

VYTAUTO DIDŽIOJO UNIVERSITETAS
LIETUVOS AGRARINIŲ IR MIŠKŲ MOKSLŲ CENTRAS

Karolina LAVRUKAITĖ

**LAPŲ SEPTORIOZĖS SUKĖLĖJO *ZYMOSEPTORIA TRITICI*
PLITIMAS, PATOGENIŠKUMAS IR KONTROLĖ ŽIEMINIUOSE
KVIEČIUOSE**

Mokslo daktaro disertacija
Žemės ūkio mokslai, agronomija (A 001)

Kaunas, 2023

Mokslo daktaro disertacija rengta 2018–2023 m. Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centre pagal LR švietimo ir mokslo ministro 2019 m. vasario 22 d. įsakymu Nr. V-160 suteiktą doktorantūros teisę Vytauto Didžiojo universitetui su Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centru.

Mokslinis vadovas:

Dr. **Jūratė Ramanauskienė** (Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centras, Žemės ūkio mokslai, agronomija A 001).

Mokslinė konsultantė:

Dr. **Rita Armonienė** (Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centras, Žemės ūkio mokslai, agronomija A 001).

Disertacijos gynimo taryba:

Pirmininkas

Dr. **Skaidrė Supronienė** (Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centras, Žemės ūkio mokslai, agronomija A 001).

Nariai:

Prof. dr. **Rimantas Velička** (Vytauto Didžiojo universiteto Žemės ūkio akademija, Žemės ūkio mokslai, agronomija A 001).

Dr. **Alvyra Šlepetienė** (Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro filialas, Žemės ūkio mokslai, agronomija A 001).

Prof. dr. **Ingrida Šaulienė** (Vilniaus universiteto Šiaulių akademija, Gamtos mokslai, ekologija ir aplinkotyra N 012).

Dr. **Biruta Bankina** (Latvijos gamtos mokslų ir technologijų universitetas, Žemės ūkio mokslai, agronomija A 001).

Disertacija bus ginama viešame Agronomijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2023 m. rugpjūčio 3 d. 10 val. Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centre.

Adresas: Instituto al. 1, Akademija, Kėdainių r.

Disertacija galima peržiūrėti Lietuvos nacionalinėje Martyno Mažvydo bibliotekoje bei Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro ir Vytauto Didžiojo universiteto bibliotekose.

VYTAUTAS MAGNUS UNIVERSITY
LITHUANIAN RESEARCH CENTRE FOR AGRICULTURE AND FORESTRY

Karolina LAVRUKAITĖ

**SPREAD, PATHOGENICITY AND CONTROL OF SEPTORIA TRITICI
BLOTCH CAUSAL AGENT *ZYMOSEPTORIA TRITICI* IN WINTER
WHEAT**

Doctoral Dissertation
Agricultural Sciences, Agronomy (A 001)

Kaunas, 2023

Dissertation was prepared at Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry in 2018–2023. The right of doctoral studies was granted to Vytautas Magnus University jointly with Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, on 22 February, 2019, by the decision No. V–160 of the Government of the Republic of Lithuania.

Scientific Supervisor:

Dr. **Jūratė Ramanauskienė** (Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Agricultural Sciences, Agronomy A 001).

Scientific Consultant:

Dr. **Rita Armonienė** (Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Agricultural Sciences, Agronomy A 001).

Council of defence of the doctoral dissertation:

Chairman:

Dr. **Skaidrė Supronienė** (Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Agricultural Sciences, Agronomy A 001).

Members:

Prof. dr. **Rimantas Velička** (Vytautas Magnus University Agriculture Academy, Agricultural Sciences, Agronomy A 001).

Dr. **Alvyra Šlepėtienė** (Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Agricultural Sciences, Agronomy A 001).

Prof. dr. **Ingrida Šaulienė** (Vilnius University Šiauliai Academy, Agricultural Sciences, Ecology and Environmental N 012).

Dr. **Biruta Bankina** (Latvia University of Life Sciences and technology, Agricultural Sciences, Agronomy A 001).

The official defence of the dissertation will be held at 10 a.m. on 3rd of August, 2023 at Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry.

Address: Instituto al. 1, Akademija, Kėdainiai distr.

The dissertation is available at Martynas Mažvydas National Library of Lithuania and the libraries of Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry and Vytautas Magnus University.

TURINYS

PADĖKA	7
PAGRINDINĖS SANTRUMPOS IR SĄVOKOS	8
ĮVADAS	9
1. LITERATŪROS ANALIZĖ	13
1.1. Žieminiai kviečiai ir pagrindinės jų ligos	13
1.2. Lapų septoriozė ir patogenas <i>Zymoseptoria tritici</i>	13
1.3. <i>Z. tritici</i> agresyvumas (patogeniškumo komponentai)	17
1.4. Lapų septoriozės kontrolės būdai	18
1.4.1. Integruota kenksmingų organizmų kontrolė	18
1.4.2. Cheminė kontrolė (fungicidų grupės)	20
1.5. Patogeno <i>Zymoseptoria tritici</i> atsparumas fungicidams	22
1.5.1. Atsparumas strobilurinių (QoI) grupės fungicidams	24
1.5.2. Atsparumas karboksamidų (SDHI) grupės fungicidams	24
1.5.3. Atsparumas triazolų (DMI) grupės fungicidams	25
2. TYRIMO OBJEKTAS IR METODIKA	27
2.1. Tyrimo objektas ir vieta	27
2.2. Lapų septoriozės sukėlėjo <i>Z. tritici</i> plitimo tyrimai	27
2.3. Lapų septoriozės kontrolės optimizavimas	30
2.4. Izoliatų paruošimas patogeniškumo bei atsparumo fungicidams tyrimams	32
2.5. <i>Z. tritici</i> patogeniškumo testas	35
2.6. <i>Z. tritici</i> atsparumo DMI, QoI ir SDHI grupių fungicidams tyrimai	36
2.6.1. Grybo <i>Z. tritici</i> izoliatų atsparumo fungicidams nustatymas	36
2.6.2. Mutacijų identifikavimas <i>Z. tritici</i> genome	38
2.6.3. Skirtingų fungicidų įtaka lapų septoriozės intensyvumui	40
2.7. Meteorologinės sąlygos tyrimų metais	41
2.8. Statistinės analizės metodai	42
3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	43
3.1. <i>Z. tritici</i> lytinių sporų plitimo pradžios bei plitimo pikų fiksavimas	43
3.2. Fungicidų panaudojimo laiko įtaka lapų septoriozės intensyvumui	47
3.2.1. Sėjomainų įtaka lapų septoriozės intensyvumui	50
3.3. <i>Z. tritici</i> patogeniškumas	55
3.4. Atsparumo fungicidams tyrimai	61

3.4.1. <i>Z. tritici</i> izoliatų jautrumas skirtingų grupių fungicidams	62
3.4.2. Mutacijų bei kitų mechanizmų lemiančių atsparumą fungicidams identifikavimas	68
3.4.3. Fungicidų efektyvumas <i>Z. tritici</i> kontrolei	71
IŠVADOS	75
LITERATŪROS SĄRAŠAS	76
PRIEDAI	95
PASKELBTŲ PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS DISERTACIJOS TEMA	99
APIE AUTORIŲ	118
SUMMARY	119

PADEKA

Nuoširdžiai dėkoju mokslinio darbo vadovei dr. Jūratei Ramanauskienei už vedimą šiuo mokslo keliu, už rūpestį bei patarimus ir didelę kantrybę rengiant disertaciją. Taip pat didelis ačiū mokslinio darbo konsultantei dr. R. Armonienei už profesionalias įžvalgas, geranoriškus patarimus ir pagalbą rengiant mokslines publikacijas.

Noriu padėkoti Augalų patologijos ir apsaugos skyriaus vedėjai dr. Romai Semaškienei ir visam šio skyriaus kolektyvui už pagalbą ir palaikymą ir visas smagias akimirkas kartu. Ypatingai dėkoju kolegai A. Sabeckiui už visokeriopą pagalbą bei palaikymą studijų ir disertacijos rengimo metu.

Taip pat esu labai dėkinga savo šeimos nariams bei draugams už palaikymą bei tikėjimą manimi.

PAGRINDINĖS SANTRUMPOS IR SĄVOKOS

A1 – pirmasis purškimas

A2 – antrasis purškimas

AUDPC – ligos pažeisto lapų ploto sezono metu indeksas

BBCH – augimo tarpsnių skalė (santrumpa iš **Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt, CHEmical**)

BDA – bulvių dekstrozės agaras

CYP51 – citochromo P450 genų šeimos narys

cyt b – citochromas b

DMI – demetilinimo inhibitoriai, triazolų grupė

DNR – deoksiribonukleorūgštis

dpi – dienos po inokuliacijos / *days post inoculation*

IKOK – integruota kenksmingų organizmų kontrolė

L1 – vėliavinis lapas

L2 – antras lapas (pirmas lapas po vėliavinio)

L3 – trečias lapas (antras lapas po vėliavinio)

MgMFS1 – *Zymoseptoria tritici* genas koduojantis toksinų, metabolitų bei fungicidų išstūmimo siurblius

MOA – fungicido veikimo būdas (santrumpa iš *Mode of Action*)

PGR – polimerazės grandininė reakcija

SD – standartinis nuokrypis

SDHI – sukcinato dehidrogenazės inhibitoriai, karboksamidų grupė

SE – Standartinė paklaida

STB – **S**eptoria **T**riticum **B**lotch

TGM – tūkstančio grūdų masė (angliškai *TGW* – *thousand grain weight*)

QoI – chinono (ubikvinono) išoriniai inhibitoriai, strobilurinų grupė

QiI – chinono (ubikvinono) vidiniai inhibitoriai, pikolinamidų grupė

IVADAS

Kviečių pasėliuose plintanti lapų septoriozė (lytinė stadija *Mycosphaerella graminicola*, nelytinė stadija *Zymoseptoria tritici*) yra plačiausiai kviečių auginimo regionuose išplitusi lapų liga (Dean et al., 2012). Lauko ir laboratoriniai tyrimai susiję su lapų septoriozės sukėlėjo daroma žala, epidemiologija ir efektyvių prevencinių priemonių paieška atliekami daugelį metų, tačiau vis vien ši liga priskiriama prie ekonomiškai žalingiausių. Pažeistuose pasėliuose, ypač kai infekcija yra smarkiai išplitusi ant viršutinių lapų, netenkama apie 30–40 proc. derliaus (Lovell et al., 2002; Lovell et al., 2004; Jørgensen et al., 2014; Rodrigo et al., 2015; Matzen et al., 2019).

Oro ir aplinkos sąlygos yra vieni svarbiausių veiksnių grybinių ligų sukėlėjų vystymosi procese, todėl ir klimato pokyčiai gali turėti įtakos daugelio grybų sukeltamų ligų paplitimui ir intensyvumui (Lucas, 2017). Vokietijoje atliktų tyrimų (1996–2021 laikotarpiu) metu nustatyta, kad per 25 metus pastebėtas esminis lapų septoriozės intensyvumo padidėjimas, ir pasiekta išvada, kad klimato kaita turi įtakos šios ligos dinamikai (Prahl et al., 2023). Tuo tarpu pietinėse Europos šalyse nustatyta, kad dėl klimato kaitos grybo *Z. tritici* intensyvumas turėtų mažėti vidutiniškai 3-6 proc., tačiau dėl skirtingų konkretaus regiono vietos meteorologinių sąlygų, reljefo, vyraujančios augalijos ir kitų veiksnių tampa sudėtinga ekstrapoliuoti gautus tyrimų rezultatus tarp skirtingų regionų (Gouache et al., 2013). Remiantis ilgalaikiais klimato kaitos duomenimis, Lietuvoje kritulių kiekis ir lietingų dienų skaičius didėjo (<http://www.meteo.lt/lt/klimato-kaita>), todėl tikėtina, kad būtent dėl besikeičiančio klimato, Lietuvoje per pastaruosius dešimtmečius *Z. tritici* tapo vyraujančia kviečių liga (Gaurilčikienė and Ramanauskienė, 2011). Daugelyje šalių vykdytų tyrimų duomenimis *Z. tritici* pirminė infekcija įvyksta rudenį, pasklidus lytinėms sukėlėjo sporoms (Suffert and Sache, 2011; Duvivier et al., 2013; Siah et al., 2018). Lietuvoje tokie tyrimai nebuvo vykdomi ir informacijos apie vitos klimato sąlygų įtaką askosporų formavimuisi ir jų patogenezėi nėra. Moksliniai tyrimai rodo, kad *Z. tritici* izoliatai skiriasi savo patogeniškumu (Ūnal et al., 2017). Tai reiškia, kad patogeno inkubacinio ir latentinio periodo trukmė, priklausomai nuo oro ir aplinkos sąlygų gali skirtis. Atsižvelgiant į visus minėtus veiksnius lapų septoriozės kontrolės optimizavimas išlieka viena iš pagrindinių *Z. tritici* tyrimų temų. Kadangi pagrindinis lapų septoriozės kontrolės būdas yra dažnas fungicidų naudojimas, atsiranda rizika patogeno atsparumo fungicidams išsivystymui. Pasaulyje jau nustatyta nemažai atvejų, kuomet dėl dažno fungicidų su tomis pačiomis veikliosiomis medžiagomis naudojimo sumažėja jų efektyvumas (Cheval et al., 2017; Heick et al., 2017; Blake et al., 2018; Jørgensen et al., 2018; Hellin et al., 2020), kadangi dėl intensyvaus jų naudojimo padidėja mutacijų, lemiančių atsparumą fungicidams,

atsiradimo patogeno genome tikimybė (Taylor and Cunniffe, 2023; Vestergård et al., 2023). Tačiau Lietuvoje tokių tyrimų atlikta palyginti mažai ir jie yra gana fragmentiški. A. Ronis et al. (2014) 2009 – 2011 metais atliko fungicidų atsparumo tyrimus su triazolų grupės fungicidais epoksikonazolu, ciprokonazolu bei protiokonazolu. Kiek vėliau izoliatus iš Lietuvos tyrė Danijos (Wieczorek et al., 2015; Heick et al., 2017) ir Estijos (Mäe et al., 2020) mokslininkai. Tačiau dalis anksčiau ištirtų veikliųjų medžiagų jau prarado efektyvumą arba jų nebegalima naudoti Lietuvoje. Taip pat dėl greito patogeno adaptavimosi prie fungicidų (Bir et al., 2021) ir vis naujų fungicidų veikliųjų medžiagų kūrimo reikalingas nuolatinis *Z. tritici* atsparumo fungicidams situacijos monitoringas. Siekiant sulėtinti atsparumo vystymosi tempus labai svarbu pasirinkti tinkamas agrotechnines priemones, veiksmingus fungicidus bei optimaliausią jų panaudojimo laiką atsižvelgiant į vyraujančias klimatinės sąlygas (Corkley et al., 2022).

Tyrimo hipotezė

Tikėtina, kad Lietuvoje, pradinis lapų septoriozės infekcijos šaltinis yra lytinės sporos (askosporos), besiformuojančios ant po derliaus nuėmimo likusių augalų liekanų rudens laikotarpiu arba pavasarį, o ligos plitimo mastai priklauso nuo oro sąlygų, augalo atsako į infekciją bei pasirinktos kontrolės strategijos, kurios efektyvumą gali nulemti kintantis grybo *Z. tritici* atsparumas fungicidams.

Tyrimo tikslas

Nustatyti *Z. tritici* askosporų sklidimo pikus ir įvertinti jų įtaką lapų septoriozės išplitimui kviečių pasėliuose; įvertinti izoliatų, surinktų įvairiuose Lietuvos regionuose, patogeniškumą, atsparumą fungicidams bei optimizuoti apsaugos priemonių panaudojimo laiką skirtingos infekcijos sąlygomis.

Tyrimo uždaviniai:

1. Fiksuoti *Z. tritici* askosporų plitimo pradžią ir plitimo pikus bei įvertinti jų sklidimo intensyvumo įtaką infekcijai skirtingų rotacijų sėjomainose, nustatyti koreliacinį ryšį tarp *Z. tritici* DNR kiekio ir lapų septoriozės intensyvumo.
2. Optimizuoti lapų septoriozės kontrolę kviečiuose.
3. Atlikti grybo izoliatų surinktų įvairiuose Lietuvos regionuose patogeniškumo testą.
4. Nustatyti grybo *Z. tritici* izoliatų atsparumą skirtingų grupių fungicidams.

Disertacijos ginamieji teiginiai

1. Oru plintančios lytinės *Z. tritici* askosporos (*M. graminicola*) Lietuvoje gali būti ne tik kaip pirminio užkrato šaltinis rudenį, bet ir kaip potencialus antrinis užkrato šaltinis pavasarį atsinaujinus augalų vegetacijai.
2. Efektyvesnė lapų septoriozės kontrolė pasiekama fungicidus panaudojant remiantis kritulių fiksavimu.
3. Lietuvos *Z. tritici* izoliatų patogeniškumas skiriasi priklausomai nuo infekuotos žieminių kviečių veislės bei izoliato paėmimo vietos.
4. Lietuvos *Z. tritici* populiacija turi padidėjusį atsparumą strobilurinių (QoI) ir triazolų (DMI) grupės fungicidų veikliosioms medžiagoms.

Mokslinio darbo aktualumas

Lapų septoriozės sukėlėjo plitimas labai priklauso nuo konkretaus regiono klimatinio sąlygų. Mokslininkai teigia, kad dėl klimato pokyčių lapų septoriozė ateityje gali tapti dar rimtesne problema kviečių augintojams (Prah et al., 2023). Todėl svarbu ištirti patogeno *Zymoseptoria tritici* epidemiologiją klimato kaitos kontekste. Kita didelė problema yra intensyvus fungicidų naudojimas lapų septoriozės kontrolei, dėl kurio patogenas tampa vis atsparesnis kai kurioms fungicidų veikliosioms medžiagoms (Taylor and Cunniffe, 2023). Pastaruoju metu stengiamasi sumažinti pesticidų, o tarp jų ir fungicidų, naudojimą. Europos Komisija skatina iki 2030 metų bendrą cheminių pesticidų naudojimą sumažinti 50 proc. (European Commission, 2023). Siekiant sumažinti fungicidų naudojimą būtina nustatyti ne tik optimaliausią fungicidų panaudojimo laiką, bet ir ištirti jų veiksmingumą bei padidėjusio atsparumo išsivystymo rizikos spartėjimą regione.

Darbo naujumas

Šių tyrimų metu nustatyta, kad *Zymoseptoria tritici* askosporos yra lapų septoriozės pirminio užkrato šaltinis rudenį, o pavasarį gali būti kaip antrinės infekcijos šaltinis. Nustatyta, kad efektyviam infekcijos plitimo stabdymui naudojat fungicidus, labai svarbu pasirinkti tinkamą jų panaudojimo laiką, atliekant kompleksinį rizikos faktorių įvertinimą, didžiausią dėmesį teikiant vietos meteorologinėms sąlygoms. Atlikus atsparumo fungicidams tyrimus, nustatyta, kad Lietuvos *Z. tritici* populiacija turi padidėjusį atsparumą strobilurinių bei triazolų cheminių grupių fungicidams.

Darbo praktinė reikšmė

Fungicidų panaudojimo laiko bei patogeno *Z. tritici* atsparumo fungicidams tyrimų rezultatai padės ūkininkams efektyviau kontroliuoti kviečių lapų septoriozę, teisingai pasirenkant veiksmingus augalų apsaugos produktus bei jų panaudojimo laiką, neapeinant kenksmingųjų organizmų kontrolės principų. Ateities tyrimams šie rezultatai bus pradinis taškas atliekant tolimesnį patogeno atsparumo fungicidams monitoringą.

Tyrimo rezultatų aprobavimas

Disertacinio darbo tema paskelbti 2 moksliniai straipsniai, leidiniuose turinčiuose citavimo indeksą. Tyrimų rezultatai taip pat paskelbti 4 Lietuvos ir tarptautinėse konferencijose, bei 4 konferencijų santraukų leidiniuose. Pagal tyrimų rezultatus parengtos 2 rekomendacijos žemės ūkiui.

Disertacijos turinys ir apimtis

Disertacija parašyta lietuvių kalba. Disertacijos apimtis – 135 puslapiai. Ją sudaro santrauka, įvadas, literatūros analizė, tyrimo metodai, tyrimo rezultatai ir jų aptarimas, išvados, publikacijų sąrašas ir publikacijų kopijos. Disertacijoje pateikta 16 lentelių ir 28 paveikslai. Panaudoti 199 literatūros šaltiniai. Dalis disertacijoje naudojamų duomenų yra paimti iš doktorantės Karolinos Lavrukaitės straipsnių : „Verikaitė K., Ramanauskienė J., Armonienė R., Ronis A. 2022. Evaluation of fungicide application programmes for Septoria tritici blotch control in winter wheat. Zemdirbyste-Agriculture 109, Nr. 2.“ bei „Lavrukaitė K., Heick T. M., Ramanauskienė J., Armonienė R., Ronis A. 2023. Fungicide Sensitivity Levels in the Lithuanian *Zymoseptoria tritici* Population in 2021. Front. Plant Sci.

1. LITERATŪROS ANALIZĖ

1.1. Žieminiai kviečiai ir pagrindinės jų ligos

Kviečiai yra labiausiai Europoje paplitę migliniai javai, kurių nuo bendro kviečių derliaus maždaug vienas trečdalis tenka žmonių maisto poreikiams tenkinti, o likę du trečdaliai sunaudojami kaip pašaras gyvuliams, biokuro ir alkoholio gamybai (Fones and Gurr, 2015). Gausus auginamų žemės ūkio augalų derlius yra pagrindinė augalininkystės produkcijos gamintojų siekiamybė. Lietuvoje 2019–2022 metų laikotarpiu žieminiai kviečiai sudarė daugiau nei 60 % viso grūdinių augalų derliaus (Oficialiosios statistikos portalas, 2023). Abiotiniai aplinkos veiksniai, tokie kaip dirvožemio druskingumas, vandens ir maistingųjų medžiagų prieinamumas, taip pat biotiniai veiksniai, tokie kaip kenkėjai, patogenai ir piktžolės, kelia grėsmę žemės ūkio produkcijai (Oerke, 2006; Haggag, 2015; Savary et al., 2019). Visuose kviečius auginančiuose regionuose, viena pagrindinių priežasčių, lemiančių derliaus sumažėjimą bei jų produkcijos kokybę yra grybinių ligų išplitimas pasėliuose. Nustatyta, kad iš beveik 200 kviečius puolančių patogenų ir kenkėjų, net 50 yra laikomi ekonomiškai svarbiais dėl jų sukeliama pažeidimų (Singh et al., 2016). Lietuvos klimato sąlygomis žieminiam kviečiams grėsmę kelia daugelis per sėklą, dirvą ir oru plintančių ligų. Nekontrnuojant jų yra prarandama nuo 10,1 iki 28,1% žieminių kviečių derliaus pasauliniu lygiu ir iki 25 % šiaurės vakarų Europoje (Savary et al., 2019). Pagrindinės žieminių kviečių ligos yra lapų septoriozė (*Zymoseptoria tritici*), kviečių dryžligė (*Pyrenophora tritici repentis*), rūdys (*Puccinia striiformis*, *Puccinia triticina*) bei miltligė (*Blumeria graminis*). Varpų fuzariozė (*Fusarium* spp.) dėl mikotoksinų gamybos taip pat yra priskiriama prie svarbių ligų (Jørgensen et al., 2014). Šiuo metu pagrindinė žieminių kviečių lapų dėmėtligė Šiaurės ir Baltijos šalių regione yra *Zymoseptoria tritici* patogeno sukeliama lapų septoriozė, o pagrindinės vasarinių kviečių lapų dėmėtligės – septoriozė, kurią sukelia patogenas *Staganospora nodorum* (SNB) ir dryžligė (*Drechslera tritici repentis*). Nuo 1980 m. vidurio, kai lapų septoriozė tapo labiau paplitusia, SNB paplitimas didžiojoje jūrinės zonos (angliškai: Maritime Zone) dalyje sumažėjo žemiau vizualiai aptinkamo lygio. Šis pokytis siejamas su naudojamų veislių pokyčiais, taip pat su kitomis pasėlių auginimo praktikų ir aplinkos sąlygų pokyčiais (Shaw et al., 2008).

1.2. Lapų septoriozė ir patogenas *Zymoseptoria tritici*

Epidemiologija ir ligos ciklas

Zymoseptoria tritici (Desm.) Quaedvlieg and Crous (anksčiau *Septoria tritici*) priklauso aukšliagrybių (*Ascomycota*) skyriui, lokuloaskomicetų (*Dothideomycetes*) klasei, deivėtgrybiečių (*Dothideales*) eilei, *Mycosphaerella* genčiai. Šis patogenas turi nelytinę (*Z. tritici*) ir lytinę formas (*Mycosphaerella graminicola*). Patogenas išsiskiria dėl į mieles panašaus

augimo ant mitybinės terpės, būtent dėl šios savybės suteiktas pavadinimas *Zymoseptoria* (*Zymo* = į mielių panašus augimas; *Septoria* = morfologiškai panašūs į *Septoria* gentį) (Quaedvlieg et al., 2011). *Z. tritici* sukelia kviečių lapų septoriozę, kuri yra viena iš daugiausiai nuostolių lemiančių kviečių ligų pasaulyje. Daugiausia nuostolių ši liga sukelia regionuose, kuriuose vyrauja drėgni vidutinių temperatūrų orai (Rudd et al., 2015; Torriani et al., 2015). Temperatūra ir drėgmė yra pagrindiniai veiksniai įtakojantys lapų septoriozės plitimą, palankiausios sąlygos ligai plisti yra kai vyrauja drėgni orai, o temperatūra yra tarp 17 ir 25 °C (Beyer et al., 2012). Dėl to liga daugiausiai žalos padaro Europos Augalų Apsaugos Organizacijos (EAAO) išskiriamoje jūrinėje zonoje, į kurią įeina Šiaurinė Prancūzija, Vokietija bei Jungtinė Karalystė (Holmes and Colhoun, 1974; Bouma, 2005; Fones and Gurr, 2015; Goodwin, 2019).

