

Projekti „ Taimekahjustajate pestitsiidiresistentsuse uuringud,, lõpparuanne.

Jõgeval,

29. November 2017 a.

Projektijuht:

Andres Mäe

Asutus:

Eesti Taimekasvatuse Instituut

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

Projektitulemuste lühikokkuvõte: Käesoleva monitooringu programmi üheks eesmärgiks oli analüüsida asooli- ja strobiluriini-rühma fungitsiidide suhtes resistentsust põhjustavate mutatsioonide olemasolu teravilju kahjustavate fütopatogeenide *Septoria tritici*, *Blumeria graminis*, *Pyrenophora teres* ja *Ramularia collo-cygni* genoomides. Resistentsuse monitooringu tulemused näitasid, et uuritud *Septoria tritici* populatsioonidest ainult üks kandis asooli-rühma fungitsiidide suhtes resistentsust põhjustavat mutatsiooni CYP51 valgus. Lisaks oli ühes *Pyrenophora teres* populatsioonis mutatsioon CytB valgus, mida seostatakse patogeeni resistentsusega strobiluriini-rühma fungitsiidide suhtes. *Pyrenophora teres* ja *Ramularia collo-cygni* genoomides resistentsusega seotud mutatsioone ei leitud.

Naeri-hiilamardika resistentsuse monitooringu tulemused näitasid, et Eestis on juba välja kujunemas püretroidi- ja strobiluriiniresistentsed naeri-hiilamardika populatsioonid. Mõlema insektitsiidirühma suhtes resistentsid populatsioonid esines nii Jõgeva maakonnas, aga üksikuid populatsioonid oli ka Ida- ja Lääne-Viru maakonnas. Resistentsuse levimise pidurdamiseks naeri-hiilamardikate hulgas tuleks vältida sama toimeainega püretroidide ja neonikotinoidide järjepidevat kasutamist ning korduvaid pritsimisi.

Projektitulemuste lühikokkuvõte inglise keeles: Monitoring for fungicide resistance in *Septoria tritici*, *Blumeria graminis*, *Pyrenophora teres* ja *Ramularia collo-cygni* populations was carried out to test the most frequent mutations in CYP51 for azole resistance and in CytB gene for strobilurin resistance. This study provides evidence for very few incidence of fungicide resistance in the current population *Septoria tritici* (one mutation for azole resistance) and *Pyrenophora teres* (one mutation for strobilurin resistance).

The results of monitoring for insecticide resistance of pollen beetle, *Meligethus aeneus* indicate that there is an increase of pyrethroid and neo-nicotinoid resistance in Jõgeva, West-Viru and East-Viru County compared to previous studies. Furthermore, though the results showed different sensitivity to insecticides, all the tested pollen beetles were highly resistant to both tested insecticides. Continuous monitoring of populations and insecticides with different mode of action should be used necessary to avoid field control failures.

Projektis esitatud eesmärkide saavutamise (sh kasutatud metoodika):

Taimekaitses on resistentsuse tekkimise oht seotud mitmete teguritega, sealhulgas nii haigustekitajate taimekaitsevahendite kokkupuutumistasemega aga ka haigustekitajate bioloogiaga. Sellest tulenevalt oli käesoleva projekti esimeseks eesmärgiks analüüsida fungitsiidiresistentsust tekitavate mutatsioonide esinemist teraviljahaigus põhjustavatel fütopatogeensetel seentel *Septoria tritici*, *Blumeria graminis*, *Pyrenophora teres* ja *Ramularia collo-cygni*. Projekti teiseks osaks oli teostada naeri-hiilamardika resistentsuse monitooring, et teha kindlaks võimalik insektitsiidiresistentsus λ -cyhalotriini (püretroid) ja thiaclopridi (neonikotinoid) suhtes.

