EC₅₀ väärtus oli vastavalt 0,133 ppm 2020 a. ja 0,075 ppm 2022. a. Kui 2020 a. leiti üksikuid isolaate, kus protiokonasool-destio EC₅₀>0,5 ppm (0,515–3,138 ppm) Ida-Viru, Järva, Põlva, Viljandi ja Võru maakonnas, siis 2022. a jäid kõik EC₅₀ väärtused alla 0,5 ppm. Aastate vahel esinesid olulised erinevused ($t=5,325$; $df=114,02$ $p<0,001$).

Kokkuvõtteks saab öelda, et 2022 a. oli kogu Eesti *Rcc* populatsioon tundlik nii mefentriflukonasooli kui ka protiokonasool-destio suhtes, EC₅₀<0,5 ppm. Sellist tundlikkuse tõusu võis mõjutada eelnev 2021. a, mil keskkonnatingimused olid *Rcc* arengule ebasoodsad ja resistentsemad isolaadid ei olnud selleks kohastunud (toimus nn. pudelikalaefekt).

1.2. Mutatsioonide analüüs asoolide märklaudivalgus CYP51.

Rcc 2020 ja 2022 a. isolaatides analüüsiti mutatsioone CYP51 valgus positsioonides 381, 384 ja 459. *Rcc* populatsioonis, kus esineb kõrge sagedusega haplotüüp I381T, I384L ja S459C, on vähenenud tundlikus DMI rühma toimeainete suhtes (Assinger *et al.* 2021; Rehfus *et al.* 2019). Tabelis 4 on toodud CYP51 valgus esinevad mutatsioonid Eesti *Rcc* populatsioonis

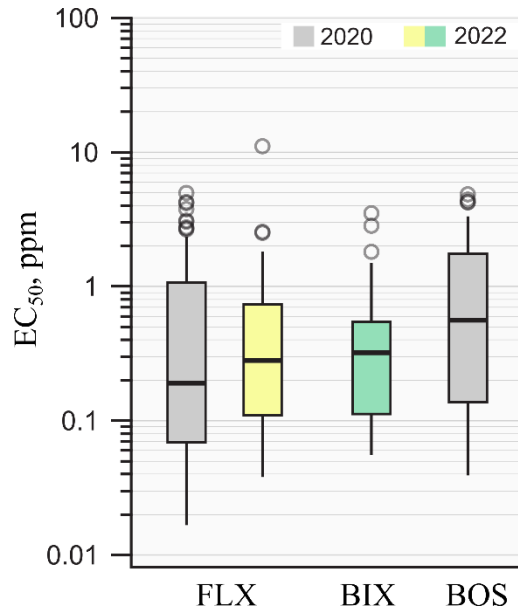
Tabel 4. Levinumate mutatsioonide sagedus (%) *CYP51* geenis Eesti *Rcc* populatsioonis 2020 ja 2022. a.

MAAKOND	I381T		I384T		S459C/Y		S459C		S459Y	
	2020	2022	2020	2022	2020	2022	2020	2022	2020	2022
IV	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0
JÕ	78	100	78	93	78	100	24	17	54	83
JÄ	100	100	100	100	100	100	37	80	63	40
LV	100	100	100	100	100	100	100	0	0	100
PÕ	100	100	100	100	100	100	86	0	14	100
PÄ		100		92		100		0		100
TA	70	100	70	100	70	100	70	0	0	100
RA	100		100		100		75		25	
VI	90	100	90	100	90	100	78	0	12	100
VÕ	100		100		100		100		0	
KESKMINE	93	100	93	98	93	100	74	25	19	78

Eesti populatsioonis esinevad nii mutatsioon 381T kui 459Y, lisaks esineb *Rcc* isolaatide genoomis ka mutatsioon 459C. Samas puudus meil mõlemal aastal isoleeritud mutantides mutatsioon 384L, selle asemel on Eesti populatsioonis 384T. Tabelist 4 esitatud andmetest on näha, et kõigi kolme mutatsiooni, 381T, 384T ja 459Y, sagedus on 2022 a. võrreldes 2020 a. suurenenud. Kuna Eesti *Rcc* populatsioonis ei ole siiani haplotüüpi 381T, 384L ja 459C, toimivad nii mefentriflukonasool kui protiokonasool-destio efektiivselt. 2020 a. isoleeritud üksikute isolaatide vähenenud tundlikus mefetriflukonasooli ja protiokonasool-destio suhtes ($EC_{50} > 0,5$ ppm) võis olla tingitud ka märklaudvalgu üleekspressioonist ja teistest biokeemilistest muutustest, mis muudavad isolaadi resistentsuks fungitsiidide suhtes. Sellised muutused genoomis vähendasid ilmselt kõrgeenenud resistentsusega mutantide elumust, kuna sellise fenotüübiga ($EC_{50} > 0,5$ ppm) *Rcc* mutante meil 2022 a. isoleerida ei õnnestunud.

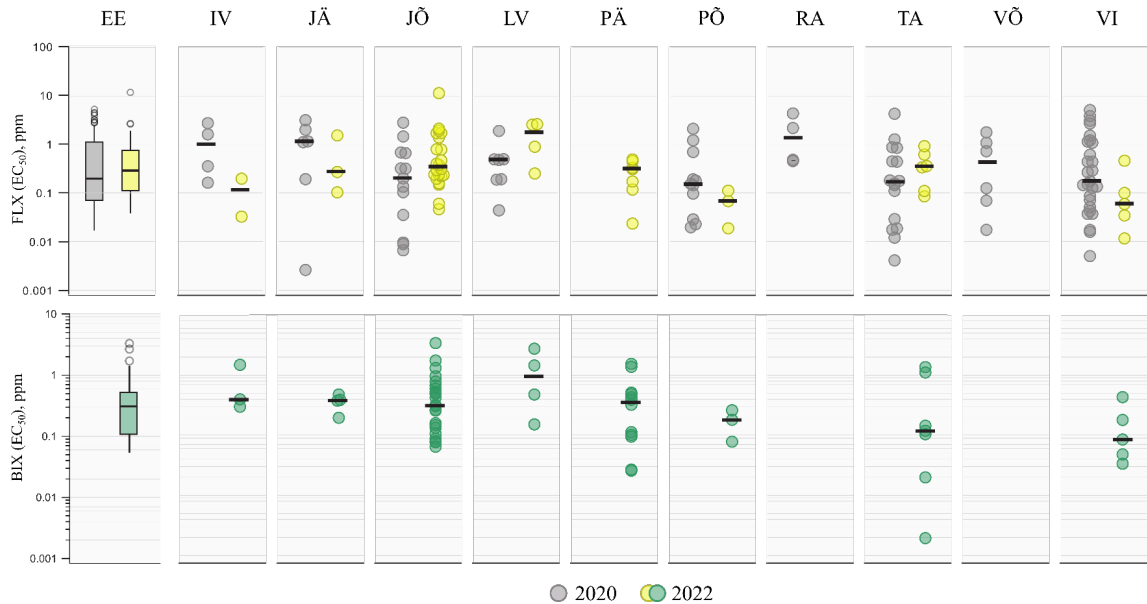
1.3. *Ramularia collo-cygni* populatsiooni resistentsus SDHI rühma fungitsiidide suhtes.

Kõikide 2020 a. *Rcc* isolaatides testiti tundlikkust boskaliidi ja fluksapüroksaadi suhtes, mis kuuluvad *Rcc* tõrjes kasutatavate preparaatide koostisesse. Boskaliidi sisaldavaid preparaate *Rcc* tõrjes praktiliselt enam ei kasutata (ka teistes Euroopa riikides), kuna selle toime on vähenenud ja Eesti *Rcc* populatsiooni boskaliidi keskmine oli $EC_{50} > 0,5$ ppm (joonis 6,) 2020 a. Alates 2022 a. hakkasime SDHI rühma toimeainetest testima fluksapüroksaadi ja biksafeeni.