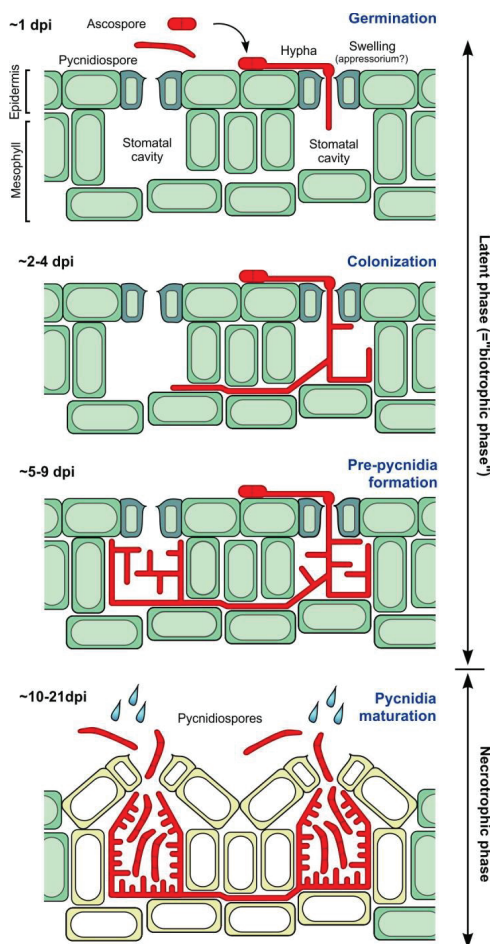


1 paveikslas. Lapų septoriozės sukėlėjo *Z. tritici* patogenezės ciklai. Pakoreguotas paveikslas iš Ponomarenko et al., 2011

Figure 1. Life cycle of septoria tritici blotch (STB) caused by *Zymoseptoria tritici*. With corrections from Ponomarenko et al., 2011

Išskiriami penki lapų septoriozės sukėlėjo patogenezės ciklai (Kema et al., 1996a; Dancer et al., 1999): 1) patogeno sudygimas ant lapo paviršiaus, lydimas hifų augimu; 2) patogeno skverbimasis tiesiogiai į lapo audinius per atsivėrusias žioteles arba netiesiogiai apresorijų pagalba; 3) pradinė micelio augimo fazė gyvo lapo mezofilio tarpuląščiuose; 4) pereinamoji

fazė, lydima masiniu lapo ląstelių apmirimu, kai patogenas iš biotrofo virsta hemibiotrofu; 5) piknidžių ir piknosporų formavimasis (1 paveikslas). Infekcija prasideda (2 paveikslas), kai *Z. tritici* sporos (askosporos arba piknidiosporos) sudygsa ant lapo paviršiaus ir hifais įsiskverbia į lapą per žioteles (Orton et al., 2011; Rudd et al., 2015). Po įsiskverbimo seka 8-21 dienų trunkantis latentinis periodas. Latentinio periodo trukmė priklauso nuo žieminių kviečių veislės ir *Z. tritici* padermių kombinacijos bei aplinkos veiksnių (Keon et al., 2005; Keon et al., 2007; Rudd et al., 2015). Lapų septoriozės inkubacinis periodas neturi jokių simptomų, jo metu grybas lėtai auga lapo mezofilio tarpuląsčiuose. Būtent dėl šio besimptomio periodo *Z. tritici* yra priskiriamas prie hemibiotrofų (Keon et al., 2007; Brunner et al., 2013).



2 paveikslas. *Z. tritici* infekcijos procesas lape (Steinberg, 2015)

Figure 2. The process of infection of the leaf by *Zymoseptoria tritici* (Steinberg, 2015)

Po šios besimptomės stadijos pažeisto lapo mezofilis suyra ir išryškėja ligos simptomai, t. y. atsiranda vandeningos, iššviesėjusios netaisyklingo stačiakampio formos dėmės. Ligai progresuojant šios dėmės virsta nekrotinėmis dėmėmis (3 paveikslas) ir jose susiformuoja nelytinio dauginimosi struktūros – tamsiai rudi piknidžiai (Orton et al., 2011; O’Driscoll et al., 2014; Steinberg, 2015). Piknidžiuose subręsta nelytinės sporos – piknosporos, kurios nuo lapo paviršiaus lietaus lašų pagalba yra pernešamos augalų lapija aukštyn bei ant aplinkinių augalų (Shaw, 2008; Steinberg, 2015). Piknosporos yra laikomos pagrindiniu antrinės infekcijos šaltiniu (Suffert et al., 2011).



3 paveikslas. Žieminio kviečio lapas pažeistas lapų septoriozės (nuotrauka K. Lavrukaitės)

Figure 3. STB symptoms on winter wheat leaf

Kadangi piknosporų plitimas priklauso nuo lietaus, ligos plitimo pagreitis priklauso nuo kritulių kiekio. Piknosporų plitimui palankiausia kuomet per parą iškrenta 5-10 mm kritulių arba per dvi tris dienas iškrenta 10 mm kritulių su mažiausiai 1 mm kritulių per dieną (Thomas et al., 1989; Suffert et al., 2011). Nustatyta, jog lietūs gegužės ir birželio mėnesiais yra labai susiję su ligos intensyvumu (Wiik and Ewaldz, 2009; Beyer et al., 2012). Per žieminių kviečių augimo sezoną dėl palankių oro sąlygų gali įvykti kelios infekcijos, net ant to paties lapo, o tai paspartina ligos plitimą (Ponomarenko et al., 2011). Ant augalų liekanų esančiuose piknidžiuose sporos gali išlikti gyvybingos keletą mėnesių, todėl šiemis peržiemojus gali būti kaip papildomas užkrato šaltinis (Suffert and Sache, 2011; Suffert et al., 2011). Be to, neseniai aptiktos *Z. tritici* storasienės ramybės sporos, vadinamos chlamidosporomis (Sardinha-Francisco et al., 2019), papildoma patogeno gyvybinį ciklą nauju elementu, kuris taip pat gali prisidėti prie populiacijos

dydžio ir genetinės įvairovės palaikymo, nes užtikrina chlamidosporų sankaupas kviečiais apšėtame dirvožemyje ir ilgalaikį patogeno išlikimą tarp sėjomainų.

Pirminių lapų septoriozės infekcijos šaltiniu yra laikomos grybo lytinės sporos – askosporos. Rudenį jos yra išnešiojamos vėjo pagalba ir užkrečia žieminių kviečių daigus (Shaw and Royle, 1989; Eriksen and Munk, 2003). Šios sporos susidaro lytinės stadijos vaisiakūniuose – pseudoteciuose (Eyal et al., 1987; Suffert et al., 2011). Nors sezono metu randami ir reguliariai, pseudoteciai ant augalų dažniausiai aptinkami 30-55 dienomis vėliau nei piknidžiai. Jie išlieka gyvybingi ant senų lapų bei augalų liekanų ir taip pat gali būti vėlesnių infekcijų šaltiniu. Šiauriniame pusrutulyje pastebėtos tendencijos, jog yra fiksuojami du askosporų pasklidimo pikai: pirmasis vėlyvą rudenį, o antrasis auginimo sezono pabaigoje – vasaros gale (Hunter et al., 1999; Eriksen and Munk, 2003; Suffert et al., 2011). Nors askosporos yra laikomos pagrindiniu pirminės infekcijos šaltiniu rudenį, piknosporos taip pat gali veikti kaip pirminis užkratas, kai žieminiai kviečiai yra sėjami į ražieną (Brown et al., 1978; Shaw, 1987; Shaw and Royle, 1989; Eriksen and Munk, 2003). Nustatyta, jog lapų septoriozės sukėlėjo vystymasis iki pirmųjų ligos požymių pasirodymo, būna lėtesnis po infekcijos lytinėmis sporomis, negu nelytinėmis (Morais et al., 2015). Lytinė *Z. tritici* stadija pirmą kartą užfiksuota Naujojoje Zelandijoje 1972 metais (Sanderson, 1972). Vėliau aptikta ir Australijoje, Argentinoje, Jungtinėje karalystėje, Danijoje, Olandijoje, Prancūzijoje, Vokietijoje, Slovakijoje, taip pat kaimyninėje Lenkijoje (Brown, 1975; Scott et al., 1988; Verreet et al., 1990; Halama, 1996; Kema et al., 1996b; Glazek and Sikora, 1998; Cordo et al., 1999; Eriksen and Munk, 2003; Pastircak, 2005).

Tyrimais nustatyta, kad vienoje tipinėje lapų septoriozės dėmėje ant lapo gali būtų keletas *Z. tritici* padermių, taip populiacijos įvairovė viename lauke padidėja (Linde et al., 2002). Todėl tikėtina, kad kelių skirtingų padermių buvimas ant lapo sukelia tam tikrą konkurenciją. Tai gali paskatinti naujų padermių atsiradimą dėl natūralios atrankos, pvz. tokių, kurios turi padidėjusį atsparumą fungicidams ar virulentiškumą šeimininko atsparumo genams (McDonald and Mundt, 2016).

1.3. *Z. tritici* agresyvumas (patogeniškumo komponentai)

Yra žinoma, kad ligos intensyvumas gali svyruoti ne tik dėl klimato sąlygų, bet ir dėl vietinių *Z. tritici* populiacijų skirtumų (Vagndorf et al., 2019). Didelė *Z. tritici* populiacijos variacija taip pat buvo pastebėta kitų tyrėjų (Schneider et al., 2001; Zhan et al., 2003; Banke et al., 2004; Razavi and Hughes 2004; Berraies et al., 2013; McDonald et al., 2022). Aukštas *Z. tritici* lytinės rekombinacijos lygis lemia didelę genetinę variaciją populiacijose (El Chartouni et al., 2011; Berraies et al., 2013). Atlikta daug mokslinių tyrimų, kuriais įrodyta, kad *Zymoseptoria tritici* izoliatai skiriasi savo patogeniškumu (Van Ginkel and Sharen, 1988; Linde

et al., 2002; Razavi, 2003; Zhan et al., 2003; McDonald et al., 2015; Ünal et al., 2017). Patogeniškumas – tai patogeno gebėjimas užkrėsti augalų audinius ir ne tik pakenkti augalui šeiminkui, bet ir toliau platinti ligą. *Z. tritici* patogeniškumas turi kokybinius bei kiekybinius komponentus (Zhan et al., 2007; Stewart and McDonald, 2014; Stewart et al., 2017). Kokybinis komponentas yra virulentiškumas, kurį nulemia patogeno genome esantys *Avr* genai ir juos atitinkantys *Stb* genai kviečiuose (Brown et al., 2015; Zhong et al., 2017; Kema et al., 2018; Saintenac et al., 2018). Tuo tarpu, kiekybinis komponentas yra patogeno agresyvumas. Virulentiškumas apibrėžiamas kaip patogeno gebėjimas užkrėsti augalą šeiminką, o agresyvumas – kaip patogeno sukeltos žalos augalui šeiminkui intensyvumas. Agresyvumas dažniausiai išreiškiamas biologinėmis funkcijomis tokiais kaip infekcijos smarkumas, pažeidimo (dėmės) dydis, sporuliacijos intensyvumas, latentinio periodo trukmė. Latentinis periodas dažniausiai išreiškiamas intervalu nuo infekcijos pradžios iki grybo sporuliacijos pradžios (Pariaud et al., 2009). Lapų septoriozės latentinio periodo trukmė skaičiuojama nuo infekcijos pradžios iki pirmųjų piknidžių susiformavimo (Shearer and Zadoks, 1972). Esant optimalioms oro sąlygoms, agresyvesnio patogeno latentinis periodas trunka iki 14 dienų, tuo tarpu mažiau patogeniško gali užtrukti ir 28 dienas. Ankstesnių tyrimų metu nustatyta, kad patogeno izoliatai paimti nuo jautresnių veislių turėjo trumpesnę latentinį laikotarpį nei tų nuo atsparesnių veislių (Viljanen-Rollinson et al., 2005). Latentinio periodo trukmei įtakos taip pat gali turėti augalų tarpsnis ir augalo lapo amžius (Suffert and Thompson, 2018). Morais et al. (2015) tyrimo rezultatai rodo, kad vidutinė latentinio periodo trukmė epidemijos pradžioje (rudenį), kai pirmuosius pažeidimus dažniausiai sukelia vėjo paskleistos askosporos (Suffert et al., 2011), yra ilgesnė nei pavasario epidemijos stadijoje, kai antrines infekcijas sukelia lietaus porslų pakeltos piknidiosporos.

1.4. Lapų septoriozės kontrolės būdai

1.4.1. Integruota kenksmingų organizmų kontrolė

Lapų septoriozės kontrolei gali būti pasitelkiami įvairūs metodai tokie kaip: sėjomainos laikymasis, optimali žemės dirbimo technologija, optimalus sėjos laikas bei norma, subalansuotas tręšimas, atsparios žieminių kviečių veislės bei cheminės kontrolės priemonės (Jørgensen et al., 2014). Būtent šių metodų derinimas yra pagrindinis integruotosios kenksmingų organizmų kontrolės (IKOK) principas, kuris pirmenybę teikia necheminėms augalų apsaugos priemonėms (FAO, 2022). Pagrindinė IKOK idėja – užtikrinti veiksmingesnę kontrolę, bet su mažesne priklausomybe nuo vienos strategijos, ypač nuo cheminių priemonių (Barzman et al., 2015). IKOK metodų naudojimas, derinant biologines ir chemines kontrolės priemones, yra būtinas siekiant užtikrinti tvarų ligų valdymą (Lamichhane et al., 2016). Vienas iš pagrindinių

agrotechninių priemonių ligų kontrolei yra augalų sėjomainos laikymasis. Sėjomainos padeda pagerinti dirvožemio struktūrą bei mitybinių elementų balansą, taip pat sumažina užkrato iš dirvos tikimybę. Veiksminga sėjomaina ir žemės dirbimas visuose regionuose yra svarbūs siekiant užkirsti kelią užkrato plitimui iš kviečių liekanų (Jørgensen et al., 2014). Pastaruoju metu vis dažniau taikoma beariminė žemės dirbimo technologija, kai augalai yra sėjami į neartą dirvą, nors tai ir turi teigiamos įtakos dirvos būklei bei yra ekonomiškai naudinga, tačiau lapų septoriozės prevencijai šis žemės dirbimo būdas nėra tinkamas, kadangi kaip jau buvo minėta vienas iš užkrato šaltinių yra augalų likučiai ir ražiena (Suffert et al., 2011). Beariminė žemės dirbimo technologija gali padidinti ankstyvos (rugsėjo-balandžio laikotarpiu) pirminės infekcijos tikimybę, ypač esant palankioms oro sąlygoms (Duvivier et al., 2013). Kitų tyrėjų duomenimis žemės dirbimas, sėjomaina ar kviečių likučiai neturėjo esminės įtakos infekcijos ankstumui ar intensyvumui (Eriksen and Munk, 2003; Morais et al., 2016;). Nustatyta, jog didžiausią įtaką infekcijos ankstyvumui turi sėjos laiko ankstinimas (Suffert and Sache, 2011; Morais et al., 2016). Jungtinėje Karalystėje Gladders et al. (2001) atliktų tyrimų duomenimis sėjos vėlinimas esmingai mažino ligos išplitimo riziką, tačiau Lietuvos klimato sąlygomis pernelyg didelis sėjos vėlinimas gali pabloginti augalų peržiemojimą. Sėjos vėlinimas taip pat gali lemti kitų ligų išplitimo rizikos padidėjimą (Jørgensen et al., 2014). Be to, ligų epidemijoms įtakos gali turėti pasėlių tankumas bei azotinių trąšų kiekis, kuris gali veikti kaip kai kurių ligų, įskaitant kviečių lapų septoriozę, stimulatorius (Simón et al., 2003; Jørgensen et al., 2014). Subalansuotas tręšimas azoto trąšomis bei tinkamas sėklos normos parinkimas tiesiogiai veikia lapų septoriozės plitimą, kadangi abu gali lemti pasėlio lapijos tankumą, o tai gali paskatinti greitesnę *Z. tritici* sporų plitimą (Simón et al., 2003; Baccar et al., 2011). Tačiau yra pastebėtas ir atvirkštinis ryšys tarp pasėlio tankumo bei ligos plitimo intensyvumo, kai retesnis pasėlis lėmė didesnę sporų sklaidą dėl geresnio lietaus lašų praeinamumo (Eyal, 1981; Bjerre et al., 2006).

Atsparių veislių auginimas taip pat turi didelę reikšmę lapų septoriozės infekcijos kontrolėje. Atsparumas *Z. tritici* yra pasiekiamas identifikuojant ir kuriant veisles su atsparumo genais *Stb* ir jų kombinacijomis, kurie slopina infekciją ir tolesnę patogeno kolonizaciją (Brown et al., 2015). Augalų atsparumas lapų septoriozei gali būti pagrįstas vieno geno atsparumu, tačiau dažnai jį kontroliuoja daug lokusų, kurių kiekvienas turi nedidelį efektą, t. y. poligeninis atsparumas (Miedaner et al., 2013). Šiuo metu žieminiuose kviečiuose yra identifiukuoti 25 genai lemiantys atsparumą lapų septoriozei (Riaz et al., 2020). Tiesa, siekiant sukurti ligoms atsparias veisles galima netekti kitų savybių ir tai gali lemti mažesnę derliaus potencialą (Brown, 2002; Brown et al., 2015). Kitas kviečių veislių selekcijos rezultatas yra skirtingi augalų morfologijos vystymosi ypatumai, tokie kaip padidėjęs atstumas tarp lapų, kurie taip pat gali lemti ligos išvengimą. Būtent šis ypatumas gali sumažinti sporų plitimo greitį pasėlyje, o vėlesnis lapų

pasirodymas sutrumpina laiką, per kurį lapas yra veikiamas infekcijos (Simón et al., 2004; Arraiano et al., 2009). Pastaruoju metu mokslininkų dėmesys yra nukreiptas ir į veislių mišinių naudojimą siekiant sumažinti patogenų sporų plitimą tarp jautrių veislių augalų. Šis metodas yra pagrįstas jautresnių ir atsparesnių veislių mišinių auginimu viename pasėlyje, tačiau taip pat atsižvelgiant ir į morfologinius veislių ypatumus (Vidal et al., 2017). Nustatyta, jog auginant atsparių ir jautrių veislių mišinius santykiu 3:1, yra mažesnis infekcijos pernešimo ant jautresnių veislių lygis (Gigot et al., 2013). Kviečių veislių mišiniai gali lemti mažesnę ligų plitimą bei minimizuoti patiriamus grūdų derliaus nuostolius (Cowger and Mund, 2002; Ben M'Barek et al., 2020; Kristoffersen et al., 2021). Veislių mišinių auginimas gali ne tik sumažinti ligų intensyvumą, bet ir virulentiškumo vystymąsi (Leonard, 1969; Gigot et al., 2013; Orellana-Torrejon et al., 2022). Nepaisant galimo lapų septoriozės infekcijos išvengimo, netinkamai pasirinktos technologinės priemonės taip pat gali būti sumažėjusio derliaus priežastimi, todėl ūkininkai dažnai yra linkę rinktis chemines ligos kontrolės priemones (Jørgensen et al., 2014; O'Driscoll et al., 2014).

1.4.2. Cheminė kontrolė (fungicidų grupės)

Nors lapų septoriozės kontrolei dažnai pasitelkiamas genetinis atsparumas, vis tik fungicidų naudojimas išlieka pagrindiniu ligos kontrolės metodu (Fones and Gurr, 2015; Torriani et al., 2015). Nustatyta, jog Europos Sąjungoje maždaug 70 % iš visų kviečių priežiūrai sunaudojamų fungicidų yra skiriama lapų septoriozės kontrolei (O'Driscoll et al., 2014; Torriani et al., 2015). Fungicidai gali būti skirstomi pagal cheminę struktūrą ir vadinamąjį veikimo būdą (MOA). MOA reiškia grybo biocheminį procesą, kurį fungicidas paveikia arba sutrikdo (FRAC, 2022). Europoje lapų septoriozės kontrolei yra naudojami keturių cheminių klasių fungicidai, tai yra kontaktiniai fungicidai, strobiluriniai (QoI), karboksamidai (sukcinato dehidrogenazės inhibitoriai (SDHI)) bei triazolai (demetilavimo inhibitoriai (DMI)) (Heick et al., 2017; Jørgensen et al., 2018; Kildea et al., 2019). Kontaktinių fungicidų lapų septoriozės kontrolei šiuo metu Lietuvoje nėra registruota. Likusių trijų klasių fungicidai yra plačiai naudojami Lietuvos ūkininkų, mišiniuose ir pavieniui.

Biocheminis strobilurinių (QoI) veikimo būdas yra elektronų transportavimo grandinės slopinimas mitochondrinio kvėpavimo III komplekse (bc1 komplekse). Fungicidai veikia citochromo bc1 komplekso chinono (ubikvino) „išorinėje“ (Qo) surišimo vietoje (FRAC, 2022). Taip užkertamas kelias grybų sporų dygimui, micelio augimui ir visam infekcijos vystymuisi (Becker et al., 1981). Strobiluriniai veikia prieš įvairius patogenus aukšliagybius, oomicetus (*Oomycetes*), papėdgrybius (*Basidiomycetes*) (Oliver and Hewitt, 2014; Lucas et al., 2015). Azoksistrobinas buvo vienas iš pirmųjų sintetinių strobilurinių klasės fungicidų (Godwin

et al., 1992). Lietuvoje šio tipo fungicidai pradėti naudoti nuo 2000 metų (Gaurilčikienė et al., 2010). Šiuo metu Lietuvoje, lapų septoriozės kontrolei, pavieniui ar mišiniuose, yra registruoti šie strobilurinių klasės fungicidai: azoksistrobinas, piraklostrobinas, trifloksistrobinas bei fluoksastrobinas (VATŽUM, 2023). Be šios grupės yra dar dvi, kurių veikimas yra orientuotas skirtingose citochromo b vietose (elektronų transportavimo grandinės III kompleksas) (FRAC, 2022). Pikolinamidų (QiI) grupės fungicidai veikia citochromo b chinono (ubikvino) „vidinėje“ (Qi) surišimo vietoje ir yra ganėtinai nauja grupė (Owen et al., 2017). Lapų septoriozės kontrolei skirtas fungicidas fenpikoksamidus buvo įregistruotas Lietuvoje 2023 metais, tačiau kai kuriose Europos valstybėse jau naudojamas nuo 2019 metų (Corteva, 2021). Tai yra pirmasis QiI grupės fungicidas, veikiantis aukšliagybius bei suteikiantis naują veikimo būdą *Z. tritici* ir kitų ligų kontrolei javų rinkoje (Owen et al., 2017).

Karboksamidų grupės fungicidai stabdo baltymo sukcinato dehidrogenazės (SDH, taip pat žinomos kaip II kompleksas mitochondriniame kvėpavime) susidarymą, neleisdami gamintis energijai ir išskirdami aktyvų deguonį, taip stabdydami kitų svarbių ląstelės dalių cheminę sintezę (Hägerhäll, 1997; Oliver and Hewitt, 2014). Pirmosios šios grupės fungicidų veikliosios medžiagos sukurtos dar šeštajame praėjusio šimtmečio dešimtmetyje (von Schmeling and Kulka, 1966; Oliver and Hewitt, 2014), tačiau jų ir kitų iki devintojo dešimtmečio sukurtų šios grupės medžiagų veikimas apsiribojo papėdgybiais (Glättli et al., 2011). 2002 metais išleistas boskalidas buvo pirmasis karboksamidų grupės fungicidas veiksmingas ne tik prieš papėdgybius, bet ir prieš aukšliagybius (Stammler et al., 2008a; Glättli et al., 2011). Nuo to laiko buvo išleisti dar keli šios grupės fungicidai septoriozės kontrolei (Glättli et al., 2011; Stammler et al., 2015), o Lietuvoje šiuo metu yra registruoti šie karboksamidų grupės fungicidai: boskalidas, biksafenas, izopiramas, fluopiramas, benzovindiflupiras bei fluksapiroksadas (VATŽUM, 2023).