Proovide võtmine, Teraviljaproovid (haigustunnustega lehed). Projekti käigus koguti 16 talinisu, 6 suvinisu, 16 taliotra ja 7 suviotra proovi, 7 erineva maakonna põldudel kokku 45 proovi (tabel 1.). Proovide kogumine toimus alates 12.06.2017 kuni 23.08.2017. **Hiilamardikate proovid.** Selle töö raames koguti naeri-hiilamardikaid Jõgeva mk. 18 erinevalt põllult (8 talirapsi ja 10 suvirapsi põllult), Lääne-Viru mk. 4 põllult (2 talirapsi ja 2 suvirapsi põllult) ja Ida-Viru mk. 1 põllult (1 suvirapsi põllult) (tabel 4.). Proovide kogumine toimus suvirapsi põldudel alates 03.07.2017 kuni 11.07. 2017 ja talirapsi põldudel alates 12.06.2017 kuni 11.07.2017.

Tabel 1. Talinisu, suvinisu, taliotra ja suviotra proovivõtu kohad.

	Teravili	Proovide arv	Maakond	Proovivõtu koht
1.	Talinisu	4	Järva mk	Vaoveski, Sargavere
		8	Viljandi mk.	Põndi, Võistre, Matopera
		4	Jõgeva mk.	Annamõisa, Sulustvere
2.	Suvinisu	1	Lääne-Viru mk.	Simuna
		3	Jõgeva mk.	Tabivere, Kapu
		1	Tartu mk.	Kärevere
		1	Viljandi mk	Kõvaküla
3.	Talioter	10	Viljandi mk.	Uduallika, Matopera
		3	Jõgeva mk.	Sulustvere
		2	Võru mk.	Väimela
		1	Põlva mk.	Jaanimõisa
4.	Suvioter	4	Lääne-Viru mk.	Voore, Salla, Koluvare, Simuna
		2	Tatu mk.	Tüki, Nõo
		1	Viljandi mk.	Sultsi

Tabel 4. Naeri-hiilamardikate proovivõtu kohad.

	Raps	Maakond	Proovivõtukoh
1.	Suviraps	Jõgeva mk.	Änküla
2.	Suviraps	Jõgeva mk.	Kõpu
3.	Suviraps	Jõgeva mk.	Liivoja

4.	Suviraps	Jõgeva mk.	Mällikvere
5.	Suviraps	Jõgeva mk.	Mooritsa 2
6.	Suviraps	Jõgeva mk.	Mooritsa
7.	Suviraps	Jõgeva mk.	Mullavere
8.	Suviraps	Jõgeva mk.	Selli
9.	Suviraps	Jõgeva mk.	Sulustvere
10.	Suviraps	Jõgeva mk.	Torma
11.	Suviraps	Ida-Viru mk.	Kõrvemetsa
12.	Suviraps	Lääne-Viru mk.	Lammasküla
13.	Suviraps	Lääne-Viru mk.	Lammasküla
14.	Taliraps	Jõgeva mk.	Aidu
15.	Taliraps	Jõgeva mk.	Õuna
16.	Taliraps	Jõgeva mk.	Palamuse
17.	Taliraps	Jõgeva mk.	Pikkjärve
18.	Taliraps	Jõgeva mk.	Võikvere
19.	Taliraps	Jõgeva mk.	Kuningamäe
20.	Taliraps	Jõgeva mk.	Röstla
21.	Taliraps	Jõgeva mk.	Sulustvere
22.	Taliraps	Lääne-Viru mk.	Võivere
23.	Taliraps	Lääne-Viru mk.	Nadalama

Laborianalüüsid. Haigustunnustega taliodra, suvi- ja talinisu lehtedest DNA eraldamiseks kasutati DNeasy Mini Kit (Qiagen) ja proovide täiendavaks puhastamiseks DNA Clean & Concentrator-5Kit (Zymo Research). PCR meetodiga testiti asooli-rühma fungitsiidide suhtes resistentsust andvate mutatsioonide A134G, Y136F ja 120 bp insertiooni ning strobiluriini-rühma fungitsiidide suhtes resistentsust andvate mutatsioonide G143A ja F129L esinemist *Septoria tritici*, *Blumeria graminis*, *Pyrenophora teres* ja *Ramularia collo-cygni* genoomides. Mutatsioonide tuvastamiseks puhastati nii resistentsetest kui ka kontroll variantidest saadud PCR fragmendid ja saadeti sekveneerimiseks Eesti Biokeskuse tuumiklaborisse.