Joonis 6. Fluksapüroksaadi (FLX), biksafeeni (BIX) ja boskaliidi (BOS) EC_{50} kontsentratsioonid (ppm) aastatel 2020 ja 2022 *Rcc* Eesti populatsioonis. Karpdiagrammil olev joon tähistab mediaankeskmist.

Rcc Eesti populatsioonide kahe aasta fluksapüroksaadi keskmised EC_{50} väärtused olid vastavalt 0,191 ppm 2020 a. ja 0,237 ppm 2022 a. Aastate vahel ei olnud statistiliselt olulisi erinevusi ($t=1,325$; $df=130,9$; $p<0,187$) (joonis 7; tabel 5A).



Joonis 7. *Ramularia collo-cygni* fluksapüroksaad (FLUX) 2020 ja 2022 a. ning biksafeeni (BIX) 2022 a. EC_{50} (ppm) taseme varieeruvus maakondade lõikes. ●, ●, ● tähistab isolaati; – karpdiagrammil ja hajuvusdiagrammil olev joon tähistab mediaankeskmist EC_{50} väärtust. Maakondade lühendid nagu joonis 1.

Maakondade lõikes varieerusid *Rcc* populatsioonide fluksapüroksaadi keskmised EC_{50} väärtused üsna suurtes piirides. Fluksapüroksaadi kriitiline EC_{50} kontsentratsioon on 0,5 ppm.

2020 a. isolaatide fluksapüroksaadi tundlikkuse analüüs maakondade lõikes näitas, et see ületas

Tabel 5. Fluksapüroksaadi (FLX) **A** ja biksafeeni (BIX) **B** keskmised EC_{50} kontsentratsioonid (ppm) *Rcc* Eesti populatsioonis maakondades 2020 - 2022 a. Esitatud on ka iga maakonna EC_{50} minimaalne ja maksimaalne kontsentratsioon (ppm).

A

Toimeaine	Tunnus	2020	IV	JÕ	JÄ	LV	PÕ	RA	TA	VI	VÕ	PÄ
FLX	MEDIAAN	0,19	0,97	0,20	1,11	0,47	0,15	1,31	0,17	0,17	0,42	x
	MIN	0,00	0,16	0,01	0,00	0,04	0,00	0,45	0,00	0,01	0,02	
	MAX	4,98	2,70	2,75	3,10	1,86	2,07	4,26	4,19	4,98	1,74	
	Tunnus	2022	IV	JÕ	JÄ	LV	PÕ	RA	TA	VI	VÕ	PÄ
FLX	MEDIAAN	0,282	0,114	0,341	0,269	1,694	0,068	x	0,345	0,059	x	0,305
	MIN	0,012	0,033	0,046	0,102	0,250	0,019		0,085	0,012		0,024
	MAX	2,559	0,195	1,080	1,509	2,559	0,111		0,908	0,456		0,482

B

	Tunnus	2022	IV	JÕ	JÄ	LV	PÕ	RA	TA	VI	VÕ	PÄ
BIX	MEDIAAN	0,321	0,416	0,333	0,403	1,007	0,193	x	0,127	0,091	x	0,376
	MIN	0,002	0,315	0,069	0,208	0,161	0,084		0,002	0,036		0,028
	MAX	3,520	1,541	3,520	0,501	2,838	0,276		1,416	0,454		1,595

kriitilise piiri Ida-Viru ($EC_{50}=0,969$ ppm), Järva ($EC_{50}=1,114$ ppm) ja Rapla maakonnas ($EC_{50}=1,311$ ppm). 2022 a. oli ainuke maakond, kus keskmine $EC_{50}>0,5$ ppm Lääne-Viru maakond ($EC_{50}=1,64$ ppm). Joonisel 7 on näha, et üksikuid isolaate, mille $EC_{50}>1,0$ ppm isoleeriti praktiliselt kõikidest maakondades mõlemal aastal (v. a. Ida-Viru, Põlva, Viljandi, ja Pärnu maakonnad 2022 a.).

2022 a. isoleeritud *Rcc* puhaskultuuride biksafeeni keskmine EC_{50} väärtus oli 0,321 ppm *Rcc* isolaatide biksafeeni resistentsuse analüüs maakondade lõikes näitas, et üheski maakonnas ei ületanud keskmine $EC_{50}>0,5$ ppm (joonis 7; tabel 5B). Üksikuid isolaate, mis ületasid kriitilise piiri ($EC_{50}>0,5$ ppm) leiti Ida-Viru ($EC_{50}=1,54$ ppm), Jõgeva ($EC_{50}=3,52$ ppm), Lääne-Viru ($EC_{50}=2,83$ ppm), Tartu ($EC_{50}=1,41$ ppm) ja Pärnu ($EC_{50}=1,59$ ppm) maakonnas (tabel 5B).

1.4. Mutatsioonide analüüs SDHI märklaudvalgus SdhC.

Rcc isolaatides analüüsiti mutatsioonide C-G91R, C-H146R/L, C-G171D, ja C-H153R esinemist SdhC valgus. 2020 a. analüüsi tulemused näitasid, et eespool mainitud mutatsioonidest leiti mutatsioon C-H146R, mille keskmine sagedus populatsioonis oli 55%. 2020 a. *Rcc* populatsioonis varieerus C-H146R maakonni 0% Lääne-Viru kuni 100% Põlva maakonnas (tabel 6). 2022 a. mutatsioone C-H146R ja C-V184L *Rcc* populatsiooni esinenud. 2020 a. tuvastasime SdhC valgus kolm uut mutatsiooni C-N164H, C-G167D ja C-V184L, millede keskmised sagedused jäid vahemikku 21–29% (tabel 6). 2022 a. isolaatides oli C-N164H keskmine sagedus tõusnud 43%, mutatsiooni C-G167D sagedus oli tõusnud 55% (tabel 6).

Tabel 6. Levinumate mutatsioonide sagedused (%) *SdhC* geenis Eesti *Rcc* populatsioonis 2020. ja 2022 a.

MAAKOND	H146R		N164H		G167D		V184L	
	2020	2022	2020	2022	2020	2022	2020	2022
IV	88	0	13	0	13	0	50	0
JÄ	50	0	21	20	21	100	21	0
JÕ	42	0	10	83	10	100	20	0
LV	0	0	100	100	100	100	0	0
PÄ		0		100		100		0
PÕ	100	0	0	0	0	0	0	0
RA	67		50		50		50	
TA	37	0	7	43	7	43	0	0
VI	50	0	50	0	50	0	50	0
VÕ	58		0		10		0	
KESKMINE	55	0	28	43	29	55	21	0

Mutatsioonide sageduste võrdlemisel torkab silma kahe mutatsiooni, H146R ja V184L kadumine *Rcc* populatsioonist 2022. aastal. Selle muutusega populatsioonis langes ka Eesti *Rcc* populatsiooni fluksapüroksaadi maksimaalse EC₅₀ tase, vastavalt 4,98 ppm (2020 a.) - 2,559 ppm (2022 a.) (tabel 5 A, B).

1.5. Mutatsioonide analüüs strobiluriinide märklauvalgus CytB.

Resistentsust QoI rühma toimeainete suhtes põhjustavad kolm mutatsiooni F129L, G137R ja G143A märklauvalgus CytB. 2020 a. ja 2022 a. esines Eesti *Rcc* populatsioonis ainult mutatsioon G143A. Mutatsioon G143A vähendab patogeeni tundlikkust kõigi selle rühma fungitsiidide suhtes. Mutatsiooni keskmine sagedus *Rcc* Eesti populatsioonis 2020 a. oli 88% ja see varieerus maakonniti 71-100%. 2022 a. oli mutatsioon olemas kõikide isolaatide genoomis. Seega oli selle mutatsiooni sagedus tõusnud Eesti *Rcc* populatsioonis 100%-ni (tabel 7).

Tabel 7. Mutatsiooni G143A sagedused (%) märklauvalgus CytB *Rcc* Eesti populatsioonis 2020 ja 2022 a.