Pagal veikimo būdą triazolai yra demetilinimo inhibitoriai (DMI). Jie blokuoja ergosterolio biosintezę ir tokiu būdu sustabdo grybo ląstelių membranos augimą. Triazolai priklauso sterolių biosintezės inhibitorių klasei (SBI). Šiai klasei, be triazolų priklauso dar trys pogrupiai, tačiau jie nėra plačiai naudojami žemės ūkyje. SBI klasėje triazolai turi didžiausią fungicidinių medžiagų skaičių (FRAC, 2022). Per pastaruosius dešimtmečius triazolai buvo plačiausiai naudojami lapų septoriozės kontrolei (Parker et al., 2011; Cools and Fraaije, 2013). Pirmasis Lietuvoje užregistruotas triazolų grupės fungicidas buvo propikonazolas, jis rinką pasiekė praėjusio šimtmečio devintojo dešimtmečio viduryje. Šiuo metu registruoti keturi triazolai: protiokonazolas, metkonazolas, tebukonazolas ir mefentriflukonazolas (VATŽUM, 2023).

Tinkamų fungicidų ar jų mišinių parinkimas nėra vienintelis svarbus aspektas taikant cheminę kontrolę, savalaikis fungicidų panaudojimas taip pat turi didelę reikšmę. Stipri koreliacija tarp javų lapų ligų pažeidimo intensyvumo ir derliaus rodo, kad ankstyva infekcija lemia didesnius grūdų derliaus nuostolius, negu vėlyva. Tyrimų duomenimis, po fungicidų panaudojimo lapų septoriozės infekcija prasidėjo dviem savaitėmis vėliau, o derlius tuose laukeliuose buvo 12 % didesnis, negu nepurkštuose (Beyer et al., 2012). Visgi tikslus fungicidų panaudojimo laikas yra kompliktuotas, nes sudėtinga tiksliai nustatyti ligos eigą. Geriausias efektas pasiekiamas, kai jie panaudojami apie septintą latentinio periodo dieną (Marroni et al., 2006). Kadangi ant kviečių lapų latentinio periodo metu nesiformuoja vizualūs ligos požymiai, javų augintojai gali pamanyti, kad lapų septoriozės kontrolė efektyvi, tačiau iš tiesų liga nesustoja plitusi. Geroji augalų apsaugos praktika reikalauja, kad fungicidai būtų panaudoti preventyviai dar iki ligai pažeidžiant kviečius ir būtų apsaugoti naujai susiformavę lapai (Fones and Gurr, 2015). O jau esant vizualiems ligos požymiams ant kviečių lapų, fungicidų purškimas gali duoti tik minimalią naudą. Kadangi lapų septoriozės plitimas labai priklauso nuo meteorologinių sąlygų todėl pasirenkant fungicidų panaudojimo laiką svarbu atsižvelgti ir į jas (El Jarroudi et al., 2017). Taip pat nustatyta, kad ligos intensyvumas ant apatinių lapų pasirodžius L3 ir švelnios oro sąlygos tarp kviečių stiebo ilgėjimo ir žydėjimo vidurio turi lemiamos įtakos lapų septoriozės infekcijos eigai vėlesniu sezono laikotarpiu (El Jarroudi et al., 2022). Būtent dėl sudėtingo purškimo laiko nustatymo didelis dėmesys taip pat yra skiriamas sprendimų priėmimo sistemų kūrimui, kurios gali būti pasitelkiamos siekiant pagerinti ligų kontrolę bei pasirinkti tinkamiausią fungicidų panaudojimo laiką. Tokios sistemos dažniausiai yra paremtos meteorologinių sąlygų stebėjimais (įprastai: kritulių, santykinės oro drėgmės bei temperatūros) ir dažniausiai yra atskirtos pagal specifinį patogeną (Jørgensen et al., 2014; El Jarroudi et al., 2015; Jørgensen et al., 2020; Andersson et al., 2022). Netinkamas fungicidų purškimo laiko, purškimų skaičiaus ar fungicidų pasirinkimas lemia dar vieną, vis didesnę reikšmę turinčią, problemą, tai yra patogeno atsparumo fungicidams išsivystymas (van den Bosch et al., 2014; Heick et al., 2017).

1.5. Patogeno *Zymoseptoria tritici* atsparumas fungicidams

Evoliucija visuose organizmuose yra procesas, apimantis gebėjimą nuolat vystytis, kad prisitaikytų prie aplinkos pokyčių (Seidl and Thomma, 2014). Patogeno sugebėjimas įgyti atsparumą fungicidams yra puikus to pavyzdys. Intensyvus ilgalaikis vieno fungicido naudojimas lemia atsparumo tam fungicidui išsivystymą patogene. Fungicidų panaudojimas pašalina didžiąją dalį jautrios populiacijos, o atsparūs izoliatai išlieka ir gali tapti dominuojančiais esant nuolatiniam fungicidų veikimui (Ma and Michailides, 2005; Brent and Hollomon, 2007; Oliver and Hewitt, 2014; Lucas et al., 2015). Šis procesas vyksta intensyviau,

kai yra naudojami fungicidai, kurių veikimas yra nukreiptas į vieną geną bei kuomet patogenas turi trumpą ligos ciklą ir gausią sporuliaciją. Nustatyta, jog *Z. tritici* atsparumo išsivystymo fungicidams rizika yra vidutinė (Brent and Hollomon, 2007). Pastaruoju metu vis spartėjantis šio patogeno atsparumo fungicidams atsiradimas yra susijęs su mišria (lytine ir nelytine) reprodukcine sistema (Brunner et al., 2008). Ligos intensyvumas bei dažnas fungicidų naudojimas yra laikomi pagrindiniais mutacijų, susijusių su atsparumu fungicidams, vystymosi priežastimis (Jørgensen et al., 2018). Tyrėjai per pastarąjį dešimtmetį pranešė apie nustatytus atsparumo atvejus visų trijų anksčiau aprašytų grupių fungicidams, tačiau jų dažnis bei pasiskirstymas varijuoja visoje Europoje (Cools and Fraaije, 2013; Rehfus et al., 2018; Mäe et al., 2020; Jørgensen et al., 2022). Dėl skirtingo žieminių kviečių auginimo intensyvumo bei klimato sąlygų atsparumo fungicidams gradientas pastebimas iš vakarų į rytus (Wieczorek et al., 2015; Heick et al., 2017; Jørgensen et al., 2018; Garnault et al., 2019; Hellin et al., 2021; Kildea et al., 2022). Atsparesnės *Z. tritici* populiacijos, nustatytos Jungtinėje Karalystėje ir Airijoje, tuo tarpu Danijos ir Švedijos populiacijos turi vidutinį atsparumą, o populiacija Baltijos šalyse buvo jautriausia triazolų bei strobilurinių grupių fungicidams (Heick et al., 2017). Mažesnį atsparumo lygį Lietuvoje ir kitose Baltijos regiono šalyse lemia mažesni fungicidų naudojimo bei purškimų skaičiai lyginant su Vakarų Europos valstybėmis (Heick et al., 2017; Jørgensen et al., 2017). Tyrėjai daro prielaidas, kad geografiniai barjerai, tokie kaip Šiaurės ar Baltijos jūros, kliudo vėjo pagalba pernešamų askosporų sklidimui, taip sumažindami fungicidams atsparių *Z. tritici* padermių pernešimą į rytinę Europos dalį (Heick et al., 2017; Vagndorf et al., 2018). Pagrindinis atsparumą lemiantis mechanizmas augalų patogenuose yra mutacijų atsiradimas tikslinėse vietose (Ma and Michailides, 2005; Brent and Hollomon, 2007; Jørgensen et al., 2019). Tikslinė vieta reiškia konkretų ląstelinio proceso fermentą (arba fermentus), su kuriuo fungicidas sąveikauja (FRAC, 2022). Dažnai fungicidai skirstomi į žemos arba aukštos atsparumo rizikos grupes, atsižvelgiant į tai, ar populiacijoje esama atsparių patogenų padermių ir ar yra tikimybė, kad atsiras atsparumas, be kitų veiksnių (Brent and Hollomon, 2007). Žemos rizikos fungicidams yra priskiriami kontaktiniai fungicidai, tačiau šios grupės fungicidų lapų septoriozės kontrolei Lietuvoje nėra. Vienas iš šios grupės atstovų anksčiau naudotas lapų septoriozės kontrolei buvo chlorotalonilas, tačiau dėl toksiškumo aplinkai buvo uždraustas naudoti Europos Sąjungoje (EFSA, 2018; European Commission, 2019). Triazolai yra priskiriami prie vidutinės atsparumo rizikos grupės fungicidų, Karboksamidai yra priskiriami prie vidutinės ar aukštos atsparumo rizikos grupės fungicidų, o strobiluriniai yra priskiriami prie aukštos atsparumo rizikos grupės fungicidų (FRAC, 2022).

1.5.1. Atsparumas strobilurinių (QoI) grupės fungicidams

Mutacija G143A *cyt b* gene, dėl kurios glicinas pakeičiamas alaninu 143 citochromo b fermento padėtyje, nulemia *Z. tritici* atsparumo išsivystymą strobilurinių grupės fungicidams (Grasso, 2006; Torriani et al., 2009; Drabešová et al., 2013; Estep et al., 2013; Alloui et al., 2016). Patogeno izoliatai turintys šia mutaciją pasižymi labai dideliu atsparumu strobilurinių grupės fungicidams, lyginant su jautriais laukinio tipo izoliatais (Fraaije et al., 2003; Siah et al., 2010a; Siah et al., 2014). Nustatyta, kad G143A mutacija suteikia visišką atsparumą visoms šios grupės fungicidų veikliosioms medžiagoms (Bartlett et al., 2002; Jørgensen et al., 2017). Pirmieji atsparumo šiems fungicidams atvejai su minėtomis mutacijomis nustatyti dar 2002 metais Jungtinėje Karalystėje bei Airijoje (Fraaije et al., 2003). Šiaurės Amerikoje atsparumas strobiluriniams užfiksuotas gerokai vėliau lyginant su Europa, Estep et al. (2013) mutaciją G143A pirmą kartą nustatė 2012 metais. Tais pačiais metais ši mutacija taip pat pirmą kartą nustatyta Afrikoje, Alžyre (Alloui et al., 2016). Ši mutacija yra plačiai paplitusi Europoje, užfiksuoti atskiri šios mutacijos išplitimo atvejai skirtingose vietovėse (Torriani et al., 2009; Drabešová et al., 2013). Atskiruose regionuose yra išsivystęs pilnas atsparumas ir strobilurinių grupės fungicidai nėra rekomenduojami lapų septoriozės kontrolei (Lucas et al., 2015; Cheval et al., 2017; Heick et al., 2017). Tačiau Lietuvoje ir kitose Baltijos regiono šalyse strobiluriniai vis dar naudojami (Mäe et al., 2020).

Tuo tarpu anksčiau aprašytos QiI grupės fungicidas fenpikoksamidas nors ir yra visiškai nauja veiklioji medžiaga, tačiau jau yra identifikuota viena mutacija, kuri yra siejama su galimu veiksmingumo sumažėjimu šiam fungicidui. Ši mutacija taip pat yra aptinkama *cyt b* gene, kur glicinas yra pakeičiamas valinu 37 citochromo b fermento padėtyje (Fouche et al., 2021). Nors fenpikoksamidas kaip ir strobiluriniai veikia citochromo b komplekse, tačiau mutacija G143A siejama su atsparumu strobiluriniams, neveikia fenpikoksamido efektyvumo (Young et al., 2018; Fouche et al., 2021).

1.5.2. Atsparumas karboksamidų (SDHI) grupės fungicidams

Nors kiti tyrimai parodė gerą karboksamidų veiksmingumą prieš *Z. tritici* (Rehfus et al., 2018; Kiiker et al., 2021), per pastaruosius du dešimtmečius Vokietijoje buvo pastebėtas patogeno jautrumo sumažėjimas (Bir et al., 2021). Pirmasis atsparumo atvejis nustatytas 2012 metais (FRAC, 2022). Pastaruoju metu buvo aprašytos mutacijos, įtakojančios *Z. tritici* atsparumo išsivystymą karboksamidų fungicidams (Dooley et al., 2016; Rehfus et al., 2018). Šios mutacijos aptinkamos SDH fermento B, C ir D subvienetuose (Avenot and Michaelidis, 2010; Sierotzki, 2013; Stammler et al., 2015). FRAC duomenimis per pastaruosius metus nustatytos mutacijos, susijusios su atsparumu šiems fungicidams, tokios kaip B-T268I/A, B-

N225I, B-R265P, C-T168R, C-T79N/I, C-R151S/T/M, C-N86S/A, C-W80S, C-V166M, D-I50F, D-M114V ir C-H152R. Iširta, jog kai kurios mutacijos lemia aukštą atsparumo lygį, o kitos lemia tik nedidelį pokytį. Lauko stebėjimo (monitoringo) tyrimai iš įvairių Europos valstybių nustatė, jog dažniausiai aptinkamos mutacijos yra C-T79N ir C-N86S (Rehfus et al., 2018; FRAC, 2022). Tiesa, vakarų Europos tyrimų duomenimis nustatyta, kad būtent mutacija C-H152R lemia atsparumo padidėjimą visiems SDHI grupės fungicidams (Scalliet et al., 2012; Dooley et al., 2016; Gutiérrez-Alonso et al., 2017; Kirikyali et al., 2017; Hellin et al., 2020; Hellin et al., 2021).

1.5.3. Atsparumas triazolų (DMI) grupės fungicidams

Z. tritici atsparumo atsiradimą triazolų grupės fungicidams lemia ne tik jau aprašytas mutacijų atsiradimas, bet ir kiti du mechanizmai. Tai yra padidėjusi CYP51 geno raiška bei suintensyvėjęs membranos išmetimo siurblių aktyvumas (Leroux and Walker, 2011; Cools et al., 2012; Cools and Fraaije, 2013; Cools et al., 2013; Omrane et al., 2015). Išaugęs patogeno atsparumas triazolų grupės fungicidams užfiksuotas dar praėjusio šimtmečio devintajame dešimtmetyje (Cools and Fraaije, 2013). Tačiau fungicidų efektyvumo sumažėjimas lauko sąlygomis pastebėtas tik po beveik 15 metų. Pastaraisiais metais nustatytas suintensyvėjęs atsparumo triazolams augimas, varijuojantis tarp skirtingų veikliųjų medžiagų bei Europos šalių (Clark, 2006; Heick et al., 2017; Jørgensen et al., 2017b; Strobel et al., 2017; Blake et al., 2018; Jørgensen et al., 2018). Šiuo metu yra identifikuota daugiau nei 30 mutacijų bei delecijų įtakančių *Z. tritici* atsparumą triazolams. Europoje dažniausiai aptinkamos šios: L50S, D134G, V136A/C, S188N, A379G, I381V, Y459D, Y461N, N513K ir S524T bei Y459 ir G460 delecija (Stammler et al., 2008b; Cools and Fraaije, 2013). Šios mutacijos deriniuose arba atskirai lemia skirtingo lygio atsparumą atskiriems šios grupės fungicidams (Leroux et al., 2007; Cools and Fraaije, 2013; Lucas et al., 2015). *Z. tritici* izoliatai turintys skirtingus mutacijų derinius yra mėginti suskirstyti į haplotipus, vienas iš jų buvo skirstymas remiantis triazolų atsparumo tipais (Leroux et al., 2007; Leroux and Walker, 2011). Tačiau, dėl naujų mutacijų atsiradimo ši klasifikacija nėra tinkama naudoti, 2018 metais Huf et al. pasiūlė naują klasifikavimo būdą, kai haplotipai yra skiriami pagal mutacijų skaičių gene. Nomenklatūrą sudaro raidės ir skaičiaus kombinacija, raidė apibūdina CYP51 fermento aminorūgščių pakitimų skaičių, o skaičius – konkretų apibrėžto aminorūgščių pakitimų skaičiaus derinį. Huf et al. (2018) pateikė daugiau kaip 100 skirtingų haplotipų sąrašą sudarytą atsižvelgiant į įvairių tyrėjų duomenis (Leroux et al., 2007; Cools et al., 2011; Leroux and Walker, 2011; Lucas et al., 2013; Buitrago et al., 2014).

Antrasis atsparumo mechanizmas yra padidėjusi geno CYP51 raiška, pagrįsta koduojančio geno reguliavimu (Cools et al., 2012; FRAC, 2022). Padidėjusi geno CYP51 raiška atsiranda dėl intarpų geno promotoriaus *MgCYP51* regione (Cools et al., 2012; Omrane et al., 2015). Padidėjusi geno CYP51 raiška paveikia patogeno atsparumą visiems triazolams, tuo tarpu mutacijos ar jų deriniai lemia atsparumą atskiriems fungicidams (Cools et al., 2012; Cools and Fraaije, 2013). Nustatyta, kad 120 bazinių porų (bp) dydžio intarpas *Z. tritici MgCYP51* regione turi sąsają su atsparumu triazolams (Cools et al., 2012). Tuo tarpu labiau išplitęs 862 bp arba 866 bp dydžio intarpas pirmą kartą jį identifikavus buvo siejamas su nežymiu atsparumu ciprokonazolui (Chassot et al., 2008), tačiau vėlesni tyrimai parodė, kad jis neturėjo papildomos įtakos patogeno atsparumui fungicidams (Leroux and Walker, 2011; Omrane et al., 2015; Kildea et al., 2019).

Trečiasis patogeno atsparumo triazolams mechanizmas yra nulemiamas padidėjusio membranos išmetimo siurblių aktyvumo, dar vadinamas kryžminiu arba daugiavaisčiu atsparumu (angliškai – *multi-drug resistance* (MDR)) (de Waard et al., 2006; Coleman and Mylonakis, 2009; Hahn and Leroch, 2015). Šis mechanizmas yra paremtas tuo, jog dėl padidėjusio baltymo transporterio *MgMFS1* raiškos (Omrane et al., 2015, 2017), suaktyvėja membranos išmetimo siurbliai taip užkirsdami kelią toksiškų fungicido koncentracijų susikaupimui patogeno ląstelėje (de Waard et al., 2006; Hahn and Leroch, 2015). Kryžminio atsparumo pavadinimas yra priskirtas dėl vienu metu pastebėto *Z. tritici* atsparumo triazolams bei kai kuriems karboksamidams (Leroux and Walker, 2011). Šiuo metu yra identifikuoti trys intarpai *MgMFS1* gene, Omrane et al. (2017) metais pasiūlė jų klasifikaciją. I tipo intarpas yra 519 bp dydžio, II tipo intarpas – 338 ir 369 bp dydžio ir III intarpas – 150 bp dydžio. Nustatyta, jog I tipo intarpas lemia didžiausią baltymo transporterio *MgMFS1* raiškos padidėjimą (Omrane et al., 2015, 2017). Vakarų Europoje *Z. tritici* populiacijose daugėja padermių turinčių intarpus *MgMFS1* gene, dažniausiai aptinkamas 150 bp dydžio intarpas (Kildea et al., 2019).

Atsparumo vystymosi stebėjimas ir su tuo susiję tyrimai yra svarbūs siekiant įgyvendinti atitinkamas kontrolės strategijas lauke, taip pat siekiant užtikrinti stabilų pasėlių derlių ir kiek įmanoma labiau pailginti fungicidų veiksmingumą (Sierotzki and Scalliet, 2013; Grimmer et al., 2014; van den Bosch et al., 2014; Barrès et al., 2016). Be didėjančio atsparumo fungicidams, taip pat egzistuoja reguliavimo suvaržymai, dėl kurių mažėja produktų ir kontrolės pasirinkimo skaičius (Jess et al., 2014). Be to, fungicidų naudojimas yra brangus ir dažniausiai pavojingas aplinkai. Taip pat, pastaruoju metu iškeltas tikslas sumažinti pesticidų naudojimą tapo dar aktualesnis dėl naujosios Europos žaliojo kurso strategijos „Nuo lauko iki stalo“, kurioje Europos Komisija skatina imtis papildomų veiksmy, kad iki 2030 m. bendras cheminių pesticidų naudojimas būtų sumažintas 50 proc. (European Commission, 2023).

2. TYRIMO OBJEKTAS IR METODIKA

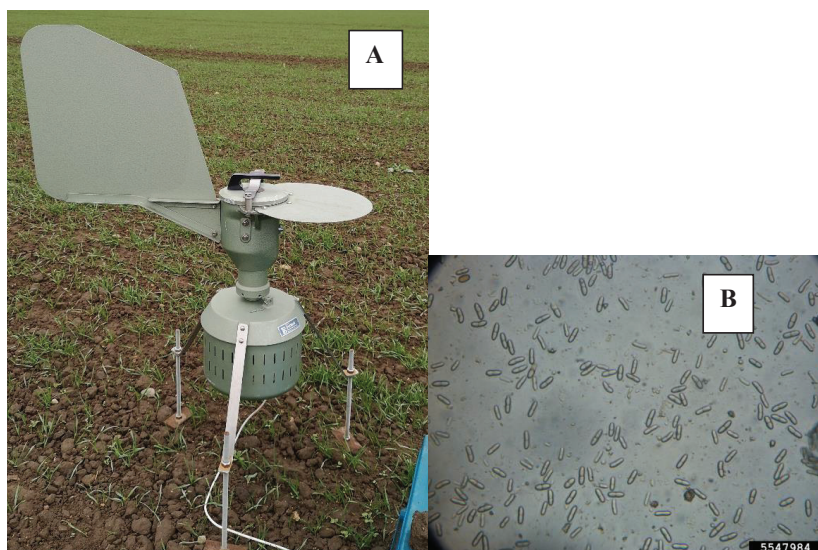
2.1. Tyrimo objektas ir vieta

Lauko eksperimentai buvo vykdomi 2018–2022 metais, Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro (LAMMC) Žemdirbystės instituto Augalų patologijos ir apsaugos skyriaus sėjomainoje, Akademijoje, Kėdainių rajone. Laboratoriniai eksperimentai atlikti LAMMC Žemdirbystės instituto Augalų patologijos ir apsaugos skyriaus laboratorijose. Vegetaciniai eksperimentai atlikti LAMMC Žemdirbystės instituto Genetikos ir fiziologijos laboratorijos šiltnamyje.

Tyrimų objektas – žieminių kviečių lapų septoriozės sukėlėjas *Zymoseptoria tritici* (lytinė forma *Mycosphaerella graminicola*).

2.2. Lapų septoriozės sukėlėjo *Z. tritici* plitimo tyrimai

Z. tritici lytinių sporų (*M. graminicola*) plitimo eksperimentų metu buvo fiksuojama oru plintančių *Z. tritici* askosporų plitimo pradžia bei plitimo pikai skirtingų rotacijų sėjomainose. Tyrimai buvo pradėti vykdyti 2018 metų rudenį ir baigti 2021 metų birželio pabaigoje. Lapų septoriozės sukėlėjo, askosporų kiekio nustatymui naudotos Burkard sporų gaudyklės (4 paveikslas), kurios buvo pastatytos žieminių kviečių pasėlyje po žieminių kviečių priešsėlio (monokultūros laukas nuo 2005 metų, su šiaudų likučiais) ir žieminių kviečių lauke po nemiglinių augalų priešsėlio (po žirnių, rapsų ir žirnių atitinkamai 2019, 2020 ir 2021 metais).



4 paveikslas. A – Burkard sporų gaudyklė (nuotrauka K. Lavrukaitės); B – *Z. tritici* lytinės sporos (askosporos *M. graminicola*) (<https://www.ipmimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=5547984>)

Figure 4. A – Burkard spore trap; B – *Z. tritici* sexual spores (*ascospores M. graminicola*)

Gaudyklės (kiekvienais metais po vieną gaudyklę viename lauke) buvo statomos iš rudens po javų sėjos iki pirmųjų šalčių (nuo spalio pradžios iki lapkričio vidurio) ir pavasario–vasaros mėnesiais (nuo kovo vidurio iki liepos pradžios). Prietaise, kuris veikia įkraunamų akumuliatorių pagalba, yra įmontuotas laikrodžio tipo mechanizmas su specialia vazelino tepalu (150 ml techninio vazelino, 18 g parafino, 10 g fenolio) padengta juostele. Per prietaise esančią angelę yra išsiurbiamas oras kartu su jame esančiomis grybų sporomis, kurios prilimpa prie juostelės. Viso tyrimo metu gaudymo angelė buvo 0,7 m aukštyje nuo žemės paviršiaus, kad išvengti vandens lašų pagalba plintančių sukėlėjo nelytinių piknosporų patekimo. Laikrodis mechanizmas nenutrūksta sukosi visą savaitę, po savaitės juostelė buvo pakeičiama nauja, o nuimtoji padalinama į 7 lygius segmentus (vienas segmentas atitinka vienos paros laikotarpį). Mėginiai, išvengiant tarpusavio kontakto, buvo sudedami į dėžutę ir iki tolimesnių analizių laikomi -25 °C temperatūroje (Morais et al., 2016). Per trijų metų laikotarpį surinkti 756 mėginiai (pirmais metais – 276, antrais – 224, trečiais – 256).

Sporų skaičius buvo nustatytas naudojant mikroskopą Eclipse E600 („Nikon“, Japonija) padidinus 40 kartų (Piliponyte-Dzikiene et al., 2014). Askosporos identifiкуotos pagal morfologinius požymius aprašytus Sanderson (1972): askosporos yra dviląstės, viena ląstelė būna šiek tiek didesnė, skaidrios ir gali būti 9–15 μm × 2,5–3 μm dydžio (4 pav. B).