Insektitsiiditundlikkuse hindamiseks kasutati IRAC'i poolt välja töötatud tundlikkuse hindamise skeeme IRAC No. 11 ja IRAC No. 021. Resistentsetest naeri-hiilamardikatest DNA eraldamiseks kasutati DNeasy Mini Kit (Qiagen) ja proovide täiendavaks puhastamiseks DNA Clean & Concentrator-5Kit (Zymo Research). PCR meetodiga testiti insektitsiidide suhtes resistentsetes hiilamardikates resistentsust andvate mutatsioonide L1014F (λ -cyhalotriini resistentsus) ja R18T (neonikotinoidi resistentsus) olemasolu genoomis. Kontrolliks kasutasime insektitsiidide suhtes tundlikke naeri-hiilamardikaid. Nii resistentsetest kui ka kontroll variantidest saadud PCR fragmendid puhastati ja saadeti sekveneerimiseks Eesti Biokeskuse tuumiklaborisse.

Uuringu tulemused:

1. Fungitsiidiresistentsust põhjustavad mutatsioonid fütopatogeensetes seentes. Resistentsete haigustekitajate väljakujunemist on väga raske eelnevalt prognoosida, kuna see sõltub paljude bioloogiliste ja agronoomiliste tegurite koosmõjust. Fungitsiidiresistentsuse tekke mehhanismiks on nn toimekoha resistentsus, mille põhjuseks on mutatsioon(id) toimekoha valkudes (mille geneetiliseks aluseks on mutatsioon vastava valgu sünteesi määravas geenis). Nakatunud suvi- ja talinisu taimedelt isoleeritud fütopatogeensete seente DNA analüüs näitas, et ainult ühes *Septoria tritici* genoomis oli mutatsioon (120 bp insertioon *cyp51* geeni

promootorpiirkonnas), mida seostatakse resistentsusega asool-tüüpi fungitsiidide suhtes. Mutatsiooni kandva patogeeni proov isoleeriti talinisu põllult Särgveres, Järva maakonnas (tabel 2.). Teine muatsiooniga fütopatogeenne seen leiti suviadra põllult Voorel, Lääne-Viru maakonnas (tabel 3.). Siin kandis mutatsiooni odra võrklaiksust põhjustav *Pyrenophora teres*. Patogeenis oli toimunud CytB valgus mutatsioon G143A (punktmutatsioon *cytB* geenis põhjustas aminohappe vahetuse CytB valgus), mida seostatakse resistentsusega strobiluriin-tüüpi fungitsiidide suhtes.

Blumeria graminis ja *Ramularia collo-cygni* genoomides asool- ja strobiluriin-tüüpi fungitsiidide suhtes resistentsust andvaid mutatsioone G143A, F129L (resistentsus azool-tüüpi fungitsiidide suhtes) ning A134G, Y136F ja insert. 120 bp (resistentsus strobiluriin-tüüpi fungitsiidide suhtes) ei tuvastatud.

Tabel 2 Asool-tüüpi fungitsiidide suhtest resistentsust andvad mutatsioonid fütopatogeensetes seentes.

				Asool-tüüpi fungitsiidide resistentsus; mutatsioonid A134G; Mut Y136F; insert. 120 bp			
	Teravili	Proovide arv	Maakonnad	Kõrreliste helelaiksus <i>Septoria tritici</i>	Kõrreliste jahukaste <i>Blumeria graminis</i>	Odra võrklaiksus <i>Pyrenophora teres</i>	<i>Ramularia Ramularia collo-cygni</i>
1.	Talinisu	16	Järva mk.; Viljandi mk.; Jõgeva mk.	Insert.120 bp, Särgavere, Järvamaa	0	0	0
2.	Suvunisu	6	Lääne-Viru mk.; Jõgeva mk.; Tartu mk.; Viljandi mk.	0	0	0	0
3.	Talioder	16	Viljandi mk.; Jõgeva mk.; Võru mk.; Põlva mk.	0	0	0	0
4.	Suviuder	7	Lääne-Viru mk.; Tartu mk.; Jõgeva mk.	0	0	0	0

Tabel 3. Strobiluriin-tüüpi fungitsiidide suhtest resistentsust andvate mutatsioonid fütopatogeensetes seentes.