MAAKOND	G143A	
	2020	2022
IV	85	100
JÕ	78	100
JÄ	100	100
LV	100	100
PÕ	78	100
PÄ		100
TA	95	100
RA	85	
VI	100	100
VÕ	71	
KESKMINE	88	100

1.6. *Rcc* esinemine nakatunud odralehtede proovides qPCR-i alusel.

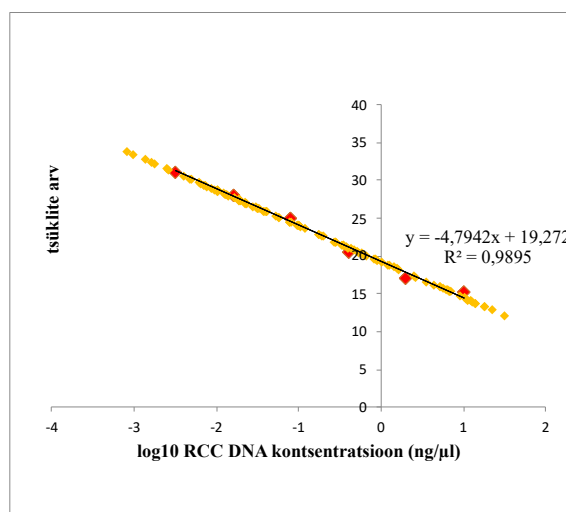
2021 a. kliimaatilised tingimused ei olnud optimaalsed *Rcc* arenguks ja levikuks. Nekrootiliste laikude vähesus ja *Rcc* iseloomulike konidiofooride puudumine kõigis maakondades, kust me proove kogusime, viitas sellele, et patogeeni normaalne areng oli häiritud. Seega otsustasime kogutud leheproovides analüüsida *Rcc* olemasolu (ebasobivate kliimatingimuste esinemisel võib patogeen kasvada taimes ka kui endofüüt ilma peremeestaime kahjustamata).

qPCR analüüs näitas, et kõikidest maakondadest tuvastati suviadra lehe proovidest *Rcc* DNA-d. Seega oli haigustekitaja levinud kõigis 9 maakonnas. Tabelis 8 on esitatud *Rcc* keskmine DNA hulk erinevate maakondade proovides, mis varieerus vahemikus 0,3 – 15,9 ng/μl.

Tabel 8. *Ramularia collo-cygni* DNA keskmised kontsentratsioonid (ng/μL) suviadra põldudel Eesti maakondades.

Maakond	Proovide arv	<i>Rcc</i> DNA keskm. Konts ng/μl
IV	4	2,63
JÄ	9	1,02
JÕ	6	0,3
LV	8	0,96
PÕ	1	15,95
TA	4	1,53
VA	2	4,3
VI	5	5,36
VÕ	7	2,21

Joonisel 8 on toodud kõigi isoleeritud proovide *Rcc* DNA kontsentratsioonid. Vaatamata DNA kontsentratsiooni varieerumisele suures vahemikus, ei esinenud konidiofoore isegi lehtedel, kus *R. collo-cygni* DNA kontsentratsioon oli > 5 ng/μl.



Joonis 8. *Ramularia collo-cygni* DNA kontsentratsioonid (ng/μL) qPCR reaktsioonitsükli arvu suhtes. ◆ – kindla kontsentratsiooniga *Rcc* DNA-standardid; ◆ – testitud leheproovid

See tulemus näitab selgelt, et *Rcc* säilib peremeestaimedes ka siis, kui patogeen ei jõua oma elutsüklis konidiofooride moodustamise staadiumisse. Seega sõltub patogeeni arengutsükli läbimine suuresti keskkonnatingimustest, eriti temperatuurist ja sademete hulgast. Kuid tuleb meeles pidada, et odra kasvatamine jätab tahtmatult põllule nakkusallikaid taimejäänuste näol (kus säilivad haigustekitaja hüüfid), mis jäävad ootama uut odra külvi. Seega aitab qPCR meetodika ennetavalt detekteerida haigustekitaja olemasolu taimedes enne visuaalsete sümptomite ilmnemist.

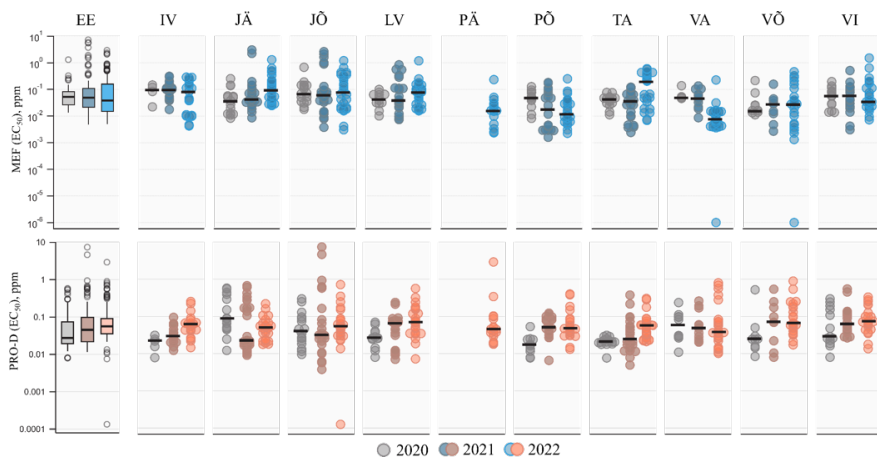
2. Fungitsiidiresistentsus *Zymoseptoria tritici* populatsioonis.

2.1. *Zymoseptoria tritici* populatsiooni resistentsus asooli rühma fungitsiidide suhtes.

Asooli rühma kuuluvatest toimeainetest analüüsisime erinevate *Zt* isolaatide tundlikkust mefentriflukonasooli ja protiokonasool-destio suhtes. Nimetatud toimeained kuuluvad viimastel aastatel nii Eestis kui ka mujal Euroopas enimkasutatud preparaaside koostisesse.

Zt Eesti populatsioonide kolme aasta (2020-2022 a.) mefentriflukonasooli keskmised EC_{50} väärtused varieerusid vahemikus 0,078-0,172 ppm. Aastate vahel statistiliselt olulist erinevust ei esinenud (Kruskal-Wallise statistik $H=0,732$; $p=0,693$) (joonis 9; tabel 9A). Maakondades olid *Zt* populatsiooni mefentriflukonasooli keskmised EC_{50} väärtused alla 0,5 ppm. Üksikuid isolaate, kus mefentriflukonasooli $EC_{50}>0,5$ ppm, isoleeriti Jõgeva, Järva, Lääne-Viru, Tartu, ja Viljandi maakonnast kogutud proovidest (tabel 9A).

Zt populatsiooni kolme aasta (2020-2022) protiokonasool-destio keskmised EC_{50} väärtused varieerusid vahemikus 0,067-0,155 ppm. Aastate vahel esinesid olulised erinevused (Kruskal-Wallise statistik $H=22,96$; $p<0,001$). Üksikuid isolaate, kus protiokonasool-destio $EC_{50}>0,5$ ppm (0,570-7,67 ppm) leiti Jõgeva, Järva, Lääne-Viru, Tartu ja Viljandi maakonnast kogutud proovidest (joonis 9; tabel 9B).



Joonis 9. *Zt* mefentriflukonasooli (MEF) ja protiokonasool-destio (PRO-D) EC_{50} (ppm) taseme varieeruvus maakondade lõikes 2020 – 2022 a. ●, ●, ● tähistab isolaati; – karpdiagrammil ja hajuvusdiagrammil olev joon tähistab EC_{50} mediaankeskmist väärtust. Maakondade lühendid nagu joonis 1.

Tablis 9 eitatud andmete põhjal on näha, et isolaadid, millede $EC_{50}>1,0$ ppm mõlema asooli rühma toimeaine suhtes, isoleeriti ainult Jõgeva maakonnast. Üksikuid isolaate millede $EC_{50}>1,0$ ppm ainult ühe toimeaine suhtes esines Järva, Lääne-Viru, Viljandi ja Pärnu maakonnas (joonis 10).