Ankstyvosios Z. tritici infekcijos nustatymas

Siekiant nustatyti ankstyvąją *Z. tritici* infekciją, bei įvertinti ryšį tarp *Z. tritici* kiekiu lapuose ir ligos intensyvumo 2019 ir 2020 metais buvo rinkti kviečių lapų mėginiai. Vizualiai įvertintas ligos intensyvumas, iš lapų išskirta DNR ir tikrojo laiko polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu nustatytas *Z. tritici* DNR kiekis lapuose.

Apskaitos bei žeminių kviečių lapų ėminių rinkimas. Skirtingų rotacijų sėjomainų (kviečių monokultūros lauke ir žeminiuose kviečiuose auginamuose po nemiglinių augalų) laukuose (šalia Burkard gaudyklių) buvo atmatuotos 5x10 m dydžio aikštelės lapų septoriozės plitimo ir intensyvumo įvertinimui. Ligos intensyvumui įvertinti naudojant EPPO guideline 1/26(4) ligų išsivystymo procentines skales (1, 5, 10, 25, 50 ir 75 proc.), vizualiai įvertinamas ligos pažeistas lapo plotas procentais. Ligų apskaitai įstrižai kiekvienos aikštelės atsitiktine tvarka buvo pasirinkta po 25 augalų pagrindinius stiebus. Apskaitų metu apžiūrėti ir įvertinti visi tuo augalų augimo periodu žali augalo lapai, išskiriant atskirai lygius: L1 – vėliavinis lapas, L2 – antras lapas (pirmas lapas po vėliavinio), L3 – trečias lapas (antras lapas po vėliavinio) ir t. t. Iki augalų bambėjimo (BBCH 31) tarpsnio buvo vertinamas visas augalas, neišskiriant į atskirus lygius. Apskaitų pradžia – spalio mėnuo iki pirmųjų šalčių, vėliau apskaitos tęsiamos pavasarį, augalų vegetacijai atsinaujinus ir baigiamos liepos mėnesį. Apskaitos atliktos kas 7 dienas.

Taip pat kaskart atliekant apskaitas, atsitiktine tvarka buvo skinami trys viršutiniai lapai, o krūmijimosi tarpsnyje (BBCH 21) visas augalas. *Z. tritici* DNR išskyrimui buvo surenkamas ne mažesnis kaip 20 lapų ėminys. Mėginiai iki DNR išskyrimo iš lapų buvo laikomi -25 °C temperatūroje.

DNR išskyrimui lapai buvo homogenizuojami skystu azotu. Iš homogenizuoto pavyzdžio patogeno DNR išskiriama naudojant E.Z.N.A. Plant DNA Kit (USA), laikantis gamintojo rekomendacijų ir iki tolimesnių analizių saugoma šaldiklyje -18 °C temperatūroje.

Darbo eiga:

- 1) Į 1,5 ml centrifuguojamą mėgintuvėlį su homogenizuotu lapų mėginiu įpilama 600 µl P1 buferio. Mėgintuvėliai pavartomi, kad mėginys pilnai sudrėktų.
- 2) Mėgintuvėliai su mėginiu termostate inkubuojami 65 °C temperatūroje 10 min., kaitinimo laikotarpiu du kartus pavartant.
- 3) Įpilama po 140 µl P2 buferio, mėgintuvėliai pavartomi.
- 4) Centrifuguojama 10000 aps. min⁻¹ 10 min greičiu.
- 5) 600 µl atsiskyrusio tirpalo pipete perkeliama į švarius 1,5 ml centrifuguojamus mėgintuvėlius.
- 6) Įpilama po 420 µl 100 % izopropanolio, mėgintuvėliai pavartomi ir centrifuguojami 14000 aps. min⁻¹ 2 min.
- 7) Tirpalas nupilamas, apversti ant popierinio rankšluosčio mėgintuvėliai 1 min. palaikomi, kad išdžiūtų skysčio likučiai.
- 8) Supilama po 300 µl iki 65 °C temperatūros pašildyto sterilaus dejonizuoto vandens. Mėgintuvėliai pavartomi.
- 9) Įpilama po 4 µl RNase (10mg/ml). Mėgintuvėliai pavartomi.
- 10) Įpilama po 150 µl P3 buferio ir po 300 µl 100 % etanolio. Pipetės pagalba (susiurbiant ir išleidžiant 10–15 kartų) mėgintuvėlio turinys gerai išmaišomas, kad įsitikinti, jog nuo mėgintuvėlio dugno pilnai atsiskyrė nuosėdos.
- 11) Visas gautas tirpalas perpilamas į švarius 2 ml mėgintuvėlius su HiBind DNR mini filtriukais bei centrifuguojama 10000 aps. min⁻¹ 1 min.
- 12) 2 ml mėgintuvėliai su skysčiu išmetami, o HiBind DNR mini filtriukai perkeliama į švarius 2 ml mėgintuvėlius.
- 13) Įpilama po 650 µl praplovimo buferio (Wash buffer) ir centrifuguojama 10000 aps. min⁻¹ 1 min.
- 14) Skystis nupilamas, o tušti mėgintuvėliai dar kartą centrifuguojami 10000 aps. min⁻¹ 2 min.
- 15) HiBind DNR mini filtriukai perkeliama į švarius 1,5 ml centrifuguojamus mėgintuvėlius.

16) Įpilama po 50–100 µl iki 65 °C temperatūros pašildyto išplovimo (ištirpinimo) buferio (Elution buffer), palaikoma 3-5 min. kambario temperatūroje ir centrifuguojama 10000 aps. min⁻¹ greičiu 1 min.

17) HiBind DNR mini filtruiškai išmetami, išskirta DNR saugoma -20 °C temperatūroje.

Tikrojo laiko PGR tyrimui specifiniai pradmenys parinkti pagal Duvivier et al., 2013. Reakcijų normalizacijai buvo naudojami Plant EF1α Hor1F ir Hor2R pradmenys (Nicolaisen et al., 2009), o augalų DNR iš to paties mėginio, kaip ir tiriama grybo rūšis. Visi naudoti pradmenys ir jų sekos pateikti 1 lentelėje.

1 lentelė. Specifiniai *Z. tritici* (Duvivier et al., 2013) bei augalo (Nicolaisen et al., 2009) pradmenys bei jų sekos

Table 1. List of specific *Z. tritici* (Duvivier et al., 2013) and plant (Nicolaisen et al., 2009) primers and their sequences

Rūšis / Species	Pradmenys / Primer	Seka (5'-3') / Sequence
<i>Zymoseptoria tritici</i>	MG-For	ATTGGCGAGAGGGATGAAGG
	MG-Rev	TTCGTGTCCCAGTGCCTGTA
Plant EF1α	Hor1F	TCTCTGGGTTTGAGGGTGAC
	Hor2R	GGCCCTGTACCAGTCAAGGT

Vieno PGR reakcijos mišinio kiekis buvo 20 µl, kurį sudaro 10 µl Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix, 6,9 µl dejonizuotas vanduo, 0,3 µl tiesioginis ir 0,3 µl atvirkštinis pradmenys (500 nM) bei 2,5 µl tiriamo mėginio DNR. Standartinė kreivė sudaryta iš tiriamo grybo DNR atlikus 5 pradinio DNR mėginio skiedimus. DNR koncentracija pamatuota fluorometru Qubit 3.0 (Life technologies, JAV). Reakcijos vykdomos naudojant tikrojo laiko PGR sistemą 7900HT Fast Sequence Detection System (Applied Biosystems, JAV) 95 °C 10 min (95 °C 15 s, 60 °C 20 s, 72 °C 40 s)^{40ciklų} režimu. Vieno mėginio reakcijos atliekamos dvejais pakartojimais. Augalų standartinei kreivei naudojama DNR išskirta iš kviečių lapų. Individualios standartinės kreivės sudaromos iš tirtų grybų ir augalų DNR skirtingų koncentracijų, atlikus 5 pradinio DNR mėginio skiedimus.

2.3. Lapų septoriozės kontrolės optimizavimas

Augalų patologijos ir apsaugos skyriaus sėjomainos žieminių kviečių pasėlyje po žieminių kviečių priešsėlio (su šiaudų likučiais) ir žieminių kviečių lauke po nemiglinių augalų priešsėlio (be šiaudų) buvo įrengti du lauko eksperimentai lapų septoriozės kontrolės dėsningumams įvertinti. Vienas eksperimentas buvo įrengtas žieminių kviečių monokultūroje (nuo 2005 m.), kitas – žieminiuose kviečiuose, augintuose po nemiglinių augalų: žirnių, rapsų ir žirnių atitinkamai 2019, 2020 ir 2021 metais. 2020 metais buvo auginta žieminių kviečių veislė

‘Arkadia’, o 2019 ir 2021 metais – ‘Skagen’. Remiantis ankstesniais metais atliktais ligų vertinimais, abiejų veislių atsparumas lapų septoriozei buvo panašaus lygio. Žieminiai kviečiai buvo sėjami 430 gyvybingų sėklų į kvadratinį metrą (m²) sėklos norma. Eksperimentiniai laukeliai buvo 2,5 m pločio ir 10 m ilgio, keturiais pakartojimais, išdėlioti rendomizuotų bloků tvarka. Eksperimento metu buvo taikoma įprasta augalų auginimo praktika.

Augalų cheminei apsaugai nuo lapų septoriozės buvo naudojamas tuo metu Lietuvoje registruotas gerai ligą kontroliuojantis sisteminis fungicidas Adexar (fluksapiroksadas 62,5 g l⁻¹ + epoksikonazolas 62,5 g l⁻¹), turintis apsauginį ir gydomąjį veikimą (2 lentelė).

2 lentelė. Eksperimentų schema

Table 2. The scheme of experiments

Nr.	Adexar norma / dose 1 ha ⁻¹	Purškimų laikas/Application time					
		BBCH 32	BBCH 37-39	BBCH 51	Priklausomai nuo iškritusių kritulių / According to precipitation*		
					5-7 dienos po pirmo lietaus / 5-7 days after first rainfall	8-10 dienų po pirmo lietaus / 8-10 days after first rainfall	2 sav. po pirmojo purškimo / 2 weeks after the first application
1.	Nepurkšta / Untreated	-	-	-	-	-	-
2.	1,0	x	-	x	-	-	-
3.	1,0	x	x	-	-	-	-
4.	1,0	-	-	-	x	-	x
5.	2,0	-	-	-	x	-	-
6.	1,0	-	-	-	-	x	x
7.	2,0	-	-	-	-	x	-

* stebint kritulius nuo augalų bambėjimo pradžios (BBCH 31), purškimai atlikti po pirmo lietaus, kurio metu iškrito 1 ir daugiau mm kritulių

* observing precipitation from plant growth stage (BBCH 31), applications are done after the first rainfall of 1 mm or more

Į eksperimentų schemą įtraukti 2 standartiniai purškimai (2 ir 3 variantai). Antrame variante purškimai buvo atliekami pagal produkto etiketėje nurodomas rekomendacijas – javų bambėjimo (BBCH 32) ir plaukėjimo (BBCH 51) tarpsniais. Trečiame – fungicidai buvo išpurkšti remiantis Žemdirbystės ir sodininkystės plėtros departamento (AHDB – Agricultural and Horticulture Development Board) pateiktomis rekomendacijomis – žieminių kviečių bambėjimo pradžioje (BBCH 32) ir bambėjimo pabaigoje (BBCH 37-39) (AHDB, 2021). Keturių paskutinių variantų purškimo laikai buvo parinkti atsižvelgiant į kritulių kiekį, stebint oro sąlygas nuo javų bambėjimo pradžios (BBCH 31). Ketvirtame variante sezono metu buvo atlikti du purškimai: pirmasis buvo atliktas 5–7 dienos po pirmo lietaus, kurio metu iškrito 1 ir daugiau mm kritulių, o antrasis dvi savaitės po pirmojo purškimo. Penktame variante atliktas

vienas purškimas 5–7 dienos po pirmo lietaus, kurio metu iškrito 1 ir daugiau mm kritulių. Šeštame variante taip pat buvo atlikti du purškimai: pirmasis 8–10 dienų po pirmo lietaus, kurio metu iškrito 1 ir daugiau mm kritulių, o antrasis dvi savaitės po pirmojo purškimo. Septintame variante atliktas vienas purškimas 8–10 dienų po pirmo lietaus, kurio metu iškrito 1 ir daugiau mm kritulių. Variantuose, kuriuose atliktas vienas purškimas naudota pilna fungicido Adexar norma (2,0 l ha⁻¹), o variantuose kuriuose buvo atlikti du purškimai norma padalinta pusiau (po 1,0 l ha⁻¹).

Apskaitos. Lapų septoriozės išplitimo ir ligos intensyvumo apskaitos atliktos prieš kiekvieną purškimą, o po purškimo kas 10 – 14 dienų. Ligos intensyvumas buvo vertinamas naudojant EPPO guideline 1/26(4) ligų išsivystymo procentines skales (1, 5, 10, 25, 50 ir 75 proc.). Ligos intensyvumas buvo išreikštas ligos pažeisto lapų ploto sezono metu indeksu (AUDPC) (Simko and Piepho, 2012). Jis apskaičiuotas pagal formulę:

$$\text{AUDPC} = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{y_i + y_{i+1}}{2} \times (t_{i+1} - t_i),$$

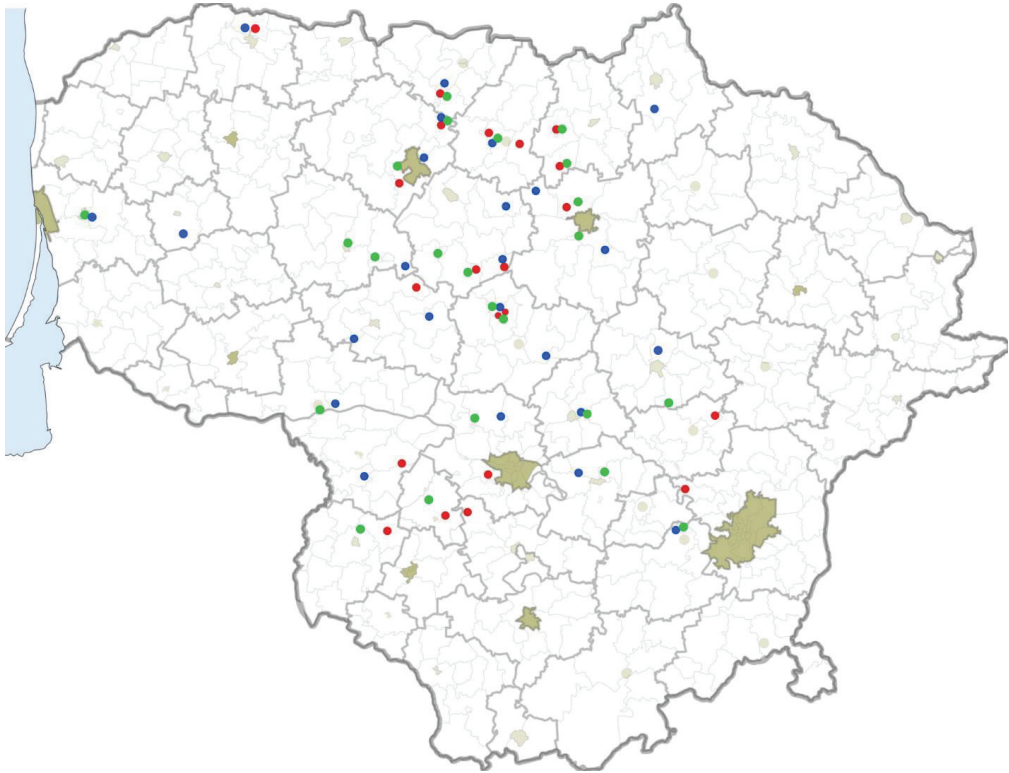
kur n yra atliktų stebėjimų skaičius; y_i – septoriozės intensyvumas (%) i apskaitos metu; t_i – dienų skaičius tarp apskaitų.

Kviečiams subrendus (BBCH 89), pasėliai buvo nukulti kombainu „Haldrup C85“ (Vokietija). Kiekvieno laukelio grūdų drėgnumas nustatytas grūdų analizatoriumi „Infratec“. Javus nuėmus paskaičiuotas javų derlingumas (t ha⁻¹ prie 15 proc. drėgnumo) bei paimti apie 1 kg grūdų pavyzdžiai kviečių derliaus 1000 grūdų masės (TGM) įvertinimui skirtingų veiksnių fonuose. TGM nustatyti buvo naudojamas sėklų skaičiuotuvus „Contador“ (Vokietija).

2.4. Izoliatų paruošimas patogeniškumo bei atsparumo fungicidams tyrimams

Žieminių kviečių lapų su lapų septoriozės simptomais, mėginių rinkimas buvo vykdomas 2019 – 2021 metais. Kiekvienais metais mėginiai buvo surinkti iš 21-24 skirtingų Lietuvos vietovių. Kviečių lapai su aiškiai matomais ligos požymiais iš kiekvieno lauko buvo surinkti atsitiktine tvarka einant per lauką ir skinant po lapą nuo augalo. Augalų lapai (apie 30-50 vnt.) sudėti į popierinius vokus su užrašyta vietovės, kurioje surinkti pavyzdžiai, informacija (GPS koordinatės, rajonas, artimiausia gyvenvietė). Laboratorijoje vokai su kviečių lapais buvo saugomi -18 °C temperatūroje iki grybo išskyrimo.

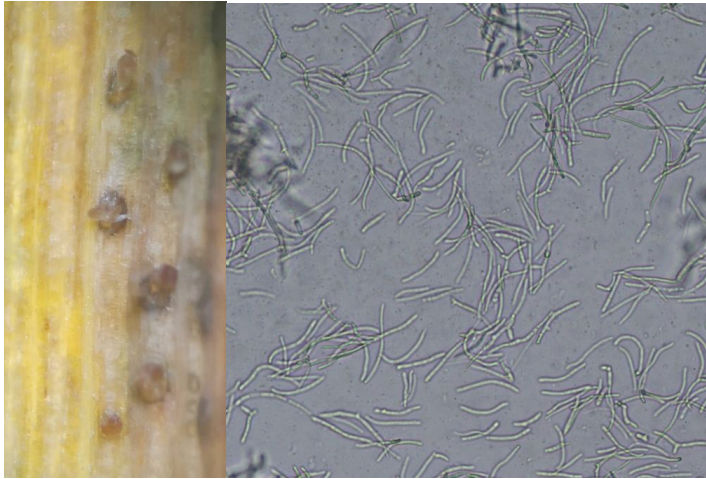
Žieminių kviečių lapų mėginių rinkimo vietos pateikiamos 5 paveiksle, 2019 metais mėginiai buvo surinkti iš 21 vietovės, 2020 metais – 24, o 2021 – 23.



5 paveikslas. Žieminių kviečių lapų, su lapų septoriozės simptomais, mėginių rinkimo vietos 2019–2021 metais (2019 metai raudonas taškas, 2020 – mėlynas, 2021 – žalias)

Figure 5. Sampling points for the collection of leaf samples of winter wheat with symptoms of septoria for the years 2019-2021 (2019 - red dot, 2020 - blue, 2021 - green)

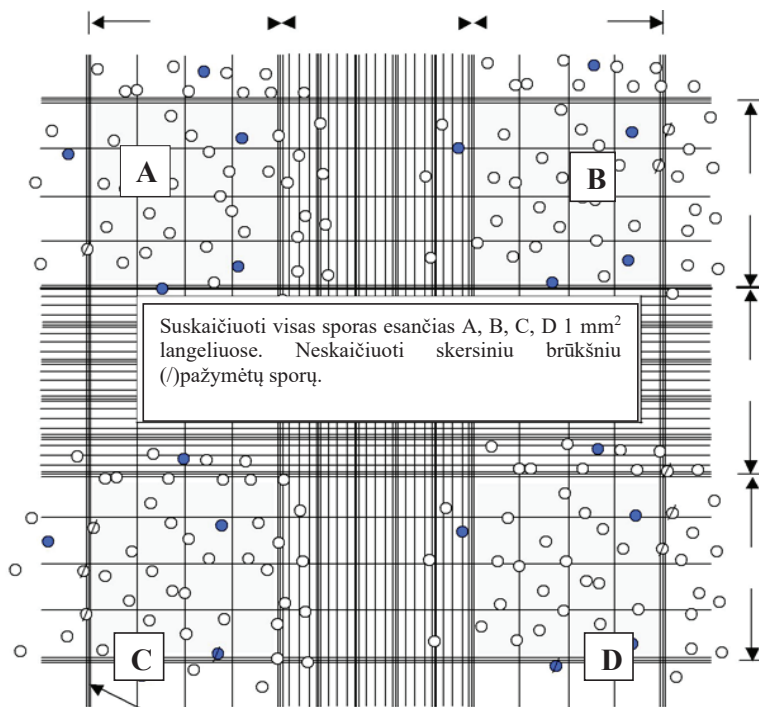
Izoliatų išskyrimas. Kviečių lapai su ligų požymiais buvo sukarpyti į 2 cm dydžio dalis, 2 min. sterilinti 2 % natrio hipochlorito tirpale bei perplauti steriliu vandeniu. Lapų dalys išdėliotos Petri lėkštelėse (po 5 dalis lėkštelėje, viršutine lapų puse į viršų) ant sudrėkinto filtravimo popieriaus (1 ml vandens 6 cm skersmens lėkštelei). Lėkštelės inkubuotos 18–24 val. po UV lempomis palaikant 20 °C temperatūrą. 39 g Difco bulvių dekstrozės agaras (BDA) buvo praskiestas vandeniu iki 1000 ml ir sterilizuotas 20 min. 121 °C temperatūroje. Atvėsus iki 50 °C temperatūros, bakterijų eliminavimui, terpė papildyta antibiotikais streptomycinu ir rifampicinu (100 mg streptomicino ištirpinta 1 ml, o 100 mg rifampicino ištirpinta 5 ml etanolio (100 proc.)). Prieš išpilstant į Petri lėkšteles terpė labai gerai išmaišoma.



6 paveikslas. Iš piknidžių išsiveržusi *Zymoseptoria tritici* konidijų masė bei grybo konidijos
Figure 6. *Zymoseptoria tritici* conidia cirrus oozing out of pycnidia and fungus conidia

Naudojantis plona adata grybo *Zymoseptoria tritici* konidijų masė iš vieno piknidžio (6 paveikslas) buvo perkeliama ant BDA terpės su antibiotikais. Lėkštelės inkubuotos po dienos šviesos lempomis, 4–7 dienas palaikant 20 °C temperatūrą. Kelios grybo konidijos (grybas *Z. tritici* ant BDA terpės suformuoja tik konidijas ir labai mažai grybienos) naudojantis laboratorine kilpa perkeltos į lėkštelės su BDA terpe be antibiotikų. Lėkštelės inkubuotos po dienos šviesos lempomis, 4–7 dienas palaikant 20 °C temperatūrą.

Sporų suspensijos paruošimas. Naudojantis sterilia laboratorine kilpa paimtas nedidelis kiekis grybienos (konidijų) ir gerai išmaišytas steriliame vandenyje (10 ml). Sporų koncentracija turi siekti apie 100 000 sporų ml⁻¹. Tikslī sporų koncentracija nustatyta skiedimo būdu. Sporų koncentracija tirpale nustatoma kraujo kūnelių matuokliu, kurio bendras plotas (9 mm²) pažymėtas graviruotomis linijomis (7 paveikslas). Sporos skaičiuojamos 1 mm² ploto apskaitiniuose laukeliuose (A, B, C, D) atskirai. Kiekvienas pavyzdys prieš matavimą gerai suplaktas, kad sporos tolygiai pasiskirstytų tirpale.



Apskaitinis plotas papildomai yra padalintas ir sugrupuotas į atskiras dalis. Vidurinė linija yra apskaitinio ploto kraštas. Apskaitinis plotas yra 0,1 mm žemiau kraujo kūnelių matuoklio paviršiaus, todėl skysčio kiekis tenkantis 1 mm² yra 0,1 mm³ arba 0,0001 ml.

7 paveikslas. Sporų skaičiavimo schema naudojant kraujo kūnelių matuoklį

Figure 7. Spore counting scheme using a blood cell counter

2.5. *Z. tritici* patogeniškumo testas

Z. tritici izoliatų agresyvumui nustatyti atliktas patogeniškumo testas (Ünal et al., 2017). Šių tyrimų metu buvo siekiama išsiaiškinti *Z. tritici* izoliatų patogenezės skirtumus kviečiuose, inokuliuojant augalų lapus iš įvairių Lietuvos regionų surinktų izoliatų sporų suspensijomis.

Augalų auginimas. Eksperimentui atlikti kiekvienais metais buvo naudojami 'Arkadia' (jautresnė lapų septoriozei) ir 'Kena DS' (atsparesnė) veislių žieminiai kviečiai. Plastikiniuose induose (16 cm diametro), sterilaus dirvožemio mišinyje (priemolis/durpės, 1:1 atitinkamai) buvo pasėta po 4 sėklas. Augalai auginti reguliuojamo režimo sąlygomis, kai oro temperatūra dienos metu (15 val.) apie 20 °C, o nakties (9 val.) apie 12 °C ir pagal poreikį laistant.