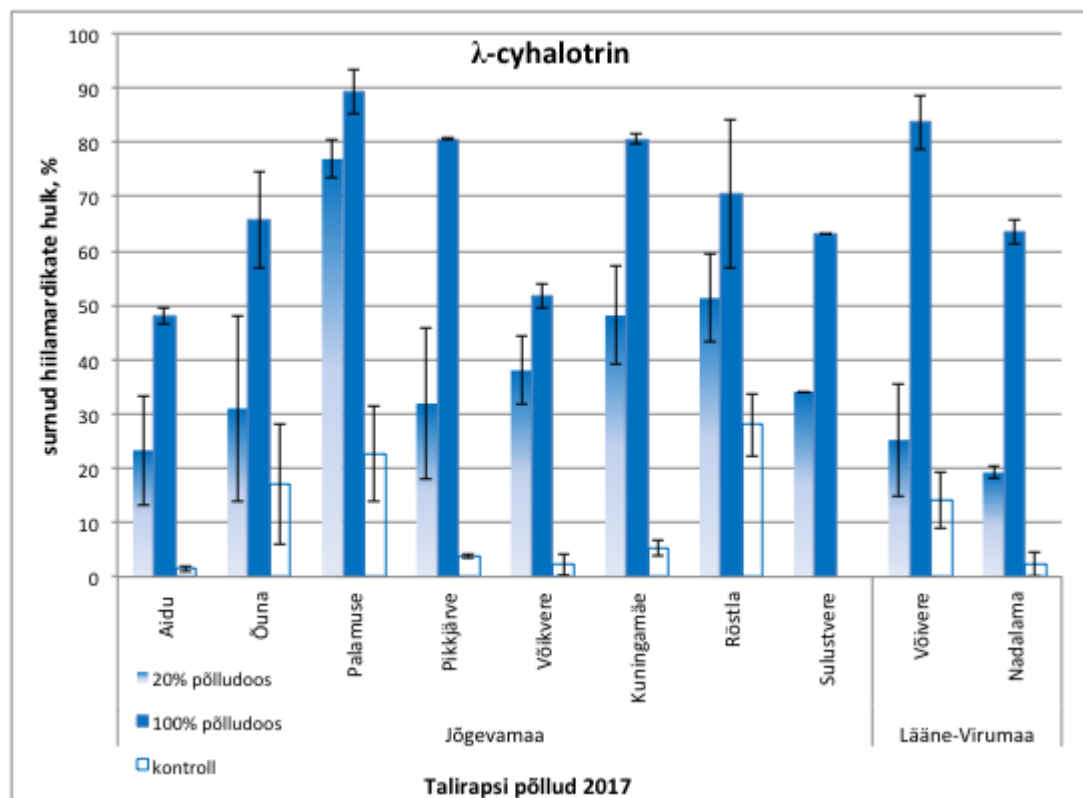
				Strobiluriin-tüüpi fungitsiidi resistentsus; mutatsioonid G143A; F129L			
	Teravili	Proovide arv	Maakonnad	Kõrreliste helelaiksus <i>Septoria tritici</i>	Kõrreliste jahukaste <i>Blumeria graminis</i>	Odra võrklaiksus <i>Pyrenophora teres</i>	<i>Ramularia Ramularia collo-cygni</i>
1.	Talinisu	16	Järva mk.; Viljandi mk.; Jõgeva mk.;	0	0	0	0
2.	Suvinisu	6	Lääne-Viru mk.; Jõgeva mk.; Tartu mk.; Viljandi mk.	0	0	0	0
3.	Talioder	16	Viljandi mk.; Jõgeva mk.; Võru mk.; Põlva mk.	0	0	0	0
4.	Suviuder	7	Lääne-Viru mk.; Tartu mk.; Jõgeva mk.	0	0	F129L, Voore, Lääne-Virumaa	0