Tabel 9. Mefentriflukonasooli (MEF) A, ja protiokonasool-destio (PRO-D) B EC₅₀ keskmised kontsentratsioonid (ppm) *Z. tritici* Eesti populatsioonis maakondades 2020 - 2022 a. Esitatud on ka iga maakonna EC₅₀ minimaalne ja maksimaalne kontsentratsioon (ppm).

A.

Toimeaine	Tunnus	2020	IV	JÕ	JÄ	LV	PÕ	TA	VA	VI	VÕ	
MEF	KESKMINE	0,067	0,093	0,120	0,059	0,048	0,055	0,042	0,072	0,070	0,046	
	MIN	0,008	0,022	0,018	0,008	0,010	0,008	0,011	0,046	0,014	0,011	
	MAX	0,681	0,146	0,681	0,252	0,100	0,128	0,077	0,138	0,197	0,215	
		2021	IV	JÕ	JÄ	LV	PÕ	TA	VA	VI	VÕ	
MEF	KESKMINE	0,155	0,120	0,370	0,269	0,158	0,047	0,041	0,058	0,093	0,037	
	MIN	0,002	0,018	0,004	0,009	0,007	0,002	0,002	0,009	0,003	0,003	
	MAX	3,057	0,311	2,617	3,057	0,838	0,180	0,122	0,135	0,511	0,157	
		2022	IV	JÕ	JÄ	LV	PÕ	TA	VA	VI	VÕ	PÄ
MEF	KESKMINE	0,121	0,106	0,197	0,194	0,127	0,031	0,214	0,018	0,153	0,083	0,032
	MIN	0,000	0,004	0,003	0,025	0,016	0,002	0,007	0,000	0,007	0,000	0,002
	MAX	1,507	0,289	1,201	1,305	1,187	0,251	0,601	0,225	1,507	0,460	0,233

B.

Toimeaine	Tunnus	2020	IV	JÕ	JÄ	LV	PÕ	TA	VA	VI	VÕ	
PRO-D	KESKMINE	0,078	0,021	0,078	0,204	0,033	0,021	0,023	0,079	0,096	0,083	
	MIN	0,008	0,008	0,010	0,013	0,009	0,008	0,008	0,012	0,008	0,009	
	MAX	0,609	0,033	0,314	0,609	0,074	0,056	0,033	0,248	0,314	0,548	
		2021	IV	JÕ	JÄ	LV	PÕ	TA	VA	VI	VÕ	
PRO-D	KESKMINE	0,172	0,039	0,706	0,146	0,070	0,066	0,057	0,088	0,125	0,145	
	MIN	0,004	0,013	0,004	0,010	0,008	0,007	0,005	0,022	0,028	0,009	
	MAX	7,767	0,099	7,767	0,710	0,251	0,130	0,396	0,274	0,580	0,570	
		2022	IV	JÕ	JÄ	LV	PÕ	TA	VA	VI	VÕ	PÄ
PRO-D	KESKMINE	0,116	0,077	0,108	0,062	0,117	0,090	0,075	0,149	0,111	0,157	0,246
	MIN	0,000	0,015	0,000	0,019	0,008	0,014	0,022	0,011	0,014	0,018	0,019
	MAX	3,060	0,266	0,757	0,232	0,596	0,424	0,320	0,844	0,349	0,940	3,060

2.2. Mutatsioonide analüüs asoolide märklauvalgus CYP51.

Zt isolaatides analüüsiti mutatsioonide D134G, V136A/C, A379G, I381V ja S524T esinemist CYP51 valgus. Nimetatud mutatsioonid on viimastel aastatel levinud kõigis Euroopa *Zt* populatsioonides ja on seotud patogeeni suurenenud resistentsuse levikuga erinevate asooli klassi toimeainete suhtes (Heick *et al.* 2020; Jørgensen *et al.* 2020; 2022). Kolme aastase perioodi vältel oli kõige enam levinud mutatsiooniks I381V, mille sagedus populatsioonis varieerus 88%-98% (tabel 10). See mutatsioon, mida esmakordselt kirjeldati 2007 a. (Fraaije *et al.* 2007) domineerib kogu Euroopa *Zt* populatsioonis. Võrreldes 2020 ja 2021 a. näitasid mutatsioonid D143G, V136A/C ja A379G mõningast langus tendentsi, kuid kõigi nimetatud mutatsioonide sagedused $\geq 15\%$ (tabel 9). Eraldi väärib mainimist mutatsioon S524T, mida esines 28% isolaatidel (24 % 2020 a., 29% 2022) (tabel 10). Viimati nimetatud mutatsioon mõjutab patogeeni tundlikkust kõigi DMI rühma fungitsiidide suhtes. Maakonniti oli mutatsioonide esinemine CYP51 valgus väga varieeruv, kuid kõik olulised DMI resistentsust mõjutavad mutatsioonid oli Eesti *Zt* populatsioonis esindatud (tabel 10).

Lisaks mutatsioonidele märklauvalgus CYP51, on selle geeni promootorpiirkonnas kirjeldatud ka 120 bp suurust insertiooni. See insertioon põhjustab geeni suurenenud ekspressiooni, mis vähendab patogeeni tundlikkust DMI rühma toimeainete suhtes, 2022 a. esines see insertioon 14 % isolaatidest.

Sageli sisaldavad resistentsed isolaadid CYP51 valgus mitut mutatsioon. Nii omasid

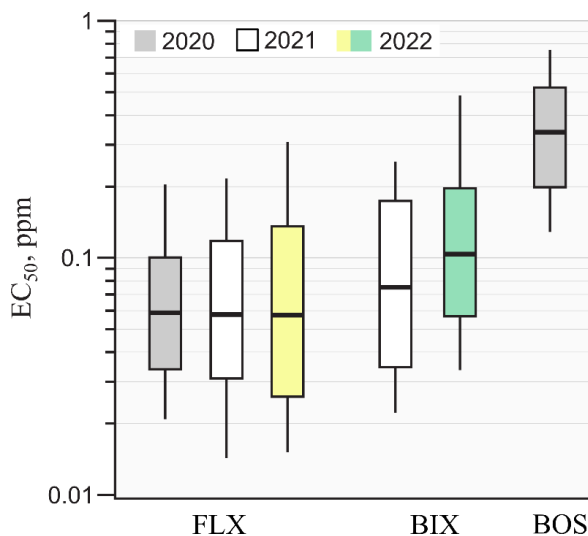
isolaadid, mis olid vähenenud tundlikkusega mefentriflukonasooli suhtes ($EC_{50} \geq 1,0$ ppm), CYP51 valgus kolme mutatsiooni A379G, I381V ja S524T kombinatsiooni ja lisaks ka 120 bp insertiooni CYP51 geeni promootoris.

Tabel 10. Levinumate mutatsioonide sagedus (%) *CYP51* geenis Eesti *Zymoseptoria tritici* populatsioonis 2020 - 2022. a.