Inokuliacija. Inokuliacijos procedūra buvo vykdoma pagal Suffert et al. (2013). Naudojant 25mm ilgio x visas lapo plotis (10-12 mm) (skirtingų veislių lapų plotis skiriasi) plastikinių rėmelį, sporų suspensija akvarelės teptuko (kiekvienam izoliatui atskiras teptukas) pagalba

užnešama ant augalo pagrindinio stiebo viršutinio lapo vidurinės dalies paviršiaus, ir tolygiai paskirstoma. Vienu inokuliatu buvo inokuliuojama po 4 kiekvienos veislės augalų lapus. Po inokuliacijos lapai 72 valandoms buvo aprišami distiliuotu vandeniu sudrėkintu, skaidriu polietileniniu maišeliu.

Patogenų biologinių funkcijų įvertinimas (Pariaud et al., 2009). Tyrimų metu buvo įvertinta:

- Z. tritici* inkubacinio periodo trukmė (dienų skaičius) skaičiuojant nuo inokuliacijos pradžios iki pirmųjų vizualių požymių (Van der Plank, 1963);
- infekcijos latentinis periodas, kurio trukmė (dienų skaičius) skaičiuojamas nuo inokuliacijos pradžios iki pirmųjų grybo vaisiakūnių (piknidžių arba stromų) pasirodymo (Shearer and Zadoks, 1972);
- lapų septoriozės intensyvumas buvo nustatytas, įvertinant pažeisto lapo plotą procentais (1, 2, 3 ir 5 proc., vėliau nuo 5, 10, 25 iki 100 proc.), apskaita atlikta 24 dienos po inokuliacijos (dpi) (Suffert et al., 2013);
- sporuliacijai įvertinti maksimalus piknidžių skaičius lupos pagalba pažeidimo vietoje skaičiuotas prieš prasidedant visiškam lapų senėjimui (Suffert et al., 2013).

2.6. *Z. tritici* atsparumo DMI, QoI ir SDHI grupių fungicidams tyrimai

Siekiant nustatyti *Z. tritici* izoliatų atsparumo skirtingų grupių fungicidams situaciją buvo atlikti molekuliniai bei *in vitro* tyrimai (3 lentelė).

3 lentelė. Atsparumo skirtingų grupių fungicidams įvertinimo tyrimai

Table 3. Studies on the evaluation of resistance to different fungicide groups

Izoliatų surinkimas					
Tyrimai su DMI grupės fungicidais		Tyrimai su QoI grupės fungicidais		Tyrimai su SDHI grupės fungicidais	
Molekuliniai tyrimai: mutacijų D134G, V136A, V136C, A379G, I138V, S524T ir kt. dažnumo nustatymas	Atsparumo fungicidams <i>in vitro</i> tyrimai su protiokonazolu	Molekuliniai tyrimai: mutacijos G143A dažnumo nustatymas	Atsparumo fungicidams <i>in vitro</i> tyrimai su azoksistrobinu, piraklostrobinu	Molekuliniai tyrimai: mutacijų C-N86S ir C-T79N dažnumo nustatymas	Atsparumo fungicidams <i>in vitro</i> tyrimai su fluksapiroksadu, biksafenu, benzovindiflupiru

2.6.1. Grybo *Z. tritici* izoliatų atsparumo fungicidams nustatymas

Atsparumo fungicidams *in vitro* tyrimams pasirinkti 6 fungicidai bei 5 skirtingos koncentracijos pagal Atsparumo fungicidams veiksmų komiteto (FRAC) pasiūlytas metodikas:

Azoksistrobinas 100 / 10 / 1 / 0,1 / 0,01 / 0 mg veikliosios medžiagos litre (mg v.m. L⁻¹);

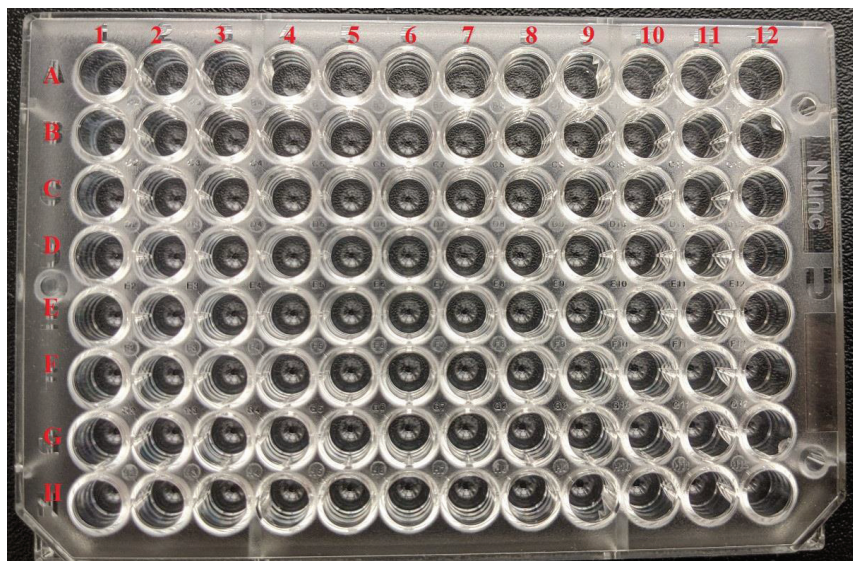
Piraklostrobinas 10 / 1 / 0,1 / 0,01 / 0,001 / 0 mg v.m. L⁻¹;

Protiokonazolas 30 / 10 / 3 / 1,1 / 0,37 / 0 mg v.m. L⁻¹;

Fluksapiroksadas, biksafenas, benzovindiflupiras 3 / 1 / 0,33 / 0,11 / 0,037 / 0 mg v.m. L⁻¹.

2021 metais į šiuos tyrimus buvo įtrauktos dar dvi veikliosios medžiagos; tai naujausia triazolų grupės medžiaga mefentriflukonazolas, ir naujos grupės (QiI) medžiaga fempikoksamidas, šioms medžiagoms parinktos koncentracijos: 6 / 2 / 1 / 0,2 / 0,1 / 0,02 / 0,01 / 0 mg l⁻¹.

Mikroplokštelių su 96 duobutėmis paruošimas bei užkrėtimas. Paruošus BDA terpę, kiekvienam izoliatui ir fungicidui reikėjo 3 ml terpės. Pasiruoštos skirtingos fungicidų koncentracijos. Į kiekvieną mikroplokštelių duobutę lašinta 20 µL fungicido tirpalo (pirmiausiai) ir 180 µL terpės. Plokštelės išdėstymas yra aprašytas po 8 paveikslu. Po to į kiekvieną duobutę įpilta 20 µL sporų suspensijos. Mikroplokštelės inkubuotos 6 dienas 20 °C temperatūroje, visiškoje tamsoje.



8 paveikslas. Mikroplokštelės išdėstymas (1 ir 2 stulpeliuose fungicidai nenaudojami (kontrolė); 3–12 stulpeliuose fungicido koncentracija didėja (po du stulpelius vienai koncentracijai); kiekviena eilė yra inokuliuojama skirtingu *Z. tritici* izoliatu)

*Figure 8. Microtiter plate set-up (No fungicide is applied in columns 1 and 2 (control); fungicide concentration is increasing in columns 3–12 (two columns per concentration); each row is inoculated with different *Z. tritici* isolate)*

Mikroplokštelės po inkubacijos įvertintos vizualiai, kontrolė įvertinama 100 %, kitos mikroplokštelės duobutės vertinamos lyginant su kontrolė. Atsparumo lygiui įvertinti buvo

apskaičiuotos vidutinės efektyvių fungicidų koncentracijos, kurios slopino *Z. tritici* augimą 50 % naudojantis GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., JAV).

2.6.2. Mutacijų identifikavimas *Z. tritici* genome

Mutacijų identifikavimas sukcinato dehidrogenazės (SDH) gene. Mutacijos C-N86S ir C-T79N *SDH* gene buvo identifikuojamos pasitelkiant tikrojo laiko PGR pagal Hellin et al. (2021) metodiką. PGR mišiniui buvo naudojama 2 µl *Z. tritici* DNR, 10 µM Takyon No Rox Probe MasterMix dTTP Blue (Eurogentec, Belgija), po 10 µM abiejų pradmenų porų bei po 20 µM zondų porų (4 lentelė) ir Gibco vanduo, kad pasiekti 20 µl galutinį reakcijos tūrį. Reakcijos buvo vykdomos Applied Biosystems ViiATM 7 termocikleryje (Thermo Fisher Scientific, Danija), naudojant programą: denatūracija - 3 min, 95 °C, 40 ciklų: denatūracija 10 s, 95 °C, pradmens prijungimas 60 s, 60 °C ir elongacija 1 min, 62 °C.

4 lentelė. SDH geno, susijusio su SDHI grupės fungicidų atsparumu, zondų ir pradmenų poros naudotos TL PGR.

Table 4. Specificities of the oligonucleotides (primers and probes) used for the specific allele quantification

Oligonukleotido pavadinimas / <i>Oligonucleotide name</i>	Seka / <i>sequence, 5'-3'</i>	Šaltinis / <i>Source</i>
Zondai / <i>Probes</i> SdhC-79T-probe SdhC-79N-probe SdhC-86N-probe SdhC-86S-probe	GTACCAGGTTATTTG GGTACCAGTTTATTTG CTCAACCGCGT CTCAGCCGCGT	Hellin et al., 2021
Pradmenys / <i>Primers</i> SdhC-79-86-F SdhC-79-86-R	CACCTCGCAATCTACAAAC TCAACGAATGAAACGTCAC	

Mutacijos G143A identifikavimas cyt b gene. Mutacija G143A *cyt b* gene buvo identifikuojama naudojant genotipavimo metodą, pagrįstą konkuruojančia aleliui specifine PGR – KASP (angl.: *competitive allele specific PCR*) (LGC Genomics, Jungtinė Karalystė) pagal Kildea et al. (2014) metodiką. PGR reakcijos buvo vykdytos Applied Biosystems ViiATM 7 termocikleryje (Thermo Fisher Scientific, Danija), naudojant gamintojo protokolą.

Mutacijų identifikavimas sterolio 14 alfa demetilazės (CYP51) gene. Mutacijos *CYP51* gene identifiкуotos pasitelkiant PGR bei DNR Sanger sekoskaitą pagal Kildea et al. (2019) metodiką. Vienos reakcijos kiekis buvo 20 µl, PGR mišiniui naudota: 1 µl *Z. tritici* DNR, 5.0 µl 5× GoTaqFlexi PCR buffer (Promega, Madison, JAV), po 2,5 µl kiekvienos pradmenų poros (abi po 10 µM) (5 lentelė), 1.5 µl MgCl₂, 2.0 µl of dNTP (2,5 mM), 0,2 µl GoTaqFlexi polimerazės (5u/µl) (Promega, Madison, JAV) ir Gibco vanduo, kad pasiekti 25 µl galutinį reakcijos tūrį. PGR reakcijos buvo vykdomos Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler

termocikleryje (ThermoFisher Scientific, Denmark), naudojant programą: denatūracija – 2 min, 94 °C, 35 ciklų: denatūracija 30 s, 94 °C, pradmens prijungimas 30 s, 58 °C ir elongacija 1 min, 72 °C. Amplifikacija užbaigiama elongacija, 10 min, 72 °C temperatūroje. PGR produktai išvalyti ir DNR sekoskaita atlikta MacroGen Europe B.V. (Amsterdamas, Nyderlandai). Sekoskaitos rezultatai išanalizuoti CLC workbench (QIAGEN, Aarhus, Danija) kompiuterine programa. Naudojant šią programą mutacijos identifikuotos izoliatų DNR sekas lyginant su *Z. Tritici* laukinio tipo paderme IPO 323 (olandijoje izoliuota laukinio tipo padermė pirmą kartą išskirta 1984 metais) (palyginimas pateiktas 4 priede).

5 lentelė. CYP51 geno, susijusio su DMI grupės fungicidų atsparumu, pradmenų poros, fragmentų pagausinimui ir sekoskaitai bei padidėjusios MgMFS1 geno raiškos nustatymui

Table 5. Primers used for analysis of CYP51 and MgMFS1 genes

Pradmens pavadinimas / Primer names	Pradmenų seka / Sequence, 5'-3'	Sekos ilgis / Sequence length, bp	Šaltinis / Source	
C51-F1 C51-R1	ACCTGCAGGCAGAACTAAGC CCTCCTGTGCCTGACTTCAC	1082	Kildea et al., 2019	
C51-F2 C51-R2	TCGCGGACCTCTACCACTAC GTATTTCTCGGACGGGCTCT	851		
C51-F3 C51-R3	GCAAATACAAGGACGGCAAT GGACAGGATGTGGTCTGGAT	944		
MFS1_2F MFS1_4R	GCAAGGATTCGGACTTGACG CTGCCGGTATCGTCGATGAC			Omrane et al. 2015

Atsižvelgiant į CYP51 geno mutacijų derinį, izoliatai buvo priskirti CYP51 haplotipams, aprašytiems Huf et al. (2018).

Padidėjusi genų CYP51 ir MgMFS1 raiška. Padidėjusią CYP51 geno raišką lemiančių intarpų nustatymas buvo atliktas visiems izoliatams, pagal Cools et al. (2012) metodiką. PGR reakcijoms buvo naudotas bendras 25 µl tūris, kurį sudarė 10,375 µl Gibco vandens, 5,0 µl 5× GoTaqFlexi PCR buffer (Promega, Madison, USA), 1,5 µl MgCl₂, 2 µl dNTP, po 2,5 µl tiesioginio (Mg51-proF) ir atvirkštinio (Mg51-seqR) pradmenų (abu po 10 µM), 0,2 µl GoTaqFlexi DNR polimerazės (5u/µl) (Promega, Madison, USA), ir 1,0 µl kiekvieno izoliato DNR (apie 5 ng µl⁻¹). PGR reakcijos buvo vykdomos naudojant programą: denatūracija – 2 min, 94 °C, 40 ciklų: denatūracija 30 s, 94 °C, pradmens prijungimas 30 s, 60 °C, elongacija 1 min, 72 °C ir amplifikacija užbaigiama elongacija, 10 min, 72 °C temperatūroje.

Padidėjusio membranos išmetimo siurblių aktyvumo, dar vadinamo kryžminiu atsparumu, buvimas izoliatuose buvo nustatytas naudojant PGR su specifiniais pradmenimis MFS_2F ir MFS_4R, kaip aprašė Omrane et al. (2015). PGR reakcijos buvo atliktos naudojant Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler. PGR produktų patikrinimui ir intarpų nustatymui buvo

atliekama elektroforezė (45 minutes prie 100 V) 1 proc. agarozės gelyje, produktų vizualizacijai buvo naudojamas dažas SYBR® Safe DNA Gel Stain (ThermoFisher Scientific, Denmark). DNR amplikonai buvo vizualizuojami gelio vaizdavimo sistema (Bulldog-Bio, Portsmouth, JAV).

2.6.3. Skirtingų fungicidų įtaka lapų septoriozės intensyvumui

Siekiant nustatyti skirtingų fungicidų įtaka lapų septoriozės intensyvumui 2020–2022 metais buvo įrengti lauko bandymai. Eksperimentų metu auginta žieminių kviečių veislė 'KWS Emil'. Pasirinkti 8 fungicidai su skirtingais MOA: 5 su skirtingomis veikliosiomis medžiagomis (po vieną) ir 3 su skirtingų veikliųjų medžiagų mišiniais (6 lentelė). Fungicidai išpurkšti žieminių kviečių bambalėjimo pabaigoje (BBCH 39). Eksperimento metu buvo taikoma įprasta augalų auginimo praktika.

6 lentelė. Skirtingų fungicidų įtakos lapų septoriozės intensyvumui eksperimento schema

Table 6. The experimental scheme

Variantas / Treatment	Veikliosios medžiagos kiekis (g ha ⁻¹) / The amount of active ingredient (g ha ⁻¹)	MOA
1. Nepurkšta / Untreated	-	-
2. Azoksistrobinas / Azoxystrobin 250 g/l	250	QoI
3. Piraklostrobinas / Pyraclostrobin 250 g/l	250	QoI
4. Fluksapiroksadas / Fluxapyroxad 62,5 g/l	125	SDHI
5. Benzovindiflupiras / Benzovindiflupyr 100 g/l	75	SDHI
6. Protiokonazolas / Prothioconazole 250 g/l	200	DMI
7. Fluxapiroksadas / Fluxapyroxad 75 g/l + piraklostrobinas / pyraclostrobin 150 g/l	112,5 + 225	SDHI + QoI
8. Benzovindiflupiras / benzovindiflupyr 75 g/l + protiokonazolas / prothioconazole 150 g/l	75 + 150	SDHI + DMI
9. Bixafenas / Bixafen 60 g/l + Protiokonazolas / prothioconazole 200 g/l	60 + 200	SDHI + DMI

Apskaitos. Lapų septoriozės intensyvumo ant žieminių kviečių lapų apskaitos atliktos po purškimo kas 10–14 dienų. Ligos intensyvumas buvo vertinamas naudojant EPPO guideline 1/26(4) ligų išsivystymo procentines skales. Ligos intensyvumas buvo išreikštas ligos pažeisto lapų ploto sezono metu indeksu (AUDPC) (Simko and Piepho, 2012). Jis apskaičiuotas pagal formulę:

$$AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{y_i + y_{i+1}}{2} \times (t_{i+1} - t_i),$$

kur n yra bendras apskaitų skaičius; y_i – ligos intensyvumas (%) i apskaitos metu; t_i – dienų skaičius tarp apskaitų.

Kviečiams subrendus (BBCH 89), pasėliai buvo nukulti kombainu „Haldrup C85“ (Vokietija). Javus nuėmus paskaičiuotas javų derlingumas $t\ ha^{-1}$ prie 15 proc. drėgmės.

2.7. Meteorologinės sąlygos tyrimų metais

Meteorologinių sąlygų duomenys tyrimų metais surinkti meteorologijos stotyje, esančioje Akademijoje, Kėdainių rajone (7 lentelė).

7 lentelė. Mėnesio kritulių kiekis ir vidutinė temperatūra rudenį nuo spalio iki lapkričio ir pavasarį–vasarą nuo kovo iki birželio mėnesiais, 2019–2022

Table 7. Monthly rainfall and average temperatures in autumn from October and November and in spring–summer from March to June for the cropping seasons 2019–2022

Auginimo sezonas / Growing season	Spalis / October	Lapkritis / November	Kovas / March	Balandis / April	Gegužė / May	Birželis / June
Kritulių suma / Precipitation mm						
2018–2019	32.8 (13)*	12.9 (8)	37.8 (19)	0.0	55.4 (12)	16.1 (5)
2019–2020	34.9 (14)	29.5 (14)	31.7 (12)	9.5 (5)	50.1 (11)	165.9 (14)
2020–2021	49.4 (18)	35.6 (21)	16.3 (13)	26.3 (16)	100.9 (20)	30.1 (9)
2021–2022	35.0 (9)	87.9 (20)	2.9 (1)	53.6 (7)	78.5 (13)	151.5 (12)
Daugiametis vidurkis 1924–2022/ Multiannual average in 1924–2022	49.6	44.8	28.0	36.9	52.2	62.9
Oro temperatūra, vidutinė / Air temperature, mean °C						
2018–2019	7.9	2.9	3.3	8.9	12.9	20.6
2019–2020	9.3	4.9	3.5	6.8	10.6	18.9
2020–2021	10.2	5.3	2.0	6.4	11.4	19.6
2021–2022	8.1	3.9	1.8	6.0	10.9	17.4
Daugiametis vidurkis 1924–2022 / Multiannual average in 1924–2022	6.9	2.0	–0.5	6.0	12.4	15.8

* – lietingų dienų skaičius / number of rainy days

2018–2019 metų auginimo sezonas buvo šiltas ir sausas, spalio–lapkričio ir kovo–birželio mėn. kritulių kiekis (155,0 mm) buvo dvigubai mažesnis, palyginti su daugiamečiu vidurkiu (321,5 mm) (1924–2020). 2019 metų balandis buvo drastiškai sausas, per visą mėnesį nebuvo kritulių. Gegužės ir birželio mėnesiais, kuomet augalų augimui bei ligos plitimui reikia daugiausiai drėgmės, iškrito tik 71,5 mm kritulių, tai yra trečdaliu mažiau nei daugiametis vidurkis. 2019 metų birželis buvo neįprastai šiltas, šio mėnesio vidutinė oro temperatūra buvo 4,8 °C aukštesnė lyginant su daugiamečiu vidurkiu (15,8 °C).

2020 metų balandį nors ir iškrito šiek tiek kritulių, tačiau palyginus su daugiamečiu vidurkiu kritulių kiekis buvo beveik keturis kart mažesnis. Tuo tarpu birželio mėnesio kritulių kiekis (165.9 mm) dvigubai viršijo daugiamečių vidurkį (62,9 mm).

2020-2021 metų auginimo sezonas buvo gana drėgnas, kritulių kiekis viso sezono metu buvo šiek tiek mažesnis lyginant su daugiamečiu vidurkiu. O vidutinė oro temperatūra viršijo daugiametį vidurkį. Apibendrinant, 2021 m. buvo daugiausiai lietingų dienų (58 – kovo-birželio mėnesiais), o temperatūros panašios kaip ir kitais metais.

2021 metų rudens – 2022 metų pavasario–vasaros metu kritulių kiekis buvo didžiausias per tyrimo laikotarpį. Nors 2022 metai buvo šiek tiek vėsesni lyginant su ankstesniais metais, tačiau nuo daugiamečio vidurkio beveik nesiskyrė. Žieminių kviečių augimui svarbiais mėnesiais (balandį-birželį) kritulių kiekis (283,6 mm) buvo gerokai didesnis už daugiametį vidurkį (152 mm).

Visais keturiais metais (2019–2022 m.) vidutinė mėnesio oro temperatūra buvo aukštesnė, palyginti su daugiamečiu vidurkiu. Dėl gausių kritulių gegužės-birželio mėnesiais 2020–2022 tyrimų metai buvo palankūs lapų septoriozės plitimui.

2.8. Statistinės analizės metodai

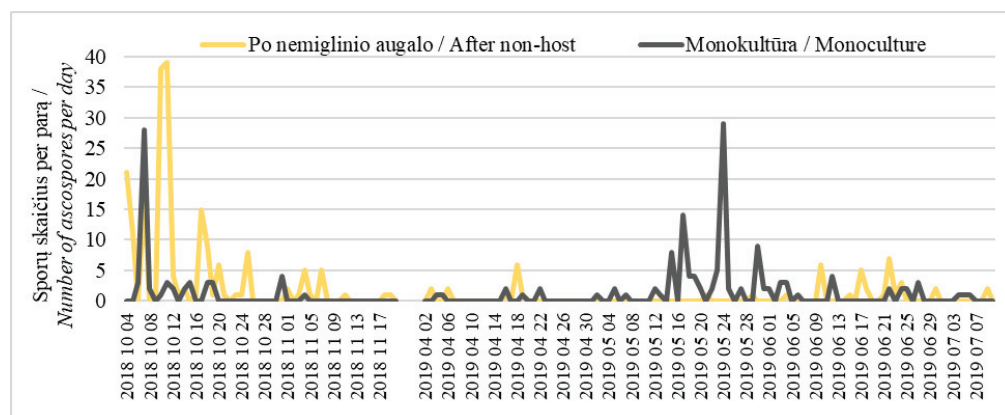
Tyrimų duomenys statistiškai buvo apdoroti dispersinės analizės programa SAS 9.4 versijos procedūra PROC GLM (SAS institutas, JAV). Ligos kontrolės skirtumams nustatyti buvo naudojamas Dunkano testas ($P \leq 0,05$) (Raudonius, 2017). Norint nustatyti koreliacijas tarp lapų septoriozės intensyvumo bei *Z. tritici* DNR kiekio lape, taip pat tarp ligos infekcijos, TGM ir grūdų derliaus iš skirtingų sėjomainų bei tarp inkubacinio ir latentinio periodų bei sporuliacijos buvo apskaičiuota Pearsono koreliacija naudojant PROC CORR procedūrą. Apskaičiuota vidutinio grūdų derliaus ir TGM standartinė paklaida (SE). Standartinis nuokrypis (SD) suskaičiuotas MS Excel programa.