2. Naeri-hiilamardikate insektitsiidiresistentsuse monitoring.

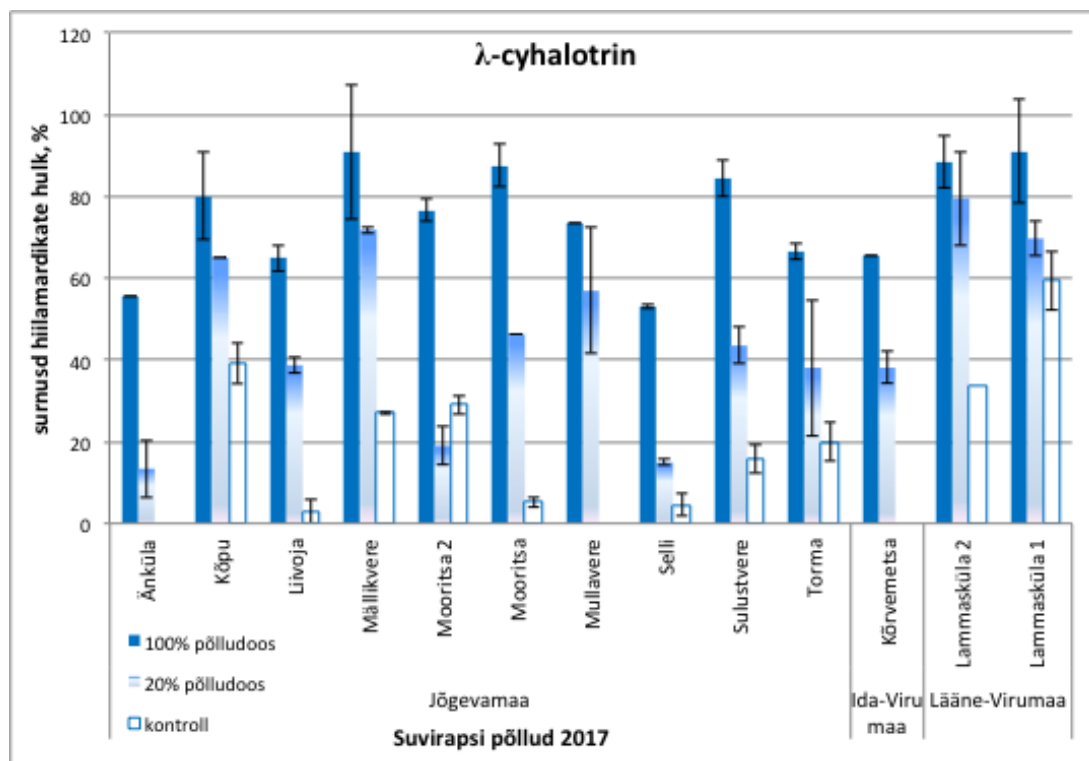
Naeri-hiilamardikate insektitsiiditundlikkust hinnati rahvusvahelise IRAC metoodika kohaselt. Naeri-hiilamardikate λ -cyhalotriini (püretroid) tundlikkuse testi tulemused on esitatud joonisel 1 A, B. IRAC'i poolt välja töötatud insektitsiiditundlikkuse hindamise skeemi (IRAC No.11) kriteeriumite kohaselt on nii suvi- kui ka talirapsi põldudel kogutud hiilamardikad λ -cyhalotriini (püretroidi) suhtes resistentsed (IRAC kood 4), sest nende suremus katses kasutatud insektitsiidi 100% põlludoosi suhtes on väiksem kui 90%. DNA sekveneerimise tulemuste analüüs näitas, et 10 püretroidresistensist naeri-hiilamardikast 2-el esineb mutatsiooni L1014, mis põhjustab muutusi insektitsiidi toimekoha (kodeerib natriumpumba kanalivalgu sünteesi) valgus ja annab püretroidide vastu nn toimekoha tundetuse (tabel 5.).