MAAKOND	D134G			V136A			V136C			A379G			I381V			S524T		
	2020	2021	2022	2020	2021	2022	2020	2021	2022	2020	2021	2022	2020	2021	2022	2020	2021	2022
IV	5	14	14	5	14	20	0	0	31	42	64	8	100	100	100	0	0	29
JÕ	38	14	24	38	14	44	25	17	2	8	34	30	92	97	95	33	17	55
JÄ	60	7	10	55	7	10	0	3	5	10	27	7	90	100	100	40	23	13
LV	33	45	25	24	45	26	19	0	10	33	14	15	95	91	100	24	41	31
PÕ	29	50	33	35	50	44	0	17	21	24	11	0	100	100	100	35	17	27
TA	62	24	15	19	28	15	0	11	5	10	28	66	38	98	100	14	17	5
VA	40	25	25	33	17	31	0	33	26	0	17	18	100	100	100	33	58	27
VI	62	15	34	48	15	40	14	35	15	48	40	17	86	100	90	19	25	31
VÕ	42	42	36	5	42	43	16	33	13		25	5	95	100	100	16	58	39
PÄ			6			8			25			24			100			20
KESKMINE	42	26	22	30	26	28	10	17	15	21	29	19	88	98	98	24	29	28

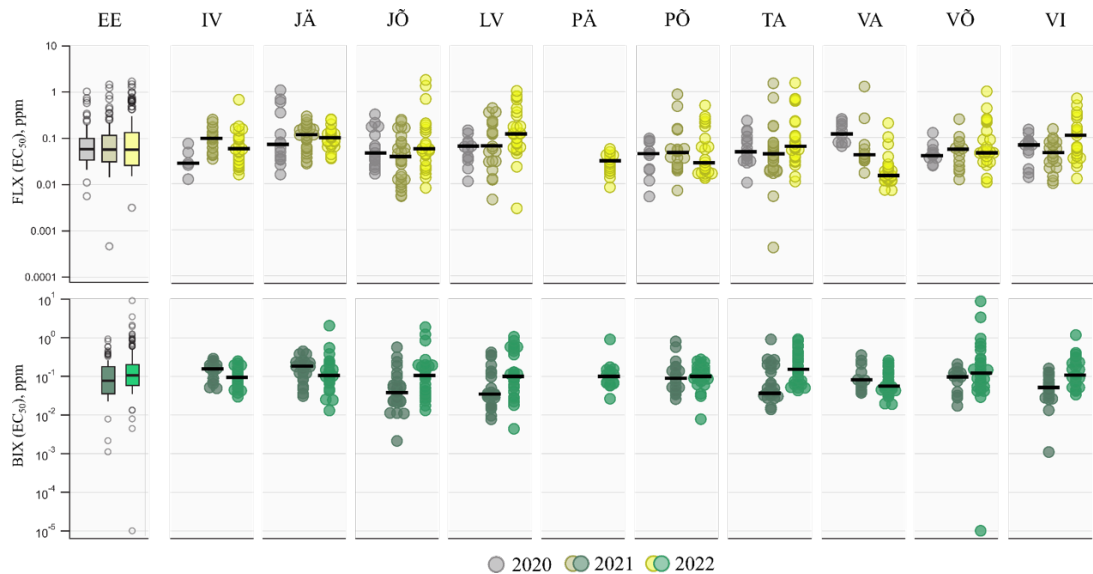
2.3. *Zymoseptoria tritici* populatsiooni resistentsus SDHI rühma fungitsiidide suhtes.

SDHI rühma kuuluvatest toimeainetest analüüsisime erinevate *Zt* isolaatide tundlikkust fluksapüroksaadi, biksafeeni ja boskaliidi suhtes. Kuna 2020 a. ületas Eesti *Zt* populatsiooni boskaliidi keskmine EC_{50} kriitilise väärtuse $>0,5$ ppm ja kuna ka boskaliidi sisaldavaid preparaate *Zt* tõrjes kasutatakse väga vähe, siis 2021. ja 2022 a. asendati see preparaat biksafeeniga (joonis 10).



Joonis 10. Fluksapüroksaadi (FLX), biksafeeni (BIX) ja boskaliidi (BOS) EC_{50} kontsentratsioonid (ppm) aastatel 2020-2022 *Zt* Eesti populatsioonis. Karpdiagrammil olev joon tähistab EC_{50} mediaankeskmist väärtust.

Zt Eesti populatsioonide kolme aasta fluksapüroksaadi keskmised EC_{50} väärtused olid vastavalt 0,102 ppm 2020 a., 0,107 ppm 2021a. ja 0,139ppm 2022 a. (joonis 11, tabel 11A).



Joonis 11. *Zt* (A) fluksapürokasaad (FLX) 2020 -2022 a. ning (B) biksafeeni (BIX) 2021 ja 2022 a. EC₅₀ (ppm) taseme varieeruvus maakondade lõikes. ●, ●, ● tähistab isolaati; – karpdiagrammil ja hajuvusdiagrammil olev joon tähistab mediaankeskmist EC₅₀ väärtust.

Aastate vahel ei olnud statistiliselt olulisi erinevusi (Kruskal-Wallise statistik $H=0,199$; $p=0,905$). Kolme aastase perioodi vältel ei ületanud ühegi aasta fluksapürokasaadi keskmised EC₅₀ väärtused kriitilist piiri 0,5 ppm (joonis 11). Kuid jooniselt 11 on näha, et 2021 a. *Zt* populatsioonis esines siiski üksikuid isolaate, millede fluksapürokasaadi EC₅₀ >0.5 ppm 3 maakonnas, 2022 a. oli selliseid isolaate juba 7 maakonnas.

Tabel 11. Fluksapürokasaadi (FLUX) **A** ja biksafeeni (BIX) **B** keskmised EC₅₀ kontsentratsioonid (ppm) *Zt* Eesti populatsioonis maakondades 2020 - 2022 a. Esitatud on ka iga maakonna EC₅₀ minimaalne ja maksimaalne kontsentratsioon (ppm).

A.

Toimeaine	Tunnus	2020	IV	JÕ	JÄ	LV	PÕ	TA	VA	VI	VÕ	
FLUX	KESKMINE	0,102	0,039	0,088	0,268	0,064	0,047	0,076	0,144	0,070	0,052	
	MIN	0,006	0,013	0,017	0,016	0,012	0,006	0,011	0,067	0,014	0,025	
	MAX	1,072	0,077	0,323	1,072	0,146	0,098	0,237	0,257	0,152	0,129	
		2021	IV	JÕ	JÄ	LV	PÕ	TA	VA	VI	VÕ	
FLUX	KESKMINE	0,107	0,110	0,065	0,122	0,132	0,121	0,136	0,175	0,055	0,065	
	MIN	0,000	0,036	0,006	0,028	0,005	0,007	0,000	0,018	0,011	0,013	
	MAX	1,509	0,248	0,247	0,291	0,442	0,875	1,509	1,282	0,157	0,255	
		2022	IV	JÕ	JÄ	LV	PÕ	TA	VA	VI	VÕ	PÄ
FLUX	KESKMINE	0,139	0,100	0,221	0,109	0,241	0,093	0,225	0,030	0,165	0,130	0,033
	MIN	0,003	0,016	0,008	0,036	0,003	0,014	0,012	0,008	0,013	0,011	0,010
	MAX	1,774	0,670	1,774	0,253	1,033	0,505	1,539	0,209	0,715	1,011	0,064

B.

Toimeaine	Tunnus	2021	IV	JÕ	JÄ	LV	PÕ	TA	VA	VI	VÕ	
BIX	KESKMINE	0,122	0,155	0,085	0,181	0,096	0,162	0,127	0,123	0,062	0,095	
	MIN	0,001	0,049	0,002	0,031	0,008	0,026	0,014	0,037	0,001	0,017	
	MAX	0,905	0,286	0,566	0,449	0,417	0,799	0,905	0,354	0,160	0,206	
		2022	IV	JÕ	JÄ	LV	PÕ	TA	VA	VI	VÕ	PÄ
BIX	KESKMINE	0,237	0,110	0,250	0,220	0,265	0,122	0,258	0,880	0,197	0,598	0,146
	MIN	0,000	0,030	0,013	0,013	0,004	0,008	0,043	0,019	0,034	0,000	0,026
	MAX	8,750	0,247	1,876	2,053	1,056	0,275	0,910	0,259	1,172	8,750	0,905

Zt Eesti populatsiooni kahe aasta biksafeeni keskmised EC₅₀ väärtused olid vastavalt 0,122ppm 2021a. ja 0,237ppm 2022 a. (joonis 11, tabel 11B). Aastate vahel oli statistiliselt oluline erinevus (Welchi $t=2,669$; $p=0,008$). Kolme aastase perioodi vältel ei ületanud fluksapüroksaadi keskmised EC₅₀ väärtused kriitilist väärtust 0,5 ppm (tabel 11). Jooniselt 11 on näha, et 2021 a. esines üksikuid isolaate, mis ületasid EC₅₀ >0.5 ppm väärtuse 3 maakonnas, 2022 a. oli selliseid isolaate 7 maakonnas.