3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. *Z. tritici* lytinių sporų plitimo pradžios bei plitimo pikų fiksavimas

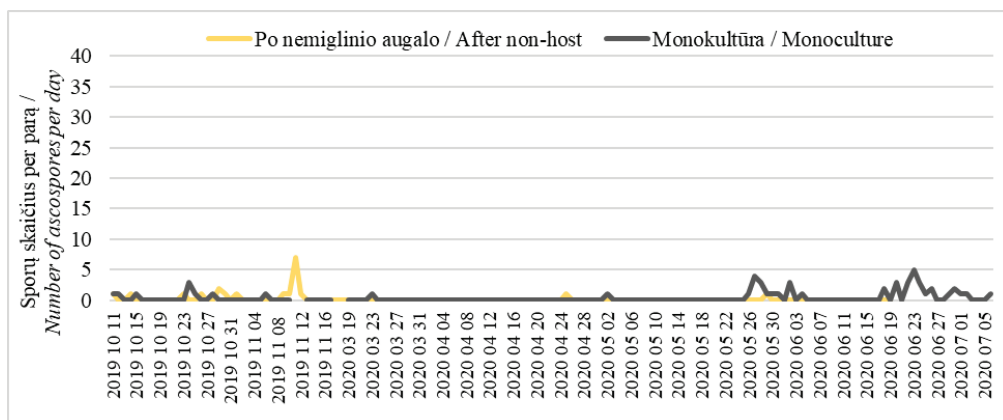
Zymoseptoria tritici askosporų plitimo srautai buvo fiksuojami 2019–2021 metų laikotarpiu dvejose skirtingose sėjomainose: žieminių kviečių monokultūroje bei žieminiuose kviečiuose augintuose po nemiglinių augalų. Per šiuos trejus metus askosporų skaičius labai varijavo (9–11 paveikslai), kadangi tam daug įtakos turi kritulių kiekis, rasos taškas, vėjo kryptis bei greitis (Trout and Levetin, 2001; Burch and Levetin, 2002). Taip pat nustatyta, kad askosporų kiekiui ore daug įtakos turi lapų septoriozės intensyvumas ankstesnio auginimo sezono metu (Duvivier et al., 2013). 2019 metais lapų septoriozės infekcijos intensyvumas žieminių kviečių pasėliuose buvo labai žemas ir tai galėjo turėti įtakos mažam askosporų plitimo skaičiui 2020 metų sezonu.

Įvertinus askosporų kiekius surinktus iš skirtingų sėjomainų, didesni jų kiekiai nustatyti žieminiuose kviečiuose augintuose po nemiglinių augalų. Atlikti tyrimai rodo, kad *Z. tritici* sporos nuo ražienų ir kviečių šiaudų liekanų į orą pasklinda sudyigus pasėliams arba labai ankstyvais javų augimo tarpsniais (Suffert et al., 2011; Morais et al., 2016). Tai sutampa su šio tyrimo duomenimis, nes visais stebėjimų metais pirmosios sporos užfiksuotos spalio pradžioje, kai sudygo pasėliai. Hassine et al. (2019) savo tyrimuose nustatė panašias tendencijas, Tunise pirmosios sporos buvo užfiksuotos sėjos metu.



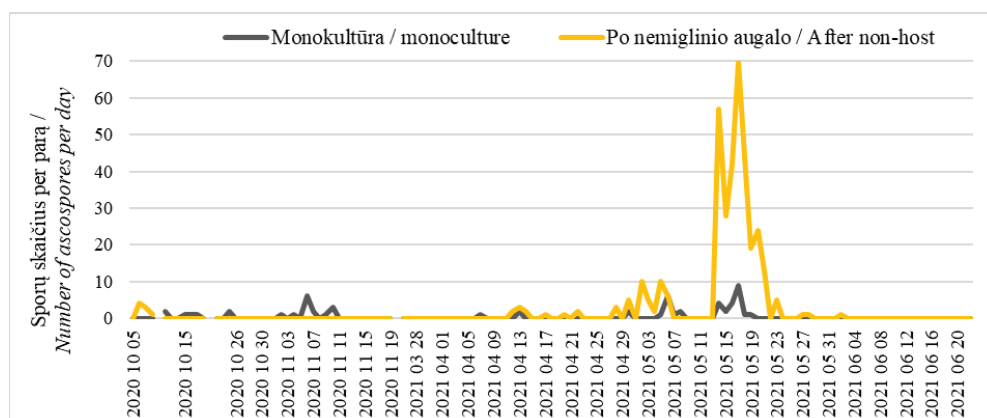
9 paveikslas. *Z. tritici* askosporų plitimo duomenys žieminių kviečių monokultūroje ir kviečiuose augintuose po nemiglinių augalų 2019 metais

Figure 9. *Z. tritici* ascospore release data in winter wheat monoculture and in winter wheat grown after non-host in 2019



10 paveikslas. *Z. tritici* askosporų plitimo duomenys žieminių kviečių monokultūroje ir kviečiuose augintuose po nemiglinių augalų 2020 metais

Figure 10. *Z. tritici* ascospore release data in winter wheat monoculture and in winter wheat grown after non-host in 2020



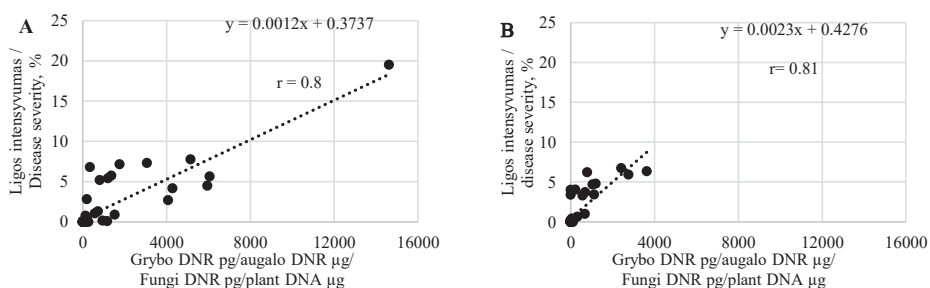
11 paveikslas. *Z. tritici* askosporų plitimo duomenys žieminių kviečių monokultūroje ir kviečiuose augintuose po nemiglinių augalų 2021 metais

Figure 11. *Z. tritici* ascospore release data in winter wheat monoculture and in winter wheat grown after non-host in 2021

Nors 2019 bei 2020 metais, didesni sporų kiekiai užfiksuoti žieminių kviečių monokultūroje, tačiau didžiausias askosporų plitimo pikas nustatytas 2021 m. gegužės 17 d. (70 askosporų m^{-3} oro) žieminiuose kviečiuose augintuose po žirnių (11 paveikslas). Gauti duomenys sutampa su prielaida, kad žieminių kviečių likučiai gali neturėti įtakos oru plintančių patogenų askosporų skaičiui (Morais et al., 2016). Kaip aprašyta metodinėje dalyje, meteorologinės sąlygos 2020 bei 2021 metų gegužės mėnesį buvo palankios *Z. tritici* askosporų sklidimui, kadangi buvo daug kritulių bei temperatūros žemesnės už daugiametį vidurkį. Kitų

tyrėjų duomenimis askosporų plitimas teigiamai koreliuoja su santykinė oro drėgme bei neigiamai su oro temperatūra, taigi didėjant oro temperatūrai mažėja askosporų sklidimas (Cordo et al., 2017; Pilo et al., 2022). Tyrimo duomenimis nustatyti du askosporų plitimo pikai, pirmasis rudenį spalio pradžioje, o antrasis gegužės mėnesį. Tai iš dalies sutampa su prielaida, kad askosporos gali veikti ne tik kaip pirminis užkrato šaltinis rudenį, bet ir kaip antrinis užkrato šaltinis pavasario pabaigoje. Literatūros šaltinių duomenimis po stiebo ilgėjimo tarpsnio aptikti ore esantys užkrato kiekiai teigiamai koreliuoja su ligos intensyvumu lauke (Duvivier et al., 2013). Lietuvos sąlygomis šis laikotarpis yra, būtent, gegužės-birželio mėnesiai. Jungtinės Karalystės mokslininkai pažymėjo, kad šie ore esančio užkrato stebėjimai gali būti naudojami kaip prognozavimo ir atsargumo priemonė, siekiant sumažinti augalų ligų epidemijų riziką (West et al., 2008).

Siekiant nustatyti ankstyvąją infekciją, įvertinti ligos intensyvumą bei nustatyti *Z. tritici* DNR kiekį žieminių kviečių lapuose, 2019 ir 2020 metais buvo surinkti lapų mėginiai, vizualiai įvertintas ligos intensyvumas bei atlikta kiekybinė tikrojo laiko PGR analizė. Didesnė patogeno koncentracija nustatyta augalų lapuose, augintuose žieminių kviečių monokultūroje. Tiek žieminių kviečių monokultūroje, tiek žieminiuose kviečiuose, augintuose po nemiglinių augalų, koreliacinė duomenų analizė išryškino stiprią koreliaciją (atitinkamai $r = 0,870$ ir $r = 0,813$) tarp vizualiai įvertinto ligos intensyvumo ir *Z. tritici* DNR kiekio (12 paveikslas). Taigi, kuo didesnis *Z. tritici* kiekis, tuo didesnis lapų septoriozės intensyvumas (Tonti et al., 2019). *Z. tritici* DNR aptikta 96,5 % tirtų lapų mėginių ($n = 58$) be matomų ligos simptomų. Šie rezultatai rodo, kad vizualinė diagnostika tik iš dalies padeda sėkmingai panaudoti fungicidus, nes *Z. tritici* latentinis periodas yra pakankamai ilgas – nuo 14 iki 28 dienų.



12 paveikslas. Ryšys tarp lapų septoriozės intensyvumo ir *Zymoseptoria tritici* DNR kiekio žieminių kviečių monokultūroje (A) ($n = 58$) ir žieminiuose kviečiuose, auginamuose po nemiglinių kultūrų (B) ($n = 54$) 2019 ir 2020 metais

Figure 12. Relationship between severity of STB and DNA quantity of *Zymoseptoria tritici* in winter wheat monoculture (A) ($n = 58$) and in winter wheat grown after non-host crops (B) ($n = 54$) in 2019 and 2020

Geriausias fungicidų poveikis nuo lapų septoriozės yra juos panaudojus maždaug septintą latentinio periodo dieną, kai ligos simptomai ant kviečių lapų dar nėra matomi. Išryškėjus vizualiems ligos požymiams, fungicidų purškimas gali duoti tik minimalią naudą. Pagal gerosios augalų apsaugos praktikos principus, fungicidai turi būti naudojami profilaktiškai, prieš pasirodant ligai, kad apsaugoti naujai susiformavusius lapus (Fones and Gurr, 2015). Siekiant padidinti minimalaus purškimų skaičiaus efektyvumą, purškimus svarbiausia atlikti ankstyvuoju infekcijos tarpsniu. Tačiau lapų septoriozės kontrolė yra gana komplikuoata, kadangi ankstyvasis purškimas gali būti ir neefektyvus, nes patogeno dar nėra, o vėlyvasis – neveiksmingas, nes infekcija jau yra įvykusi (Beyer et al., 2012). Todėl kontroliuojant ligą esminis vaidmuo gali tekti ankstyvajai ligos diagnostikai naudojant tikrojo laiko PGR (Fones and Gurr, 2015; Tonti et al., 2019). Tiesa, pagrindinis šio patogenų identifikavimo būdo trūkumas yra tai, kad jam reikalingi brangūs reagentai ir įranga (Abd-Elsalam et al., 2011; Duvivier et al., 2013). Moksliniuose tyrimuose šis metodas yra labai parankus, tačiau ūkininkams jis reikalautų papildomų išlaidų, todėl ligos plitimo nuspėjimui visą dėmesį reikia sutelkti į patogeno biologiją ir epidemiologiją bei remtis meteorologinėmis sąlygomis. *Z. tritici* kontrolei sukurti oro sąlygomis pagrįsti modeliai yra kaip pagalbinė priemonė ūkininkams siekiant kuo tiksliau numatyti fungicidų panaudojimo laiką (Jørgensen et al., 2020; Beyer et al., 2022).

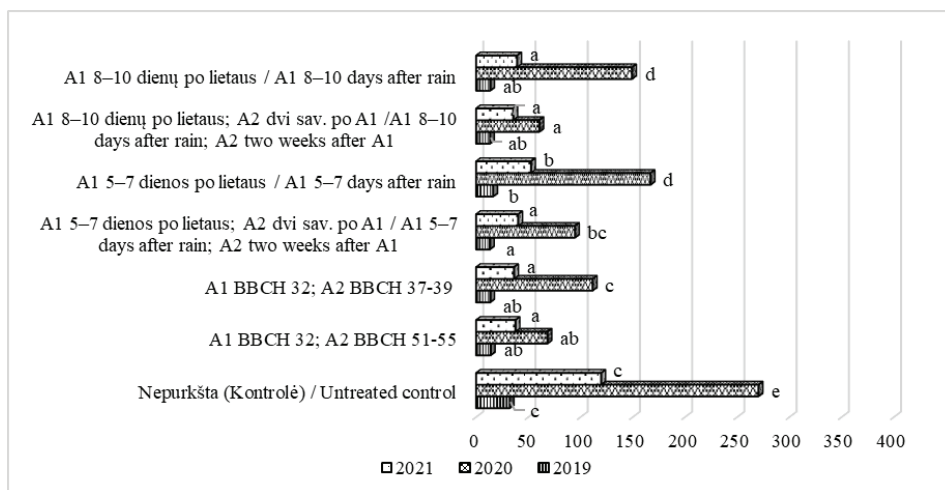
Apibendrinimas

Įvertinus 2019–2021 metų Z. tritici askosporų plitimo srautus, sporų plitimo pradžia kasmet buvo užfiksuota pirmajame spalio dešimtadienyje. Lyginant askosporų kiekį skirtingose sėjomainose, jų kiekis buvo varijuojantis tiek žieminių kviečių monokultūroje, tiek žieminiuose kviečiuose augintuose po nemiglinių augalų. Tyrimų metu užfiksuoti du askosporų plitimo pikai: pirmasis rudenį spalio pradžioje, o antrasis gegužės mėnesį. Atsižvelgiant į gautus duomenis galima teigti, kad Z. tritici askosporos Lietuvoje gali būti ne tik kaip pirminis užkrato šaltinis rudenį, bet ir kaip potencialus antrinio užkrato šaltinis pavasario pabaigoje. Kaip rodo, Duvivier et al. (2013) atlikti tyrimai, net jei ir nėra kritulių ir piknosporos nėra pakeliamos ant aukštesnių lapų lygių, toks ore esantis užkratas gali padidinti tikimybę kolonizuoti viršutinius lapus bei padidinti lapų septoriozės daromą žalą. Tuo tarpu atlikus tikrojo laiko PGR analizę ankstyvosios Z. tritici infekcijos įvertinimui net 96,5 % mėginių neturinčių vizualių ligos simptomų aptikta Z. tritici DNR. Nustatytas stiprus ryšys tarp patogeno DNR kiekio augale ir vizualiai įvertinto ligos intensyvumo.

3.2. Fungicidų panaudojimo laiko įtaka lapų septoriozės intensyvumui

Siekiant nustatyti fungicidų panaudojimo laiko įtaka lapų septoriozės intensyvumui, 2019–2021 metais buvo įrengti lauko eksperimentai žieminių kviečių monokultūroje ir žieminiuose kviečiuose, augintuose po nemiglinių augalų. Trejų metų lauko eksperimentų duomenys rodo, kad ligos intensyvumas labai skyrėsi tarp eksperimentinių metų ir sėjomainų, kas neretai pasitaiko Lietuvos klimato sąlygomis (Ronis et al., 2014).

Sausringi orai 2019 metais galėjo lemti mažą infekcijos intensyvumą ant augalų, nes lapų septoriozės infekcijos plitimas labai priklauso nuo kritulių kiekio vegetacijos metu (Pietravalle et al., 2003; El Jarroudi et al., 2009; Mahtour et al., 2011). Nepurkštuose (kontroliniuose) žieminių kviečių pasėliuose AUDPC reikšmės buvo 32,1 ir 5,9 atitinkamai monokultūroje ir žieminiuose kviečiuose, augintuose po nemiglinių augalų (žirnių) (13 ir 14 paveikslai). Tuo tarpu 2020 metais AUDPC verčių vidurkis buvo 270,3 monokultūroje ir 358,6 – žieminiuose kviečiuose, augintuose po nemiglinių augalų (rapsų). AUDPC reikšmių vidurkis 2021 metais buvo 119,7 monokultūroje ir 229,9 – žieminiuose kviečiuose, augintuose po nemiglinių augalų (žirnių). Žinoma, kad palankios meteorologinės sąlygos lapų septoriozės infekcijai vystytis yra vidutinės temperatūros žiemą ir gausūs krituliai vegetacijos laikotarpiu, ypač gegužės ir birželio mėnesiais (Pietravalle et al., 2003; O'Driscoll et al., 2014; El Jarroudi et al., 2017). Taigi lietingas birželis 2020 metais, bei lietinga gegužė 2021 metais buvo didesnio augalų užsikrėtimo priežastis.

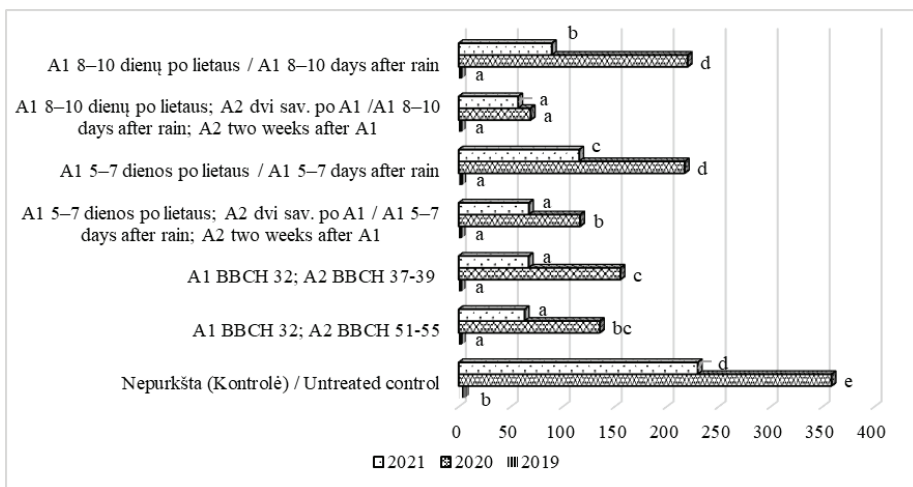


13 paveikslas. Fungicidų purškimo programų įtaka lapų septoriozės intensyvumui žieminių kviečių monokultūroje 2019-2021 metais; tarp verčių, pažymėtų ta pačia raide, pagal Dunkano kriterijų ($P \leq 0,05$) esminių skirtumų nėra

Figure 13. Effect of fungicide application programmes on the severity of STB in winter wheat monoculture 2019-2021, the differences between the values with the same letter were not significant at $P \leq 0.05$ according to Duncan's multiple range test

Nepaisant nedidelio ligos intensyvumo 2019 metais, tiek žieminių kviečių monokultūroje, tiek žieminiuose kviečiuose augintuose po nemiglinių augalų, visos purškimo programos iš esmės sumažino lapų septoriozės intensyvumą, lyginant su nepuršktais pasėliais. Monokultūroje vienintelis statistiškai patikimas skirtumas nustatytas tarp fungicidų programų, kuriose fungicidais buvo purškta 5–7 dienos po lietaus, vieną bei du kartus. Purškimo programa, kai fungicidai buvo panaudoti dukart, lėmė mažesnę ligos intensyvumą, lyginant su vienkartinio purškimo. Tuo tarpu žieminiuose kviečiuose, augintuose po nemiglinių augalų, esminių skirtumų tarp purškimo programų nenustatyta.

2020 ir 2021 metais abiejuose eksperimentuose visos fungicidų purškimo programos reikšmingai sumažino ligos intensyvumą lyginant su nepurškta kontrole. 2020 metų tyrimų rezultatai rodo, kad efektyviausias purškimo laikas abiejose sėjomainose buvo tada, kai fungicidas buvo purškiamas du kartus: pirmasis purškimas (A1) – praėjus 8–10 dienų po lietaus, o antrasis purškimas (A2) – praėjus dviem savaitėms po A1. Vienkartiniai fungicidų purškimai (5–7 dienos ir 8-10 dienų po lietaus) buvo mažiausiai veiksmingi, lyginant su kitomis programomis, o jų efektyvumas tarpusavyje beveik nesiskyrė. Remiantis šio eksperimento rezultatais, gausūs ir dažni lietūs (165,9 mm) birželio mėnesį turėjo įtakos ilgesniam lapų septoriozės užsikrėtimo laikotarpiui, todėl vienkartinis fungicidų panaudojimas buvo mažiau veiksmingas.

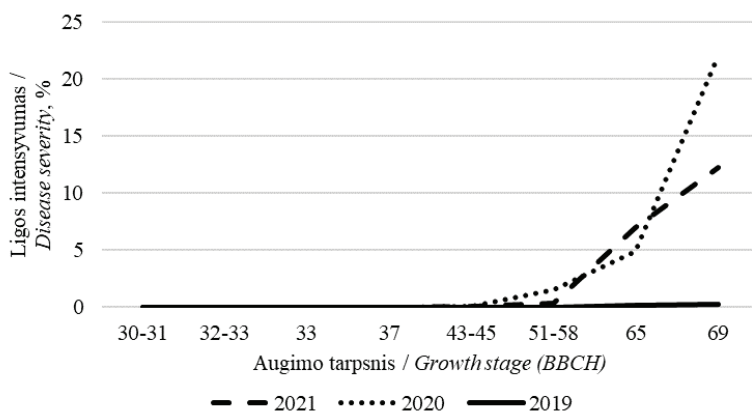


14 paveikslas. Fungicidų purškimo programų įtaka lapų septoriozės kontrolei žieminiuose kviečiuose, užaugintuose po nemiglinių augalų 2019–2021 metais; tarp verčių, pažymėtų ta pačia raide, pagal Dunkano kriterijų ($P \leq 0,05$) esminių skirtumų nėra

Figure 14. Effect of fungicide application programmes on the severity of STB in winter wheat grown after non-host crops, 2019–2021; the differences between the values with the same letter were not significant at $P \leq 0.05$ according to Duncan's multiple range test

2021 metais nustatyti reikšmingi skirtumai tarp fungicidų naudojimo programų. Mažesnis fungicidų efektyvumas (50–61 proc.) žieminiuose kviečiuose, augintuose po nemiglinių augalų nustatytas, kai purškimas buvo atliktas vieną kartą, nepriklausomai nuo dienų skaičiaus po lietaus, o žieminių kviečių monokultūroje – kai vienas purškimas fungicidais buvo atliktas praėjus 5–7 dienoms po lietaus.

Fungicidų naudojimo programų veiksmingumas buvo ryškesnis 2020 ir 2021 eksperimentiniais metais, kai ligos intensyvumas buvo didesnis. Šių dviejų metų rezultatai parodė, kad programos, kada fungicidas buvo naudojamas du kartus atsižvelgiant į meteorologines sąlygas, buvo veiksmingesnės. Šio tyrimo duomenimis vienkartinis purškimas turi mažesnę poveikį ligos intensyvumui, kadangi didesnis lapų septoriozės intensyvumas buvo pastebėtas tik po vėliavinio lapo pasirodymo (15 paveikslas). Remiantis ankstesniais tyrimais trijų viršutinių javų lapų apsauga nuo ligų yra svarbiausia, nes jie turi didžiausią reikšmę būsimo grūdų derliaus formavimuisi (Paveley et al., 2012; van den Berg et al., 2013; Beyer et al., 2022). Jungtinės Karalystės mokslininkai (Paveley et al., 2000; 2012) kaip pagrindinę fungicidų naudojimo programą rekomenduoja du purškimus (A1 ir A2): A1 purškiama visiškai išsisukus trečiajam lapui (BBCH 32), o A2 - visiškai išsiskleidus vėliaviniam lapui BBCH 39). Šiame tyrime, taikant dukartines fungicidų purškimo programas, A2 buvo atliktas pilnai pasirodžius vėliaviniam lapui, dėl ko fungicidas veikė maksimaliai ilgai bei lėmė mažesnę lapų septoriozės išplitimą.



15 paveikslas. Lapų septoriozės vystymasis skirtingais augalų augimo tarpsniais ant trijų viršutinių žieminių kviečių lapų, 2019–2021 m.

Figure 15. Development of STB at different plant growth stages on the upper three leaves of winter wheat, 2019–2021

3.2.1. Sėjomainų įtaka lapų septoriozės intensyvumui

Lyginant abi sėjomainas, 2019–2021 metais AUDPC vertės varijavo. Didesnis ligos intensyvumas 2019 metais buvo pastebėtas monokultūroje, tuo tarpu 2020 ir 2021 metais AUDPC reikšmės buvo didesnės žieminiuose kviečiuose, augintuose po nemiglinių augalų. Tyrimų rezultatai rodo, kad žieminiai kviečiai kaip priešsėlis gali padidinti ligos intensyvumą (Wenda-Piesik et al., 2016). Tačiau šio eksperimento 2020 ir 2021 metų duomenys sutampa su Latvijos mokslininkų padarytomis išvadomis, kad lapų septoriozės infekcijos lygiui didesnę įtaką turėjo meteorologinės sąlygos negu sėjomaina (Bankina et al., 2018). O'Driscoll et al. (2014) pažymėjo, kad lapų septoriozė išplinta, kai žiemos temperatūra yra vidutinė, o kritulių kiekis vegetacijos laikotarpiu didelis. Taigi, 2020 ir 2021 metais auginimo sezonų oro sąlygos buvo puikios intensyviam lapų septoriozės infekcijos vystymuisi. Kiti tyrėjai taip pat teigia, kad antžeminės dangos architektūra ir augalų architektūrinės savybės, tokios kaip augalo produktyvių stiebų skaičius, lapų matmenys ir vertikalus atstumas tarp lapų, daro įtaką lietaus lašų pagalba plintantiems patogenams bei yra svarbūs ligų valdymo veiksniai (Tivoli et al., 2012). Augalų lajos tankumas gali turėti įtakos ligų plitimui, nes sumažina tarpus tarp augalų lapų taip padidindami sporų patekimo ant gretimų augalų tikimybę (Pielaat et al., 2002; Schoeny et al., 2008). Pasėlio architektūra taip pat svarbi ligų kontrolėje, esant tankiam pasėliui susidaro palankesnis mikroklimatas patogenams plisti (Vidal et al. 2017).