Hiilamardikate thiaclopridi (neonikotinoid) tundlikkuse testi tulemused on esitatud joonisel 2 A, B. IRAC'i poolt välja töötatud insektitsiiditundlikkuse hindamise skeemi (IRAC No.021) kriteeriumite kohaselt on nii suvi- kui ka talirapsi põldudel kogutud naeri-hiilamardikad thiacloprid (neonikotinoid) suhtes resistentsed, sest nende suremus katses kasutatud insektitsiidi 100% põlludoosi suhtes on väiksem kui $93 \pm 6\%$ ja 200% põlludoosi kasutamisel väiksem kui $98 \pm 3\%$. DNA sekveneerimise tulemuste analüüs näitas, et 10-st püretroidresistensist naeri-hiilamardikast ühel esineb mutatsiooni R81T, mis põhjustab muutusi insektitsiidi toimekoha (kodeerib atsetüülkoliini retseptorivalgu sünteesi) valgus ja annab thiaclopridi (neonikotinoid) vastu nn toimekoha tundetuse (tabel 6.).

A.

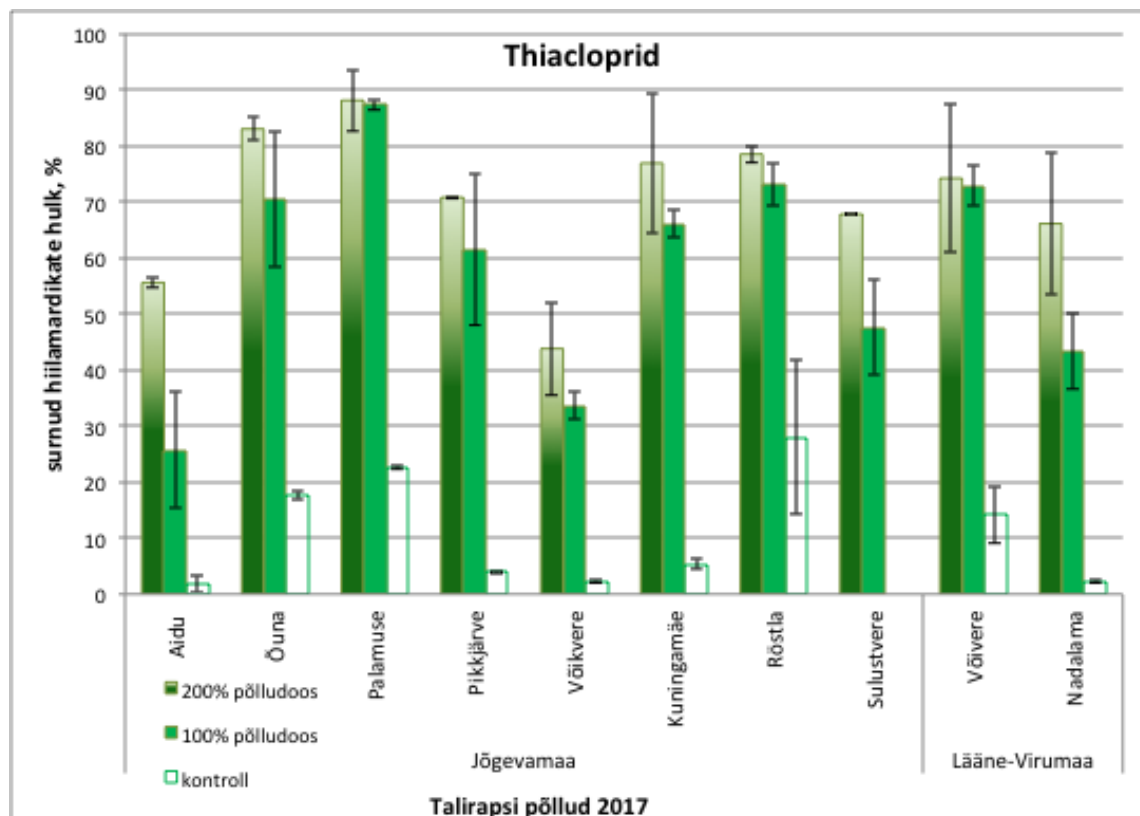


B.