2.4 Mutatsioonide analüüs SDHI märklaudvalgus SDH-B ja SDH-C.

Mitmeid mutatsioone *Sdh* alaühikutes B ja C on seostatud kõrgeenenud EC₅₀ väärtustega SDHI toimeainete suhtes. 2021-2022 a. isolaatides analüüsisime SdhC valgus mutatsioonide C-T79N, C-N86S, C-L129V ja C-H152R olemasolu. SdhC valgus esines mutatsioon C-N86K ainult 2022 a. isolaatides, kokku 17%. Mutatsioon N86S esines 2020 a. 2%, 2021 a.15% ja 2022 a. 23 % isolaatides. Lisaks tuvastasime mutatsiooni W80S 2022 a. 18 % mutantidest. 2022 a. esinesid ka mutatsioonid S83G ja L129G 4% isolaatidest (tabel 12).

Tabel 12. Oluliste mutatsioonide sagedused (%) *SdhC* geenis Eesti *Zt* populatsioonis 2020–2022 a

Maakond	Aasta	SDH-C					
		W80S	S83G	N86K	N86S	L129V	H152R
IV	2020						
	2021						
	2022	5					
JÕ	2020				12		
	2021				7		
	2022				13		
JÄ	2020						
	2021						
	2022			8	4		
LV	2020						
	2021						
	2022			5			
PÕ	2020						
	2021						
	2022			4			
PÄ	2020						
	2021						
	2022						
TA	2020						
	2021						
	2022						
VA	2020						
	2021				8		
	2022					4	
VI	2020						
	2021						
	2022	13			6		
VÕ	2020						
	2021						
	2022		4			4	12

SdhB valgus esines mutatsioone ainult 2021 a. isolaatidel, B-N225I neljal isolaadil ja B-T268I mutatsioon kahel isolaadil. 2022 a. SdhB valgus mutatsiooni ei esinenud.

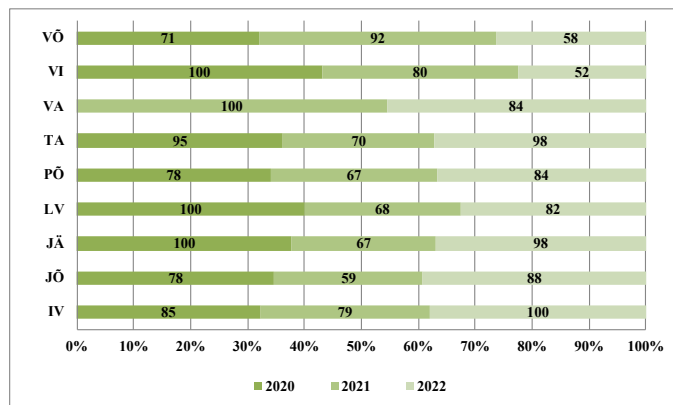
Ükski eespool kirjeldatud mutatsioonidest C-T79N, C-N86S, C-L129V, C-S83G, C-W90S ja C-L129G ei mõjutanud isolaatide tundlikkust SDHI rühma toimeainete suhtes. Seega ei ole *Zt* isolaatide resistentsust tingitud mitte mutatsioonidest, vaid näiteks märklaudvalgu üle

ekspressioonist. Selline resistentsus võib tuleneda erinevatest biokeemilistest mehhanismidest, mis muudavad isolaadi resistentseks SDHI rühma fungitsiidide suhtes. Sarnast situatsiooni on kirjeldanud ka Yamashita and Fraaije (2018), kes isoleerisid SDHI fungitsiidide suhtes resistentsed *Zt* isolaadid, mis samuti ei sisaldanud ühtegi resistentsust põhjustavat mutatsiooni märklaudvalgu Sdh subühikutes.

Kuid eraldi tuleb välja tuua asjaolu, et Võru maakonna 2022 a. isolaatide hulgas avastati kolm isolaati (12 % maakonna isolaatidest), mis kandsid mutatsiooni C-H152R. Tegemist on mutatsiooniga, mis oluliselt vähendas mutatsiooni kandvate isolaatide tundlikkust mõlema nii fluksapüroksaadi kui ka biksafeeni suhtes. Seda mutatsiooni kandvate isolaatide biksafeeni EC₅₀ oli vahemikus 2,6 -7,9 ppm ja fluksapüroksaadil 9,7 – 30 ppm. Siiani on seda mutatsiooni esinenud üksikutel põldudel Iirimaal (2019) ja Inglismaal (2021) (Jørgensen *et al.* 2022). Selle mutatsiooni vähene levik võib olla tingitud sellest, et see vähendab oluliselt seda kandva patogeeni elumust/konkurentsivõimet.

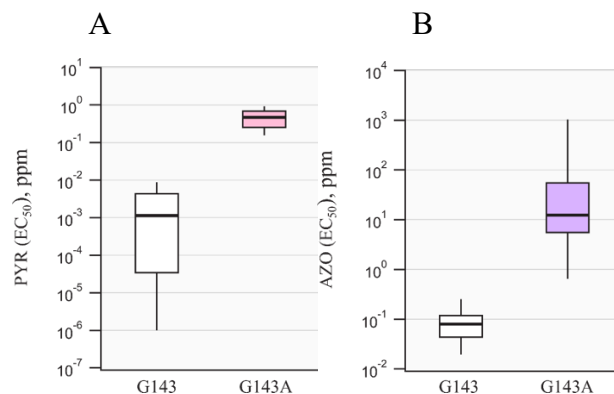
2.5. Mutatsioonide analüüs strobiluriini rühma toimeainete suhtes põhjustavad kolm mutatsiooni F129L, G137R ja G143A märklaudvalgu CytB.

Resistentsust strobiluriini rühma toimeainete suhtes põhjustavad kolm mutatsiooni F129L, G137R ja G143A märklaudvalgu CytB. Eesti *Zt* populatsioonis



Joonis 12. Mutatsiooni G143A sagedused (%) märklaudvalgu CytB *Z. tritici* populatsioonis 2020 - 2022 a

analüüsiti mutatsioon G143A esinemist, mis vähendab patogeeni tundlikkust kõigi selle rühma fungitsiidide suhtes. Mutatsiooni keskmine sagedus *Zt* Eesti populatsioonis ajavahemikus 2020 -2022 a. oli 83% (2020 a. 88%, 2021 a. 76% ja 2022 a. 84%) (joonis 12). G143A on levinud kõigi 9 maakonna põldudel, kust koguti proove *Zt* isoleerimiseks, ainukeseks erandiks oli Valga maakond, kus 2021 a. proovides seda mutatsiooni ei esinenud. Mutatsioone F129L ja G137R Eesti *Zt* populatsioonis ei esinenud.



Joonis 13. Mutatsiooni G143A mõju A. püraklostrobiini (PYR) ja B asoksüstrobiini (AZO) EC₅₀ (ppm) tasemele *Zt* populatsioonis 2022 a. – karpdiagrammil olev joon tähistab mediaankeskmist EC₅₀ väärtust.

Joonisel 13 esitatud tulemused näitavad mutatsiooni G143A mõju testitud strobiluriinide EC₅₀ väärtustele (>0,5ppm). Mutatsiooni G143A kandvate isolaatide tundlikkus on vähenenud nii püraklostrobiini kui ka asoksüstrobiini suhtes. Kuna tundlikkus püraklostrobiini suhtes on vähenenud vähem kui asoksüstrobiini suhtes, siis tuleks eelistada võimalusel selliseid fungitsiide, mis strobiluriini komponendina sisaldavad püraklostrobiini.