Šio tyrimo monokultūros lauke žieminiai kviečiai buvo auginami penkiolika metų iš eilės. Laukuose, kur kviečiai yra auginami kelis metus iš eilės, dažniausiai padidėja kitų žaladarių išplitimo rizika (Bankina et al., 2013; Jalli et al., 2021). Žieminių kviečių monokultūroje antraisiais bei trečiaisiais tyrimo metais pasėliai išretėjo dėl intensyvaus pašaknio puvinių bei pavasarinio pelėsio išplitimo. Be to, 2020 ir 2021 metų pavasariais vyravę labai sausi orai su žemesne vidutine temperatūra turėjo įtakos augalų vystymuisi (5 lentelė). Žieminių kviečių, augintų kaip monokultūra, lapija buvo retesnė, lyginant su kviečiais, augintais po rapsų (2020 m.) ir žirnių (2021 m.). Šie veiksniai galėjo turėti įtakos sporų sklaidai ir ligos intensyvumo mažėjimui ir tai paaiškina didesnę lapų septoriozės intensyvumą 2020 ir 2021 metais žieminiuose kviečiuose, augintuose po nemiglinių augalų. Taigi, daroma prielaida, kad būtent dėl ilgamečio žieminių kviečių auginimo ligos intensyvumas buvo mažesnis monokultūroje, palyginti su žieminais kviečiais augintais po nemiglinių augalų.

Įvertinus fungicidų purškimo programų įtaką žieminių kviečių derliui nustatyta, kad grūdų derlius skyrėsi tarp metų ir sėjomainų. Didžiausias kviečių monokultūros grūdų derlius užfiksuotas 2020 metais, o žieminių kviečių, augintų po nemiglinių augalų – 2019 metais. Sėjomainos įvairinimas turi didelės įtakos žieminių kviečių grūdų derliui ir jo kokybei. Kaip

žinoma, kviečiai, auginami po kviečių kaip monokultūra, gali lemti grūdų derliaus nuostolius (Darguza and Gaile, 2019). Visais eksperimentiniais metais žieminių kviečių, augintų po nemiglinių augalų priešsėlio, grūdų derlius buvo didesnis nei monokultūroje: 2019 m. – 68,5 proc., 2020 m. – 32,6 proc., 2021 m. – 52,6 proc. (8 lentelė). Žieminių kviečių monokultūroje taikant skirtingas fungicidų purškimo programas, 2019 metais grūdų derlius padidėjo nuo 0,04 iki 0,36 t ha⁻¹, 2020 m. – nuo 0,07 iki 0,70 t ha⁻¹, o 2021 m. – nuo 0,08 iki 0,35 t ha⁻¹. Tuo tarpu eksperimente po nemiglinių augalų 2019 metais grūdų derlius padidėjo nuo 0,34 iki 0,90 t ha⁻¹, 2020 m. – nuo 0,37 iki 0,96 t ha⁻¹, o 2021 m. – nuo 0,02 iki 0,28 t ha⁻¹. Lyginant su kontroliniu (nepurkštu) variantu 2019 metais monokultūroje žieminių kviečių derlingumą esminiai didino fungicidų purškimo programos, kai fungicidas buvo panaudotas 5–7 dienos po lietaus vieną arba du kartus. Žieminiuose kviečiuose augintuose po nemiglinių augalų esminis derliaus padidėjimas užfiksuotas jau minėtose programose bei programoje, kur fungicidas buvo panaudotas du kartus: A1 8–10 dienų po lietaus ir A2 praėjus dviem savaitėms po pirmojo purškimo. Tuo tarpu 2020 metais monokultūroje esminiai derlių padidino purškimo programos, kur fungicidas buvo panaudotas 8–10 dienos po lietaus vieną arba du kartus, o žieminiuose kviečiuose augintuose po nemiglinių augalų esminės įtakos neturėjo tik programa, kur fungicidas buvo panaudotas vieną kartą 8–10 dienų po lietaus. 2021 metais žieminiuose kviečiuose augintuose po nemiglinių augalų nė viena fungicidų purškimo programa neturėjo esminės įtakos kviečių grūdų derliui, o monokultūroje didžiausią esminį derliaus padidėjimą lėmė purškimo programos, kur fungicidai buvo panaudoti dukart: A1 5–7 dienos po lietaus ir A2 praėjus dviem savaitėms po pirmojo purškimo 8–10 dienų po lietaus ir 2 po sav. bei atsižvelgiant į augalų augimo tarpsnius BBCH 32 ir 51–55. Kaip rodo šio tyrimo rezultatai, geriausia fungicidų naudojimo nauda buvo 2020 metais, kai pasireiškė didesnis užsikrėtimo lapų septorioze lygis. Abiejų sėjomainų vidutiniai žieminių kviečių derlingumo rezultatai parodė didžiausią derliaus padidėjimą, kai fungicidas buvo naudojamas du kartus (A1 8–10 dienų po lietaus ir A2 dvi savaites po A1). Remiantis kitų tyrimų duomenimis, derliaus padidėjimas dėl fungicidų naudojimo priklauso nuo meteorologinių sąlygų (Bankina et al., 2014, Rodrigo et al., 2015). Kaip teigia Byamukama et al. (2019), teigiamas fungicidų panaudojimo poveikis derliaus padidėjimui geriau pasireiškia, kai vegetacijos metu yra pakankamai drėgmės.

8 lentelė. Fungicidų purškimo programų įtaka žieminių kviečių grūdų derlingumui (\pm SE), 2019–2021 metais

Table 8. Effect of fungicide application programmes on winter wheat grain yield (\pm SE), 2019–2021

Purškimo programos / Application programme	2019			
	Monokultūra / monoculture		Po nemiglinių augalų / after non-host	
1. Nepurkšta (Kontrolė) / Untreated (control)	4.35 a	\pm 0.27	7.03 a	\pm 0.17
2. A1 BBCH 32; A2 BBCH 51-55	4.38 abc	\pm 0.08	7.37 abc	\pm 0.10
3. A1 BBCH 32; A2 BBCH 37–39	4.46 abc	\pm 0.17	7.50 abc	\pm 0.08
A1 5-7 dienos po lietaus; A2 dvi sav. po A1 /				
4. A1 5–7 days after rain; A2 two weeks after A1	4.68 bc	\pm 0.19	7.91 bc	\pm 0.31
5. 5-7 dienos po lietaus / 5–7 days after rain	4.71 c	\pm 0.29	7.93 c	\pm 0.38
A1 8-10 dienos po lietaus; A2 dvi sav. po A1 /				
6. A1 8–10 days after rain; A2 two weeks after A1	4.40 abc	\pm 0.13	7.81 bc	\pm 0.34
7. 8-10 dienų po lietaus / 8–10 days after rain	4.45 abc	\pm 0.11	7.39 abc	\pm 0.14
	2020			
	Monokultūra / monoculture		Po nemiglinių augalų / after non-host	
1. Nepurkšta (Kontrolė) / Untreated (control)	4.91 a	\pm 0.21	6.41 a	\pm 0.21
2. A1 BBCH 32; A2 BBCH 51-55	4.99 a	\pm 0.41	7.05 bcd	\pm 0.19
3. A1 BBCH 32; A2 BBCH 37–39	5.27 abc	\pm 0.27	7.14 bcd	\pm 0.29
A1 5-7 dienos po lietaus; A2 dvi sav. po A1 /				
4. A1 5–7 days after rain; A2 two weeks after A1	5.37 abc	\pm 0.37	7.02 bcd	\pm 0.18
5. 5-7 dienos po lietaus / 5–7 days after rain	4.98 a	\pm 0.26	6.95 b	\pm 0.10
A1 8-10 dienos po lietaus; A2 dvi sav. po A1 /				
6. A1 8–10 days after rain; A2 two weeks after A1	5.62 bc	\pm 0.26	7.37 d	\pm 0.17
7. 8-10 dienų po lietaus / 8–10 days after rain	5.62 bc	\pm 0.23	6.78 ab	\pm 0.21
	2021			
	Monokultūra / monoculture		Po nemiglinių augalų / after non-host	
1. Nepurkšta (Kontrolė) / Untreated (control)	4.50 a	\pm 0.17	7.08 ab	\pm 0.13
2. A1 BBCH 32; A2 BBCH 51-55	4.85 cde	\pm 0.17	7.21 ab	\pm 0.09
3. A1 BBCH 32; A2 BBCH 37–39	4.58 ab	\pm 0.18	7.35 b	\pm 0.11
A1 5-7 dienos po lietaus; A2 dvi sav. po A1 /				
4. A1 5–7 days after rain; A2 two weeks after A1	5.09 e	\pm 0.14	7.31 ab	\pm 0.13
5. 5-7 dienos po lietaus / 5–7 days after rain	4.64 abc	\pm 0.15	7.23 ab	\pm 0.14
A1 8-10 dienos po lietaus; A2 dvi sav. po A1 /				
6. A1 8–10 days after rain; A2 two weeks after A1	4.85 bcde	\pm 0.16	7.28 ab	\pm 0.15
7. 8-10 dienų po lietaus / 8–10 days after rain	4.63 abc	\pm 0.17	7.09 ab	\pm 0.13

Pastaba. Tarp verčių, pažymėtų ta pačia raide, pagal Dunkano kriterijų ($P \leq 0.05$) esminių skirtumų nėra

Note. The differences between the values with the same letter was not significant at $P \leq 0.05$ according to Duncan's multiple range test

2019 metais visos purškimo programos teigiamai veikė tūkstančio grūdų masę (TGM), tačiau žieminiuose kviečiuose, augintuose po nemiglinių augalų, TGM padidėjimas buvo nereikšmingas (9 lentelė). Žieminių kviečių monokultūroje visos fungicidų purškimo programos reikšmingai padidino TGM, palyginti su nepurkštais (kontroliniais) pasėliais, tačiau tarp purškimo programų esminių skirtumų nebuvo. 2020 metais visos fungicidų naudojimo programos padidino TGM abejuose sėjomainose: didžiausias padidėjimas užfiksuotas pasėliuose, kuriuose fungicidų naudojimas buvo parinktas atsižvelgiant į oro sąlygas ir sezono metu buvo atlikti du purškimai fungicidais. Tuo tarpu mažiausiai TGM didino purškimo programos, kada fungicidas buvo panaudotas vieną kartą. 2021 metais žieminių kviečių monokultūroje TGM esminiai didino tik purškimo programa, kai fungicidas buvo panaudotas 2 kartus (A1 8–10 dienų

po lietaus ir A2 po 2 sav.). O žieminiuose kviečiuose augintuose po nemiglinių augalų beveik visos programos esminiai didino TGM, tik vienkartinis fungicidų panaudojimas 5–7 dienos po lietaus neturėjo esminės įtakos.

9 lentelė. Fungicidų purškimo programų įtaka žieminių kviečių tūkstančių grūdų masei (\pm SE), 2019–2021 metais

Table 9. Effect of fungicide application programmes on winter wheat thousand grain weight (\pm SE), 2019–2021

Purškimo programos / Application programme	2019			
	Monokultūra / monoculture		Po nemiglinių augalų / after non-host	
1. Nepurkšta (Kontrolė) / Untreated (control)	34.93 a	\pm 0.40	45.85 ab	\pm 0.69
2. A1 BBCH 32; A2 BBCH 51-55	37.49 c	\pm 0.61	47.10 ab	\pm 0.76
3. A1 BBCH 32; A2 BBCH 37–39	37.02 bc	\pm 0.87	46.19 ab	\pm 0.66
A1 5-7 dienos po lietaus; A2 dvi sav. po A1 / 4. A1 5–7 days after rain; A2 two weeks after A1	36.87 bc	\pm 0.67	47.17 ab	\pm 0.63
5. 5-7 dienos po lietaus / 5–7 days after rain	36.00 bc	\pm 0.69	47.29 b	\pm 0.60
A1 8-10 dienos po lietaus; A2 dvi sav. po A1 / 6. A1 8–10 days after rain; A2 two weeks after A1	37.03 bc	\pm 0.79	46.81 ab	\pm 0.84
7. 8-10 dienų po lietaus / 8–10 days after rain	36.91 bc	\pm 0.88	46.45 ab	\pm 0.60
	2020			
	Monokultūra / monoculture		Po nemiglinių augalų / after non-host	
1. Nepurkšta (Kontrolė) / Untreated (control)	46.85 a	\pm 0.32	45.41 a	\pm 0.14
2. A1 BBCH 32; A2 BBCH 51-55	50.11 bcd	\pm 0.41	49.37 cde	\pm 0.30
3. A1 BBCH 32; A2 BBCH 37–39	49.92 bcd	\pm 0.37	48.67 c	\pm 0.27
A1 5-7 dienos po lietaus; A2 dvi sav. po A1 / 4. A1 5–7 days after rain; A2 two weeks after A1	50.47 d	\pm 0.30	49.78 de	\pm 0.32
5. 5-7 dienos po lietaus / 5–7 days after rain	49.52 b	\pm 0.26	47.33 b	\pm 0.25
A1 8-10 dienos po lietaus; A2 dvi sav. po A1 / 6. A1 8–10 days after rain; A2 two weeks after A1	50.19 bcd	\pm 0.31	49.98 e	\pm 0.16
7. 8-10 dienų po lietaus / 8–10 days after rain	48.31 b	\pm 0.07	47.34 b	\pm 0.03
	2021			
	Monokultūra / monoculture		Po nemiglinių augalų / after non-host	
1. Nepurkšta (Kontrolė) / Untreated (control)	40.62 a	\pm 0.06	38.97 a	\pm 0.39
2. A1 BBCH 32; A2 BBCH 51-55	41.02 abc	\pm 0.20	39.90 bcd	\pm 0.06
3. A1 BBCH 32; A2 BBCH 37–39	40.63 a	\pm 0.07	40.18 bcd	\pm 0.25
A1 5-7 dienos po lietaus; A2 dvi sav. po A1 / 4. A1 5–7 days after rain; A2 two weeks after A1	41.16 abc	\pm 0.26	40.25 cd	\pm 0.27
5. 5-7 dienos po lietaus / 5–7 days after rain	40.63 a	\pm 0.09	39.47 ab	\pm 0.28
A1 8-10 dienos po lietaus; A2 dvi sav. po A1 / 6. A1 8–10 days after rain; A2 two weeks after A1	41.23 c	\pm 0.34	40.52 d	\pm 0.20
7. 8-10 dienų po lietaus / 8–10 days after rain	40.67 abc	\pm 0.39	40.21 cd	\pm 0.30

Pastaba. Tarp verčių, pažymėtų ta pačia raide, pagal Dunkano kriterijų ($P \leq 0.05$) esminių skirtumų nėra

Note. The difference between the values with the same letter was not significant at $P \leq 0.05$ according to Duncan's multiple range test.

Lyginant visus eksperimentinius metus, 2021 metais TGM padidėjimas buvo mažiausias. Kaip teigia El Jarroudi et al. (2015), kartais fungicidų panaudojimas daugiau nei vieną kartą gali būti ekonomiškai nenaudingas dėl mažo ligos intensyvumo, bei gaunamo mažo derliaus priedo. Taylor and Cunniffe (2023) tyrimų duomenimis tais metais, kai ligos intensyvumas yra didelis

dvejų ar trijų purškimų duodama nauda yra daug didesnė nei mažesnio ligos intensyvumo metais, todėl rekomenduojama purškimų skaičių rinktis atsižvelgiant į ligos išplitimo riziką.

Siekiant įvertinti žieminių kviečių derlingumo bei TGM priklausomybę nuo ligos intensyvumo buvo atliktas Pearsono koreliacijos testas. Šis testas parodė, kad ligos intensyvumas turėjo didesnę įtaką TGM nei grūdų derlingumui (10 lentelė).

10 lentelė. Pearsono koreliacijos koeficientas (r) ryšiams tarp lapų septoriozės AUDPC verčių, žieminių kviečių tūkstančio grūdų masės (TGM) ir grūdų derlingumo palyginti

Table 10. Pearson's correlation coefficient (r) for relationships between STB AUDPC values, winter wheat thousand grain weight (TGM), and grain yield

Metai / Year	TGM / TGW		Grūdų derlingumas / Grain yield	
	r	p -value	r	p -value
<i>Monokultūra/ Monoculture</i>				
2019	-0.952***	0.0011	ns	0.4480
2020	-0.914**	0.0040	ns	0.2593
2021	ns	0.3200	ns	0.2215
<i>Po nemiglinių augalų / After non-host</i>				
2019	ns	0.1631	ns	0.1187
2020	-0.9843***	<0.0001	-0.9533***	0.0009
2021	-0.9015**	0.0055	ns	0.0933

* – reikšmingas prie **** $\leq 0,0001$, *** $\leq 0,001$ ir ** $\leq 0,01$; ns – nereikšmingas / significant at **** ≤ 0.0001 , *** ≤ 0.001 and ** ≤ 0.01 ; ns – not significant

Žieminių kviečių monokultūroje stiprus statistiškai reikšmingas koreliacinis ryšys tarp AUDPC reikšmių ir TGM nustatytas 2019 ir 2021 metais, tuo tarpu žieminiuose kviečiuose, augintuose po nemiglinių augalų šis ryšys nustatytas 2020 ir 2021 metais. Daugeliu atvejų koreliacija tarp AUDPC ir grūdų derliaus buvo nereikšminga; statistinė analizė parodė stiprią reikšmingą koreliaciją tarp šių rodiklių tik 2020 metais žieminiuose kviečiuose, augintuose po nemiglinių augalų.

Apibendrinimas

Įvertinus fungicidų panaudojimo laiko įtaką lapų septoriozės intensyvumui 2019–2021 metais žieminių kviečių monokultūroje ir žieminiuose kviečiuose, augintuose po nemiglinių augalų įrengtuose lauko eksperimentuose nustatyta, kad labiausiai ligos intensyvumą mažino purškimo programos, kai fungicidas buvo naudojamas du kartus atsižvelgiant į meteorologines sąlygas. Įvertinus skirtingų sėjomainų įtaką lapų septoriozės intensyvumui nustatyta, kad 2019 metais didesnis ligos intensyvumas buvo žieminių kviečių monokultūroje, o 2020 ir 2021 metais žieminiuose kviečiuose augintuose po nemiglinių augalų. Žieminių kviečių derlingumą bei TGM labiausiai didino purškimo programos kai fungicidas buvo naudojamas du kartus atsižvelgiant į meteorologines sąlygas, tai atspindi ligos kontrolės rodiklius lauke. Atlikus Pearsono koreliacijos testą nustatyta, kad ligos intensyvumas turėjo didesnę įtaką TGM nei

grūdų derliui. Stiprus reikšmingas koreliacinis ryšys tarp AUDPC reikšmių ir TGM žieminių kviečių monokultūroje nustatytas 2019 ir 2021 metais, o žieminiuose kviečiuose, augintuose po nemiglinių augalų – 2020 ir 2021 metais. Tuo tarpu stipri reikšminga koreliacija tarp lapų septoriozės AUDPC ir žieminių kviečių grūdų derlingumo nustatyta tik 2020 metais žieminiuose kviečiuose, augintuose po nemiglinių augalų.

3.3. Z. tritici patogeniškumas

Izoliatų surinktų iš skirtingų Lietuvos vietovių patogeniškumo tyrimai buvo atlikti 2019 ir 2020 metais (tikslus vietovių sąrašas pateikiamas 1 bei 2 prieduose). Tyrimų metu buvo įvertinti keli rodikliai parodantys *Z. tritici* populiacijos agresyvumą, tokie kaip inkubacinis ir latentinis laikotarpiai, infekcijos intensyvumas bei sporuliacija.

Įvertinus skirtingų izoliatų inkubacinius laikotarpius abejais tyrimų metais, jie svyravo nuo 10 iki 18 dpi 2019 metais ir 6–10 dpi 2020 metais (11 lentelė). 2019 metais ant abiejų veislių daugumos izoliatų inkubacinis laikotarpis buvo 14 dienų, o 2020 metais – 8 dienos.

Ilgiausias inkubacinis periodas 2019 metais užfiksuotas izoliato iš Vilniaus rajono (18 dpi ant veislės ‘Arkadia’ kviečių) tuo tarpu 2020 metais nė vienas izoliatas taip stipriai neišsiskyrė. Nors inkubacinis periodas skirtingais metais skyrėsi, latentinis laikotarpis buvo panašus – 16–24 dpi 2019 metais ir 14–24 dpi 2020 metais. Abėjais tyrimų metais ilgiausias latentinis periodas buvo 24 dpi; 2019 metais ant veislės ‘Arkadia’ tokio ilgio latentinį periodą turėjo izoliatai iš Šiaulių II ir Vilniaus rajonų, o ant veislės ‘Kena DS’ iš Panevėžio ir Pasvalio II rajonų. Tuo tarpu 2020 metais ant veislės ‘Arkadia’ augalų tokio ilgio latentinį periodą turėjo tik izoliatas iš Trakų rajono, o ant veislės ‘Kena DS’ – izoliatai iš Kauno, Jonavos ir Trakų rajonų.

11 lentelė. *Z. tritici* izoliatų iš skirtingų Lietuvos vietų inkubacinio ir latentinio periodų palyginimas (A – 2019 metai; B – 2020 metai)

Table 11. Comparison of incubation and latent periods of *Z. tritici* isolates from different locations in Lithuania (A - 2019; B - 2020)

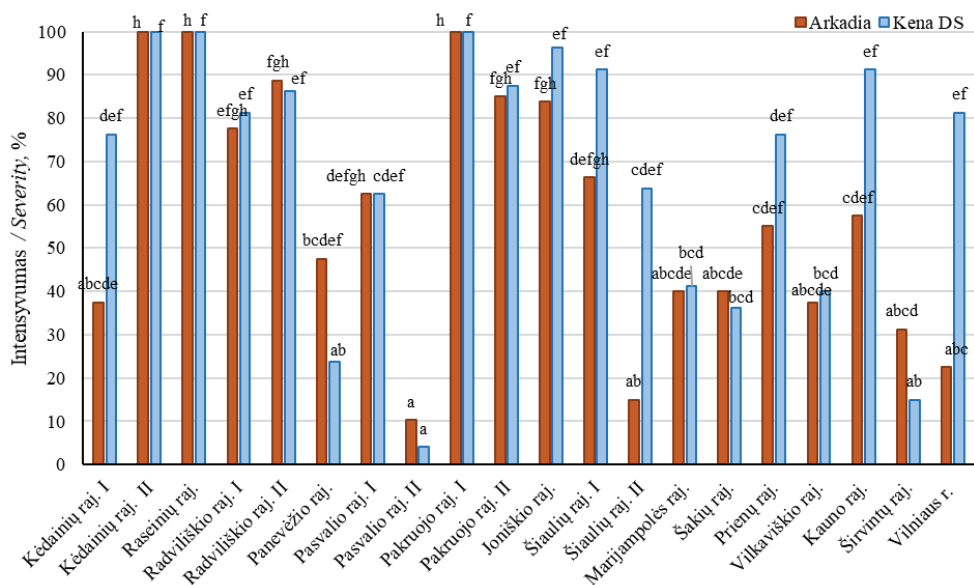
A Izoliatas / Isolate	Inkubacinio periodo trukmė / Incubation period length		Latentinio periodo trukmė / Latent period length		B Izoliatas / Isolate	Inkubacinio periodo trukmė / Incubation period length		Latentinio periodo trukmė / Latent period length	
	Arkadia	Kena DS	Arkadia	Kena DS		Arkadia	Kena DS	Arkadia	Kena DS
Kėdainių r. I	10	14	18	18	Kėdainių r. 1	6	8	14	14
Kėdainių r. II	12	10	18	18	Kėdainių r. 2	6	8	17	20
Raseinių r.	10	14	18	18	Raseinių r. 1	10	8	14	17
Radviliškio r. I	10	14	18	18	Raseinių r. 2	8	6	17	20
Radviliškio r. II	10	14	18	18	Kelmės r.	8	8	14	17
Panevėžio r.	10	14	21	24	Radviliškio r. 1	10	6	14	14
Pasvalio r. I	14	16	18	21	Radviliškio r. 2	8	6	17	20
Pasvalio r. II	14	14	21	24	Panevėžio r. 1	8	6	14	14
Pakruojo r. I	12	10	18	18	Panevėžio r. 2	8	8	17	17
Pakruojo r. II	14	10	18	18	Pakruojo r.	10	10	20	20
Joniškio r.	12	10	18	18	Biržų r.	8	8	17	20
Šiaulių r. I	10	10	21	18	Joniškio r.	6	10	14	17
Šiaulių r. II	14	14	24	18	Šiaulių r. 1	8	8	14	17
Marijampolės r.	14	16	18	21	Šiaulių r. 2	6	8	14	17
Šakių r.	14	16	18	21	Šakių r.	8	8	14	17
Prienų r.	14	14	21	18	Jurbarko r.	10	8	14	20
Vilkaviškio r.	14	14	18	18	Kauno r.	10	8	20	24
Kauno r.	14	14	18	21	Jonavos r.	6	8	17	24
Širvintų r.	14	14	18	21	Kaišiadorių r.	6	10	14	17
Vilniaus r.	18	14	24	18	Trakų r.	10	8	24	24
Vidurkis / Average	12,7	13,3	19,2	19,35	Vidurkis / Average	7,9	8,0	16,0	18,5
SD	2,12	2,03	1,99	2,01	SD	1,55	1,18	2,70	3,02

Pastaba / Note: SD – Standartinis nuokrypis / Standard deviation

Nepaisant skirtingo jautrumo *Z. tritici* patogeniui, įvertinus vidutinius inkubacinio ir latentinio periodų trukmės duomenis, skirtingų veislių žieminių kviečių įtaka šio patogeno inkubacinio ir latentinio periodo trukmei buvo nežymi. Didesnis skirtumas tarp latentinio periodo trukmės pastebėtas tik 2020 metais, ant veislės ‘Kena DS’ augalų; vidutinė šio periodo trukmė buvo 2,5 dienos ilgesnė lyginant su veislės ‘Arkadia’ kviečiais. Tačiau vertinant dviejų metų atskirų izoliatų patogeniškumą, inkubacinio ir latentinio periodų trukmės ant veislių ‘Arkadia’ ir ‘Kena DS’ žieminių kviečių skyresi. Didžiausias to paties izoliato inkubacinio periodo skirtumas tarp skirtingų veislių buvo 4 dienos (izoliatai rinkti Kėdainių, Raseinių, Radviliškio, Panevėžio, Pakruojo ir Kaišiadorių rajonuose). Tuo tarpu izoliatu iš Jonavos rajono inokuliuavus skirtingų veislių kviečius, latentinio periodo skirtumas tarp veislių siekė net

7 dienas. Tarp veislių ‘Arkadia’ ir ‘Kena DS’ augalų nustatytas taip pat ilgas (6 dienų) izoliatų rinktų Jurbarko, Šiaulių ir Vilniaus rajonuose, latentinio periodo skirtumas. *Z. tritici* latentinio periodo trukmei įtakos turi oro sąlygos (temperatūra, santykinė drėgmė, šviesos intensyvumas), augalo vystymosi tarpsnis infekcijos metu, taip pat veislė. Veislės turinčios didesnę atsparumą lemia ilgesnį latentinį periodą (Hehir et al., 2018, Précigout et al., 2020).