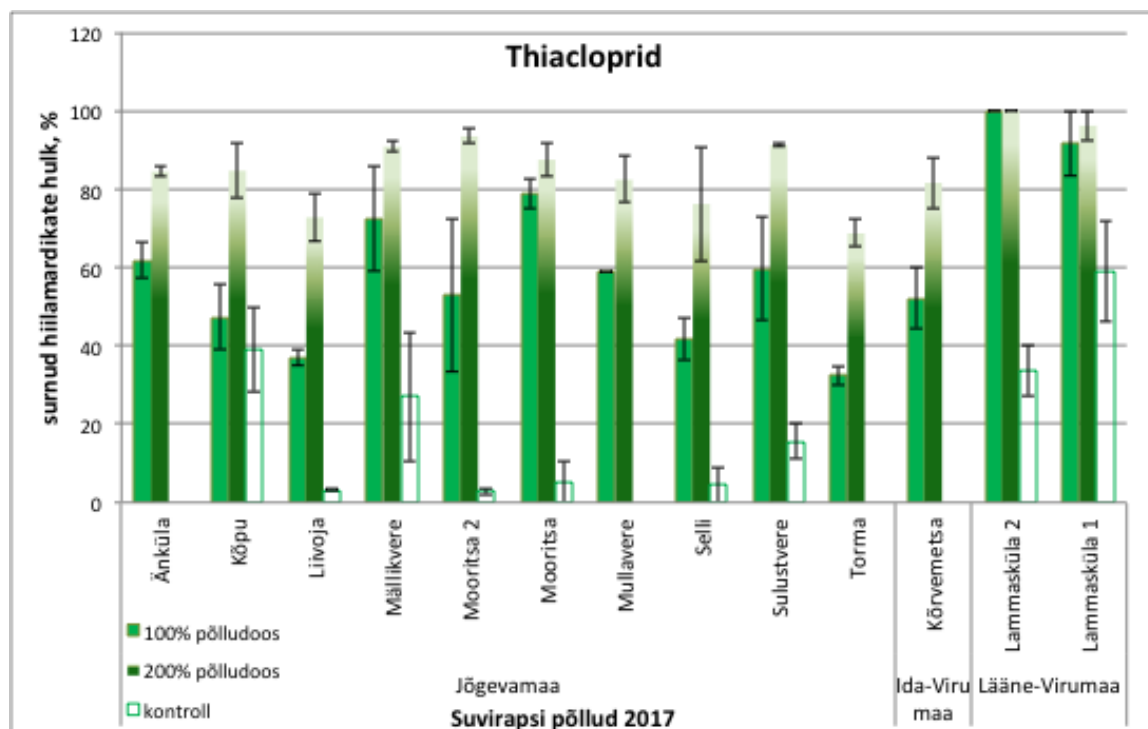


Joonis 1. Surnud naeri-hiilamardikate osakaalu % λ-cyhalotriini eri kontsentratsioonidega ja kontrollvariantidega töötlusel. (A) suvirapsi ja (B) talirapsi põldudel kogitud naeri-hiilamardikad 2017 a.

A.



B.



Joonis 2. Surnud naeri-hiilamardikate osakaalud % thiaclopridi eri kontsentratsioonidega ja kontrollvariantidega töötluses. (A) suvirapsi ja (B) talirapsi põldudel kogutud naeri-hiilamardikad 2017 a.

Tabel 5. L1014F mutatsiooni esinemine naeri-hiilamardika genoomis.

Nr.	Proovivõtukoht	Insektitsiid	Peremeestaim	L1014F mutatsioon
1.	Aidu Jõgevamaa	λ- Cyhalothrin	Taliraps	puudub
2.	Pikkjärve, Jõgevamaa	λ- Cyhalothrin	Taliraps	L1014F
3.	Kuningamäe, Jõgevamaa	λ- Cyhalothrin	Taliraps	puudub
4.	Võivere, Lääne-Virumaa	λ- Cyhalothrin	Taliraps	puudub
5.	Nadalama, Lääne-Virumaa	λ- Cyhalothrin	Taliraps	puudub
6.	Änküla, Jõgevamaa	λ- Cyhalothrin	Suviraps	puudub
7.	Mooritsa, Jõgevamaa	λ- Cyhalothrin	Suviraps	puudub
8.	Sulustvere, Jõgevamaa	λ- Cyhalothrin	Suviraps	L1014F
9.	Torma, Jõgevamaa	λ- Cyhalothrin	Suviraps	puudub
10.	Kõrvemetsa, Ida-Virumaa	λ- Cyhalothrin	Suviraps	puudub

Tabel 6. R81T mutatsiooni esinemine naeri-hiilamardika genoomis.