Projektiga seotud taristu kasutamine projekti elluviimisel: Proovide kogumiseks kasutati ETKI transporti ja proovivõtu vahendeid. Kuivatatud proovid säilitati toatemperatuuril või sügavkülmikus (-20°C) kuni seeneisolaatide puhaskultuuri viimiseni. *Zymoseptoria tritici* puhaskultuure säilitatakse 20% glütseroolis -80°C juures ultrasügavkülmikus, *Ramularia collo-cygni* puhaskultuure säilitatakse 0,25XPDB söötmes +4°C juures külmkapis. Fungitsiidiresistentsuse hindamiseks rajati katse mikrotiiterplaatidel, katse kuuendal (*Rcc*) või seitsmendal päeval (*Zt*) mõõdeti plaatide kannukestes proovide absoluutne optiline tihedus (OD, 620nm) Tecan Sunrise mikrotiiterplaadilugejaga, kasutades Magellan tarkvara. Molekulaarsed laboritööd, DNA eraldamine, proovide puhastamine, jt teostatakse ETKI taimekaitse laboris. Alates 2022 a. on meil ETKI-s olemas DNA eraldamiseks DNA/RNA robotit QIACube®-HTK (Qiagen, Düsseldorf, Germany), mis võimaldab eraldada ühe töötükliga DNA 96 proovist. Aastal 2020 kasutati KASP PCR tegemiseks TÜTI-s qPCR masinat. Alates 2021 a. viidi analüüsid viidi läbi ETKI-s, Bio Rad CFX384 (Hercules, California 94547,USA) masinaga, tootja protokoll järgi. Sekvenerimisproovide ettevalmistamine toimus ETKI taimekaitse laboris. Saadud PCR fragmendid saadeti edasi Eesti Biokeskuse tuumiklaborisse (Tartus) sekvenerimiseks.

Kokkuvõte

2020-2022 a. Eesti *Zt* ja *Rcc* populatsioonide analüüs näitas:

1. Asooli rühma fungitsiidid toimivad efektiivselt *Zt* ja *Rcc* tõrjes, kuid mõlema patogeeni populatsioonis esineb üksikuid isolaate, mis ületavad asoolide kriitilise kontsentratsiooni ($EC_{50}=0,5$ ppm).
2. Kuigi mefentriflukonasool on uus toimeaine, siis leidub Eestis juba *Zt* isolaate, mille tundlikkus on oluliselt vähenenud, nende CYP51 valgus esineb kolme mutatsiooni A379G, I381V ja S524T kombinatsioon ja lisaks 120 bp insertioon CYP51 promootoris. Kuna mefentriflukonasool on olnud laialdasemalt kasutusel ainult alates 2021 a. ja resistentsed isolaate on vähe, ei saa kindlalt väita, et eespool kirjeldatud haplotüüp on ainuke, mis põhjustab patogeeni tundlikkuse vähenemist mefentriflukonasooli suhtes. Jørgensen, et al näitasid, et vähenenud tundlikkus mefentriflukonasooli suhtes on seotud mutatsioonide D134G and V136C esinemisega resistentsete isolaatide genomis. Kuid kuna resistentsed isolaate on vähe, ei ole ka see seos kindel (Jørgensenj *et al.* 2022).
3. Asoolide ja SDHI toimeainete tundlikkus *Zt* ja *Rcc* populatsioonides on kõige madalam intensiivse põllumajandusega piirkondades Jõgeva, Järva, Lääne-Viru, Tartu, Viljandi maakonnas, kus esines isolaate, mille EC_{50} väärtus ületab kriitilise piiri vähemalt ühe toimeaine suhtes.
4. SDHI rühma fungitsiidide suhtes oli *Zt* populatsiooni tundlikkus kõige suurem fluksapüroksoadi suhtes, aga *Rcc* populatsiooni tundlikkus hoopis biksafeeni suhtes.
5. Kuna strobiluriinide suhtes resistentsust põhjustava mutatsiooni G143A sagedus CytB valgus on kõrge, esinedes rohkem kui 88% *Rcc* isolaatidel ning üle 76% *Zt* isolaatidel, siis tuleks põldudel vältida strobiluriinide kasutamist soolopreparaatidena. G143A mutatsiooni mõju oli olulisem asoksütroobiini tundlikkuse vähenemisele kui püraklostroobiinile.
6. Seega peab taimekaitsevahendite valikul kombineerima või roteerima preparaate, mis sisaldavad erinevate rühmade toimeaineid (asool, SDHI ja strobiluriine). Soolopreparaatide pikaajaline kasutamine viib resistentsuse tekkeni ja selle püsamiseni patogeeni populatsioonis ja selle tulemusel väheneb nende fungitsiidide efektiivsus haigustõrjel.
7. qPCR analüüs näitas, et *Rcc* võib edukalt elada üle ebasoodsad keskkonnatingimused (kõrge temperatuur ja vähene sademete hulk) ilma haigussümptomeid põhjustamata taimekudedes kui endofüüt.

8. Patogeeni jaoks ebasoodsad kasvuhooajad (2021. a *Rcc* jaoks) võivad patogeeni populatsioonis põhjustada suuri muutusi ja pudelikaela efekti, kui ellu jäävad hästi kohastunud genotüübid ja nõrgemad võivad kaduda populatsioonist. Pärast 2021. a oli *Rcc* populatsioonist kadunud isolaadid, millel olid *SdhC* valgus H146R ja V184L mutatsioonid, mistõttu suurenes tundlikkus fluksapüroksaadile. Samas tuvastati, et pärast ebasoodsat kasvuhooaega oli kogu *Rcc* populatsioon *CytB* valgus G143A mutatsiooniga, mis vähendab oluliselt tundlikkust strobiluriinide suhtes.

Soovitused ja ettepanekud:

1. kuna kliimaatilised tingimused võivad populatsioonis põhjustada nn. pudelikaelaefekti (populatsioonis asendub üks genotüüp teisega ja võib muutuda ka patogeeni resistentsusspekter), siis tingib ka see asjaolu vajaduse kombineerida või roteerida erinevaid toimeaineid sisaldavaid preparaate,
2. ühe ja sama toimeainerühma preparaatide kasutamisel tuleb avestada, et mõnede toimeainete vahel esineb ristresistentsust (ühe toimeaine suhtes resistentne patogeen on resistentne ka teise sama rühma toimeaine suhtes),
3. kuna resistentsuse teke on seente evolutsiooni üks osa, on resistentsuse likvideerimine kaheldav. Seega ei saa me mutatsioonide teket vältida, küll aga saame erineva toimeviisiga fungitsiidide kombineerimisel fungitsiidiresistentsuse teket maksimaalselt aeglustada ja vältida resistentsete mutantide domineerimist populatsioonis,
4. strobiluriinide kasutamisel tuleb meeles pidada, et *Zt* ja *Rcc* Eesti populatsioonis on kõrge mutatsiooni G143A sagedus, seega on soovitatav aegajalt kasutada preparaate, mis ei sisalda strobiluriine,
5. võimalusel on soovitan kasutada preparaate, kus on kombineeritud asoolidele ja SDHI rühma toimeaineid

Kasutatud kirjandus.

- Dooley, H., Shaw, M.W., Mehenni-Ciz, J., Spink, J., Kildea, S. (2016). Detection of *Zymoseptoria tritici* SDHI insensitive field isolates carrying the SdhC-H152R and SdhD-R47W substitutions. *Pest Manag Sci* DOI: 10.1002/ps.4269.
- Dubos, T., Pasquali, M., Pogoda, F., Casanova, A., Hoffmann, L., Beyer, M. (2013). Differences between the succinate dehydrogenase sequences of isopyrazam sensitive *Zymoseptoria tritici* and insensitive *Fusarium graminearum* strains. *Pestic Biochem Physiol* 105, 28-35.
- Fraaije, B.A., Cools, H.J., Fountaine, J., Lovell, D.J., Motteram, J., West, J.S. and Lucas, J.A. (2005). Role of ascospores in further spread of QoI-resistant cytochrome b alleles (G143A) in field populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* 95, 933–941.
- Cools, H.J. and Fraaije, B.A. (2013). Update on mechanisms of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola* and implications for future control. *Pest Management Science* 69, 150–155.
- 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 status. *European Journal of Plant Pathology* 149, 669–682.
- 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* 67, 1706-1712.
- Jørgensen L.N., Matzen, N., Heick, T.M., O'Driscoll, A., Clark, B., Waite, K., Blake, J., Glazek, M., Maumene, C., Couleaud, G., Rodemann, B., Weigand, S., Bataille, C. R. B., Hellin, P., Kildea, S., Stammler, G. (2022). Shifting sensitivity of septoria tritici blotch compromises field performance and yield of main fungicides in Europe. *Front Plant Sci.* 2022 Nov 22;13:1060428. doi: 10.3389/fpls.2022.1060428. eCollection 2022. PMID: 36483948
- Matsuzaki, Y., Kiguchi, S., Suemoto, H., Iw, F. (2020). Antifungal activity of metyltetraprole against the existing QoI-resistant isolates of various plant pathogenic fungi. *Pest Management Science*, 76, 1743–1750
- Piotrowska, M.J., Fountaine, J.M., Ennos, R.A., Kaczmarek, M., Burnett, F.J. (2017). Characterisation of *Ramularia collo-cygni* laboratory mutants resistant to succinate dehydrogenase inhibitors. - *Pest Management Science* 73, 1187–1196.
- Rehfus, A., Strobel, D., 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* 67, 175-180.
- Rehfus, A., Matusinsky, P., Strobel, D., Bryson, R., Stammler, R. (2019). Mutations in target genes of succinate dehydrogenase inhibitors and demethylation inhibitors in *Ramularia collo-cygni* in Europe. *Journal of Plant Diseases and Protection* (2019) 126:447–459 <https://doi.org/10.1007/s41348-019-00246-4>.
- Sierotzki H., Frey R., Wullschleger J., Palermo S., Karlin S., Godwin J., Gisi U. (2006). Cytochrome b gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implications for QoI resistance. *Pest Management Science* 63, 225-233.
- Yamashita, M., Fraaije, B. (2018). Non-target site SDHI resistance is present as standing genetic variation in field populations of *Zymoseptoria tritici*. *Pest Management Science* 73, 672-681.

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* 51, 114-118.

Projekti tegevuste ja tulemuste levitamise kava:

(sõltuvalt projekti iseloomust: näiteks aeg, vorm, sihtgrupp, minimaalne auditoorium)

Projektis saadud tulemusi on tutvustatud erinevatel seminaridel Eestis ja Agonoomia igaastastel konverentsidel. Liskas on esinetud ettekannetega NORBARAG-i konverentsidel 2021 ja 2022 aastal.

Konverentsid ja seminarid:

1. haigustekitaja tundlikkuse muutused erinevatesse fungitsiidide rühmadesse kuuluvate toimeainete suhtes kümnes maakonnas on leitavad instituudi kodulehel [.resistentshttps://etki.ee/taimekahjustajate-monitooring-2022-a-kokkuvote/](https://etki.ee/taimekahjustajate-monitooring-2022-a-kokkuvote/)
2. Andres Mäe, Silvia Pihu (2022) Pestitsiidiresistentsus fütopatogeensetel seentel ja umbrohtudel, ETKI https://eestitaimekaitse.emu.ee/userfiles/eesti_taimekaitse/konverents_2022/Mae_2022.pdf. "UUED LAHENDUSED TAIMEKAITSES"
3. Marite Juurik "Fungicide resistance in Estonian *Zymoseptoria tritici* population" 13th NORBARAG meeting 23–25 March 2022
4. Andres Mäe "Resistance of wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* to DMI, QoI and SDHI group fungicides in Estonia". BASF seminar, 19.01.2021, Tartus.
5. Riinu Kiiker (2021) "Fungicide resistance in Estonia " 12th NORBARAG meeting 12 April 2021
6. "Fungitsiidiresistentsus ja seda põhjustavad *Ramularia collo-cygni* Eesti populatsioonis 2019/2020 a." JKMK Seminar, 15.12.2021, Särevere

Publikatsioonid

1. Juurik, M.; Kiiker, R.; Põllumaa, L.; Mäe, A. (2021). Fungitsiidi resistentsus nisu helelaiksust põhjustava patogeeni *Zymoseptoria tritici* Eesti populatsioonis. *Agronoomia* 2021. (158–164). Vali Press.
2. Kiiker, R.; Sooväli, P. (2021). Taimehaiguste esinemisest teraviljapõldudel üle-eestilise monitooringu tulemusel. *Agronoomia* 2021. (150–157). Vali Press.
3. Juurik, Marite; Kiiker, Riinu; Mäe, Andres (2021). Fungitsiidiresistentsuse alased uuringud Eesti Taimekasvatuse Instituudis. *Eesti taimekaitse* 100. (86–88). Eesti Maaülikool.
4. Riinu Kiiker, Andres Mäe (2021). Vähenda riske aruka taimekaitsega talinisu põldudel. (põllumajandus. EE)
5. Juurik, Marite; Sooväli, Pille; Mäe, Andres (2020). Fungitsiidi resistentsust põhjustavate mutatsioonide levik odra põlde kahjustava patogeeni *Ramularia collo-cygni* Eesti populatsioonis. *Alaru, Maarika (Toim.). Agronoomia* 2020. (136–141). *Agronoomia* 2020 Tartu, Eesti, 11.03.2020. Eesti: Vali Press.

Publikatsioonid (1.1)

1. Mäe, Andres; Kiiker, Riinu (2022). Challenges in *Ramularia collo-cygni* Control. *Encyclopedia*, 2 (1), 256–263. DOI: [10.3390/encyclopedia2010017](https://doi.org/10.3390/encyclopedia2010017)

2. Kiiker, Riinu; Juurik, Marite; Heick, Thies Marten; Mäe, Andres (2021). Changes in DMI, SDHI, and QoI Fungicide Sensitivity in the Estonian *Zymoseptoria tritici* Population between 2019 and 2020. *Microorganisms*, 9 (4), 814. DOI: [10.3390/microorganisms9040814](https://doi.org/10.3390/microorganisms9040814).
3. Kiiker, Riinu; Juurik, Marite; Mäe, Andres (2021). Fungicide Resistance Evolving in *Ramularia collo-cygni* Population in Estonia. *Microorganisms*, 9 (7), ARTN 1514. DOI: [10.3390/microorganisms9071514](https://doi.org/10.3390/microorganisms9071514).
4. Mäe, Andres; Fillinger, Sabine; Sooväli, Pille; Heick, Thies Marten (2020). Fungicide Sensitivity Shifting of *Zymoseptoria tritici* in the Finnish-Baltic Region and a Novel Insertion in the MFS1 Promoter. *Frontiers in Plant Science*, 11. DOI: [10.3389/fpls.2020.00385](https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00385).

Muud olulised asjaolud:

Muutuv kliima mõjutab mitte ainult taimede haigustekitajate arengut ja levikut vaid võib põhjustada ka nn. pudelikaelaefekti patogeeni populatsioonis. ka Siiani on aga vähe tähelepanu keskkonna tegurite mõju haigustekitaja genotüübile. Nii toimus Eesti *Rcc* populatsioonis kahe aastase perioodi vältel (2021-2022 a.) olulised muutused. 2021 a. kuum ja kui suvi pärssis patogeeni normaalset arengut ja sügisel nakatunud odrালেhtedel konidiofoore ei moodustunud. 2022 a. isoleeritud puhaskultuuride analüüsil selgus, et võrreldes 2021 a. proovidega oli populatsiooni toimunud mitmed olulised muutused. Võrreldes 2021 a. oli kõigis maakondades tõusnud CytB mutatsiooni G143A sagedus (100%-ni), samas olid populatsioonis kadunud SdhC valgu mutatsioonid H146R ja V184L. Kõik nimetatud mutatsioonid paiknevad erinevate fungitsiidide toimeainete märklaudivalkudes. Selline muutus võib oluliselt mõjutada patogeeni populatsiooni fungitsiidi tundlikkuse spektrit. Kui püsivad on sellised muutused, on praeguseks kogutud kahe aasta andmete põhjal raske öelda.