Nr.	Proovivõtukoht	Insektitsiid	Peremeestaim	R81T mutatsioon
1.	Aidu, Jõgevamaa	Thiacloprid	Taliraps	puudub
2.	Pikkjärve, Jõgevamaa	Thiacloprid	Taliraps	puudub
3.	Kuningamäe, Jõgevamaa	Thiacloprid	Taliraps	puudub

4.	Võivere, Lääne-Virumaa	Thiacloprid	Taliraps	puudub
5.	Nadalama, Lääne-Virumaa	Thiacloprid	Taliraps	puudub
6.	Änkküla, Jõgevamaa	Thiacloprid	Taliraps	puudub
7.	Mooritsa, Jõgevamaa	Thiacloprid	Taliraps	puudub
8.	Sulustvere, Jõgevamaa	Thiacloprid	Taliraps	puudub
9.	Torma, Jõgevamaa	Thiacloprid	Taliraps	puudub
10.	Kõrvemetsa, Ida-Virumaa	Thiacloprid	Taliraps	R81T

Soovitused ja ettepanekud:

Septoria tritici, Blumeria graminis, Pyrenophora teres ja Ramularia collo-cygni fungitsiidide resistentsuse monitoorig.

- Analüüsid näitasid, et resistentsust põhjustavate mutatsioonide esines ainult kahes populatsioonis, ühes *Septoria tritici* ja ühes *Pyrenophora teres* populatsioonis. Seega ei ole siin otsest vajadust järgmisel aastal monitooringut kõikide patogeenidega korrata. Arvestades erinevate patogeenide levikut teravilja põldudel, oleks mõttekas jätkata resistentsuse leviku analüüsi *Septoria tritici* populatsioonides. *Septoria tritici* on laialt levinud fütopatogeenne seen, mis põhjustab olulist kahju nii suvi- kui ka talinisu põldudel.

Naeri-hiilamardikate monitooring.

- Eestis Jõgeva maakonnas on hiilamardika püretroidi- ja neonikotinoidi tundlikkus piirkonniti erinev, kuid IRAC-i insektitsiiditundlikkuse hindamise skeemi/kriteeriumite järgi on maakonna populatsioon(id) resistentsed insektitsiidile. Sama kehtib ka üksikute testitud Ida- ja Lääne-Viru maakonna populatsioonide kohta. Ühe mõttena tasuks kaaluda süstemaatilise monitooringu laiendamist ka Jõgeva mk. külgnervesse maakondadesse. Vaatluse alla tuleks võtta nii suvi- kui ka talirapsi põllud

Muud olulised asjaolud:

Resistentsuse leviku monitooringut võiks ka plaani võtta mitmeaastase projektina, sest kahtlemata mõjutavad iga patogeeni levikut ja ka elumust oluliselt näiteks ilmastik, mis võib aastate lõikes olla väga erinev. Nii näiteks mõjutas käesolev 2017 aasta fütopatogeensete seente arengut jahe kevad ja suvi. Patogeenid levisid, aga haigustunnused ilmnesisid võrreldes varasemate aastatega hiljem (ilmselt oli see tingitud suhteliselt madalatest temperatuuridest). Samuti oli fütopatogeensete seente puhaskultuuride isoleerimine raske, kuna aasta soodustas nn tavahallituste intensiivset paljunemist. Viimased kasvavad oluliselt kiiremini nii põllul (sest ei ole nii tundlikud temperatuuri kõikumistele) kui ka selektiivsöötmetel laboris. Seetõttu homogeense fütopatogeeni puhaskultuuri isoleerimine töömahukas ja aega nõudev.