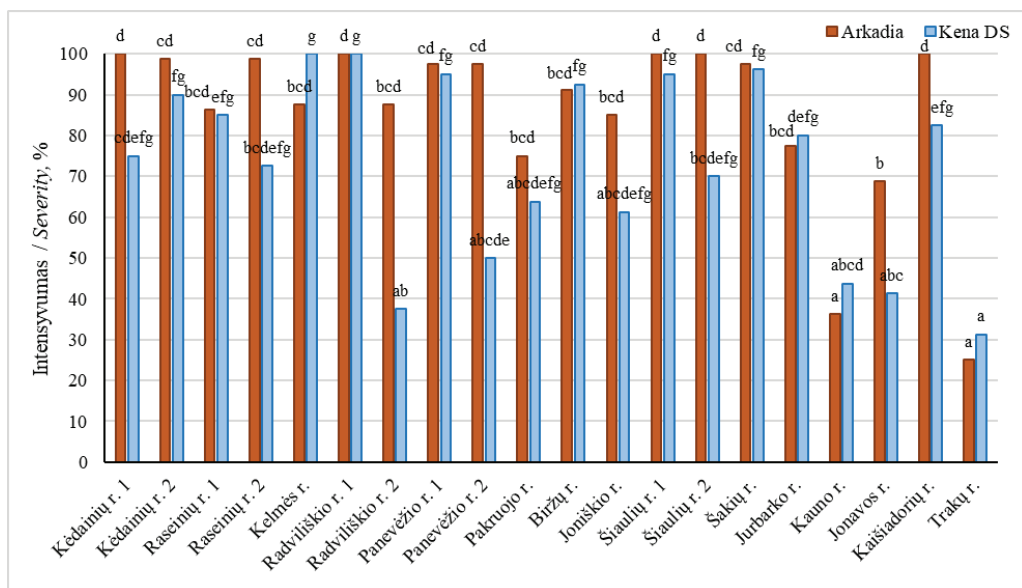
Siekiant nustatyti skirtingų izoliatų sukeltą ligos intensyvumą buvo atliktas vizualus infekcijos simptomų įvertinimas ant lapų po 24 dienų po inokuliacijos (dpi). Ligos intensyvumas 24 dpi 2019 metais veislės ‘Arkadia’ kviečiuose svyravo nuo 10,3 iki 100 % ir nuo 4 iki 100 % veislės ‘Kena DS’ kviečiuose (16 paveikslas). Mažiausias ligos intensyvumas nustatytas abiejų veislių augalus inokuliacijai Pasvalio rajono. Kėdainių, Raseinių ir Pakruojo rajonų (vidurio ir šiaurės Lietuvos) izoliatų ligos intensyvumas siekė 100 % abiejose veislėse.



16 paveikslas. *Z. tritici* infekcijos intensyvumas 24 dpi 2019 metais, tarp verčių, pažymėtų ta pačia raide, pagal Dunkano kriterijų ($P \leq 0,05$) esminių skirtumų nėra

Figure 16. *Z. tritici* infection severity 24 dpi in 2019, the differences between the values with the same letter was not significant according to Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$)

2019 metais net septynių izoliatų pažeidimo intensyvumas buvo žymiai didesnis ant veislės ‘Kena DS’ augalų. Šie duomenys yra šiek tiek kontraversiški, kadangi tyrimo metu buvo tikėtasi, kad ant jautresnės veislės augalų ligos intensyvumas bus didesnis. Didesnį pažeidimo intensyvumą galėjo lemti kai kurių izoliatų ilgesnis latentinis periodas ant veislės ‘Arkadia’ augalų tačiau dalis izoliatų turėjo panašią latentinio periodo trukmę abiejų veislių kviečiuose.

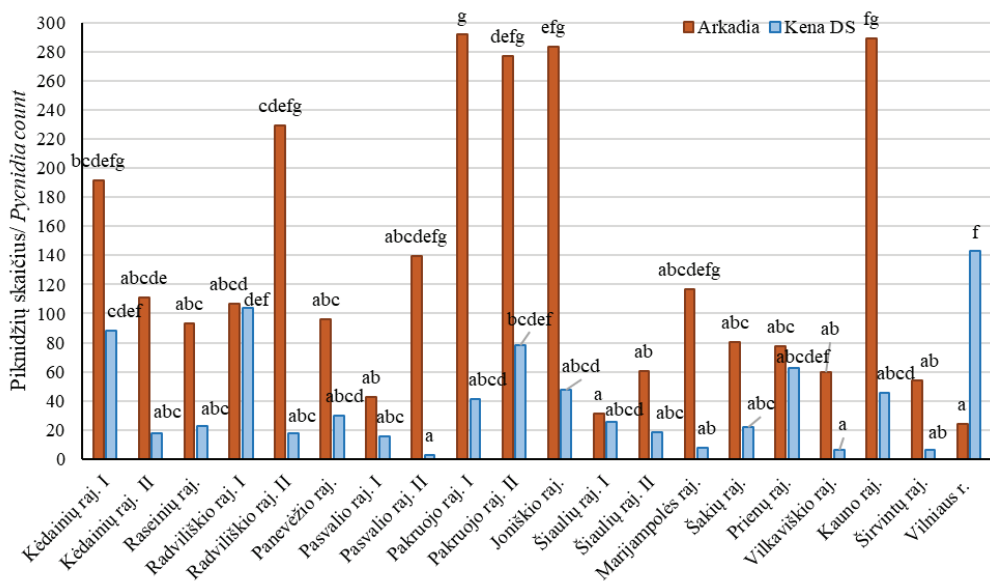


17 paveikslas. *Z. tritici* infekcijos intensyvumas 24 dpi 2020 metais, tarp verčių, pažymėtų ta pačia raide, pagal Dunkano kriterijų ($P \leq 0,05$) esminių skirtumų nėra

Figure 17. *Z. tritici* infection severity 24 dpi in 2020, the differences between the values with the same letter was not significant according to Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$)

2020 metais 24 dpi ligos intensyvumas veislių 'Arkadia' ir 'Kena DS' kviečiuose buvo 25 – 100 ir 31,3 – 100 %, atitinkamai (17 paveikslas). Mažiausias ligos intensyvumas abiejų veislių žieminiuose kviečiuose užfiksuotas izoliato iš Trakų rajono (Pietryčių Lietuva). Tuo tarpu didžiausias intensyvumas buvo iš Radviliškio ir Kelmės rajonų surinktais izoliatais inokuliuotų veislės 'Kena DS' žieminiai kviečiai ir iš Radviliškio, Kėdainių ir Šiaulių rajonų (centrinė ir šiaurės Lietuva) – veislės 'Arkadia' augalai.

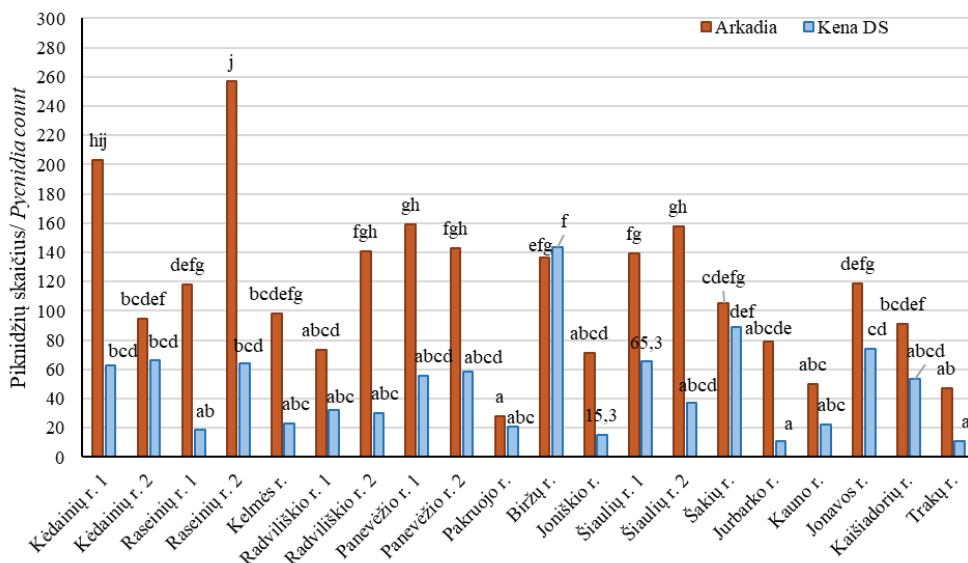
Z. tritici izoliatų sporuliacija įvertinta atsižvelgiant į suformuotų piknidžių skaičių. Abejais metais visi izoliatai formavo piknidžius ant abiejų veislių žieminių kviečių. Piknidžių skaičius svyravo nuo 3 iki 292 ir nuo 11 iki 257 2019 ir 2020 metais atitinkamai (18 ir 19 paveikslai). Abiem metais mažesnė sporuliacija pastebėta veislės 'Kena DS' augaluose; vidutinis piknidžių skaičius 2019 metais buvo 40,1, o 2020 metais – 47,7. Tuo tarpu veislės 'Arkadia' augaluose sporuliacija buvo daugiau nei du kartus didesnė – piknidžių skaičius vidutiniškai siekė 132,8 – 2019 m. ir 115,6 – 2020 metais.



18 paveikslas. *Zymoseptoria tritici* piknidžių skaičius 2019 metais, tarp verčių, pažymėtų ta pačia raide, pagal Dunkano kriterijų ($P \leq 0,05$) esminių skirtumų nėra

Figure 18. *Zymoseptoria tritici* pycnidia count in 2019, the differences between the values with the same letter was not significant according to Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$)

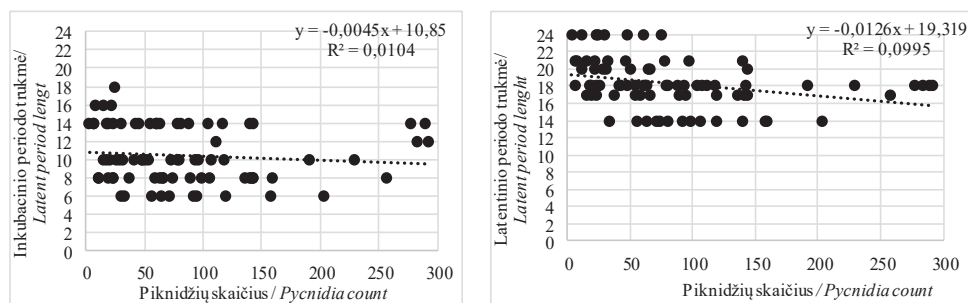
Nors bendros izoliatų piknidžių skaičiaus tendencijos abiejose veislėse buvo panašios, 2019 metais dviejų izoliatų vertės skirtingose veislėse buvo prieštaringos. Ant veislės 'Arkadia' augalų izoliatas iš Pasvalio (šiaurės Lietuva) rajono turėjo didelį piknidžių skaičių (140), tačiau ant veislės 'Kena DS' augalų piknidžių skaičius buvo žemas (3). Tuo tarpu izoliatas iš Vilniaus rajono (pietryčių Lietuva) ant veislės 'Kena DS' augalų suformavo 143 piknidžių, o ant veislės 'Arkadia' – 24. Morais et al. (2015) nustatė, kad *Z. tritici* izoliatai yra labiau prisitaikę sukelti ligą veislei, iš kurios jie buvo išskirti. Nors mūsų tirtų izoliatų originalios žeminių kviečių veislės nežinomos, mūsų surinkti duomenys gali būti sutapatinti su kitų tyrėjų išvadomis. Kaip teigia McDonald and Mundt (2016) ir Vagndorf et al. (2018), tų pačių veislių auginimas dideliuose plotuose ir intensyvus specifinių fungicidų naudojimas sudaro sąlygas *Z. tritici* keisti agresyvumą konkrečioms veislėms bei jautrumą fungicidams.



19 paveikslas. *Zymoseptoria tritici* piknidžių skaičius 2020 metais, tarp verčių, pažymėtų ta pačia raide, pagal Dunkano kriterijų ($P \leq 0,05$) esminių skirtumų nėra

Figure 19. *Zymoseptoria tritici* pycnidia count in 2020, the differences between the values with the same letter was not significant according to Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$)

Nors patogeniškumui įvertinti yra vertinami parametrai tokie kaip infekcijos efektyvumas, latentinis periodas, sporuliacija, infekcijos laikotarpis, pažeidimo dydis ir ligos intensyvumas, tačiau svarbiausi vis tik yra latentinis periodas (Lannou, 2012) ir sporų susidarymo intensyvumas (Rahman et al., 2020). Atlikus koreliacinę analizę (20 paveikslas), nustatyta, kad sporuliacijai įtakos turi tiek inkubacijos, tiek latentinio periodo trukmė.



20 paveikslas. *Z. tritici* izoliatų latentinio ir inkubacinio periodų įtaka sporuliacijai

Figure 20. Relationship between *Z. tritici* isolates latent and incubation periods and sporulation

Koreliacijos tarp sporuliacijos ir inkubacinių arba latentinių periodų parodė neigiamą ryšį tarp šių rodiklių (t.y. kuo ilgesnis inkubacinis ir latentinis laikotarpis, tuo mažesnė sporuliacija). Nors mūsų tyrimų duomenimis šis ryšys yra silpnas, tačiau Rahman et al. (2020), nustatė stiprų neigiamą ryšį tarp latentinio periodo ir sporuliacijos.

Apibendrinimas

Apibendrinant visus atliktus vertinimus nustatyta, kad skirtingų Z. tritici izoliatų agresyvumas varijavo. Kadangi izoliatai buvo surinkti iš skirtingų rajonų galima daryti prielaidą, kad Z. tritici agresyvumas gali skirtis priklausomai nuo regiono, tai sutaptų su kitų tyrėjų duomenimis (Ünal et al., 2017; Vagndorf et al., 2018). 2019 metais izoliatas iš Pasvalio rajono (Pasvalio raj. II, Šiaurės Lietuva) pasižymėjo ganėtinai ilgu latentiniu periodu, mažu ligos intensyvumu ir sporuliacija. Tuo tarpu 2020 metais izoliatas iš Trakų rajono (Pietryčių Lietuvos) galėtų būti laikomas mažiausiai agresyviu iš visų izoliatų. Šis izoliatas ant abiejų veislių turėjo ilgą latentinį periodą (24 dpi), mažą ligos intensyvumą ir mažiausią piknidžių skaičių. Sėjomaina, veislė, fungicidų naudojimo intensyvumas turi įtakos Z. tritici patogeniškumui (McDonald and Mundt, 2016; Vagndorf et al., 2018). Kadangi nėra žinoma kokios agrotechninės priemonės buvo naudotos mėginių rinkimo vietose tikėtina, kad nevienodus rezultatus atskirais metais lėmė būtent skirtingos auginimo sąlygos. Atlikus koreliacinę analizę, nustatyta, kad sporuliacijai įtakos turi tiek inkubacijos, tiek latentinio periodo trukmė. Koreliacijos tarp sporuliacijos ir inkubacinių arba latentinių periodų parodė neigiamą ryšį tarp šių rodiklių (t.y. kuo ilgesnis inkubacinis ir latentinis laikotarpis, tuo mažesnė sporuliacija).

3.4. Atsparumo fungicidams tyrimai

Atsparumas fungicidams dažniausiai nustatomas naudojant *in vitro* jautrumo fungicidams tyrimus (Samils et al., 2021). Tokiems tyrimams reikia išskirti ir kultivuoti atskiras grybų padermes, kurios vėliau tiriamos auginant mitybinėse terpėse, su skirtingomis fungicidų koncentracijomis. Mėginių palyginimui nustatoma efektyvi fungicido koncentracija, kuri veiksmingai slopina grybo augimą 50 % (t.y. EC50) (Oliver and Hewitt, 2014). Tobulėjant molekuliniais metodams, sukurta nemažai genetinės atrankos metodų, tokių kaip Sangerio sekvenavimas, PacBio sekvenavimas (Samils et al., 2021), TaqMan (KASP PGR) tyrimai, pagrįsti fluorescenciniais žymenimis pažymėtais, aleliams būdingais zondais (Schleinitz et al., 2011).

3.4.1. *Z. tritici* izoliatų jautrumas skirtingų grupių fungicidams

Izoliavus grybo kultūras atlikti fungicidų atsparumo tyrimai *in vitro* sąlygomis. Atsparumas vertintas šešioms skirtingoms veikliosioms medžiagoms, parinkus po 5 skirtingas koncentracijas. Įvertinti atsparumą buvo naudojamos vidutinės efektyvių fungicidų koncentracijos, kurios slopino *Z. tritici* augimą 50 %. Per trejus eksperimento vykdymo metus (2019–2021) buvo ištirti 85 izoliatai iš skirtingų vietovių. Įvertinus visų tyrimo metų duomenis matoma, kad tarp skirtingų veikliųjų medžiagų koncentracijų vidurkių buvo nemaži skirtumai (12 lentelė). Didžiausios koncentracijos nustatytos strobilurinių grupės fungicidams piraklostrobinui bei azoksistrobinui ir triazolų grupės fungicidui protiokonazolui. Šie skaičiai parodo padidėjusį *Z. tritici* atsparumą šiems fungicidams. Heick et al. (2017) dar 2014 metais nustatė kad, Lietuvos *Z. tritici* populiacijoje vidutinės EC50 vertės protiokonazolui buvo 7,98 mg l⁻¹, taigi lyginant pokytį per pastaruosius keletą metų situacija išliko nepakitusi. Tuo tarpu mažiausios koncentracijos nustatytos karboskamidų grupės fungicidams benzovindiflupirui, fluksapiroksadui bei biksafeniui. Visos šios veikliosios medžiagos buvo pradėtos naudoti Lietuvoje vėliau nei azoksistrobinas ar protiokonazolas, todėl galimai dėl šios priežasties atsparumas šioms medžiagoms kol kas nepadidėjo.

12 lentelė. Vidutinių efektyvių fungicidų koncentracijų, kurios slopino *Zymoseptoria tritici* augimą 50 %, palyginimas (EC50 mg l⁻¹)

Table 12. Comparison of mean effective fungicide concentrations that inhibited *Zymoseptoria tritici* growth by 50 % (EC50 mg l⁻¹)

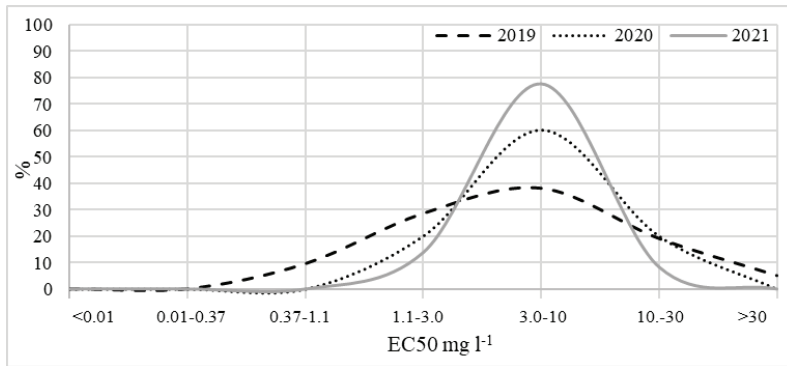
Veiklioji medžiaga / Active substance	2019	2020	2021
Benzovindiflupiras / <i>Benzovindiflupyr</i>	0,194 (0,019-0,444)	0,598 (0,153-1,597)	0,352 (0,014-1,961)
Fluksapiroksadas / <i>Fluxapyroxad</i>	0,260 (0,072-0,579)	0,564 (0,232-1,568)	0,277 (0,12-0,780)
Biksafenas / <i>Bixafen</i>	0,379 (0,081-1,594)	0,681 (0,171-2,602)	0,541 (0,059-2,862)
Azoksistrobinas / <i>Azoxystrobin</i>	6,292 (0,136-20,250)	4,864 (0,616-22,540)	9,787 (0,009-29,140)
Piraklostrobinas / <i>Pyraclostrobin</i>	2,816 (0,038-11,980)	10,990 (0,250-21,280)	11,754 (0,066-31,970)
Protiokonazolas / <i>Prothioconazole</i>	7,269 (0,636-39,520)	5,961 (1,404-18,570)	5,342 (1,341-12,160)
Mefentriflukonazolas/ <i>Mefentrifluconazole</i>	-	-	0,280 (0,010-1,700)
Fenpikoksamidai/ <i>Fenpicoxamide</i>	-	-	0,240 (0,060-0,950)

Pastaba. Skliaustuose nurodomas verčių intervalas. Note. In the brackets the range of the values are shown.

2021 metais atsparumo tyrimai taip pat atlikti su dviem naujomis veikliosiomis medžiagomis. Atlikus atsparumo mefentriflukonazolui tyrimą, nustatyta didelė EC50 verčių įvairovė. Šių skirtumų priežastis gali būti susijusi su ankstesniais rezultatais, rodančiais kryžminio atsparumo modelį. Užsienio tyrėjų duomenimis nustatyta stipri mefentriflukonazolo ir tebukonazolo bei difenokonazolo (Heick et al., 2020; Mäe et al., 2020) atsparumų koreliacija. Tuo tarpu fenpikoksamidas yra nauja fungicidų veiklioji medžiaga, pasižyminti nauju veikimo būdu (Qil) ir Lietuvoje įregistruota tik 2023 metų kovo mėnesį (VATŽUM, 2023). Fouche et al. (2021) susiejo *Cytb* mutaciją G37V su sumažėjusiu *Z. tritici* padermių jautrumu šiam fungicidui ir laboratorinių tyrimų metu nustatė, jog ši mutacija išsivysto gana greitai. Tuo tarpu kiti tyrėjai ištyrė *Z. tritici* populiacijas iš įvairių Europos valstybių, šios mutacijos nenustatė (Young et al., 2018; Kildea et al., 2022). Kadangi fenpikoksamidas Lietuvoje buvo įregistruotas šiais metais atsiranda G37V mutacijos atsiradimo ateityje rizika, todėl yra būtina vykdyti atsparumo šiam fungicidui stebėseną. Šiame tyrime buvo atliktas atsparumo fenpikoksamidui tyrimas; šie rezultatai gali pasitarnauti kaip baziniai jautrumo duomenys ateities tyrimuose. Įvertinus vidutines EC50 vertes matyti tik mažas svyravimas tarp atskirų izoliatų. Šio tyrimo duomenys taip pat sutampa su kitų tyrėjų duomenimis, kurie teigia, jog mutacija G143A neturi įtakos fenpikoksamido veiksmingumui (Young et al., 2018; Fouche et al., 2021).

Įvertinus efektyvių koncentracijų, kurios slopino *Z. tritici* augimą 50 % (EC50) pasiskirstymą tarp izoliatų 2019-2021 metais, nustatytas šių koncentracijų didėjimas visoms tirtoms veikliosioms medžiagoms (21 – 27 paveikslai).

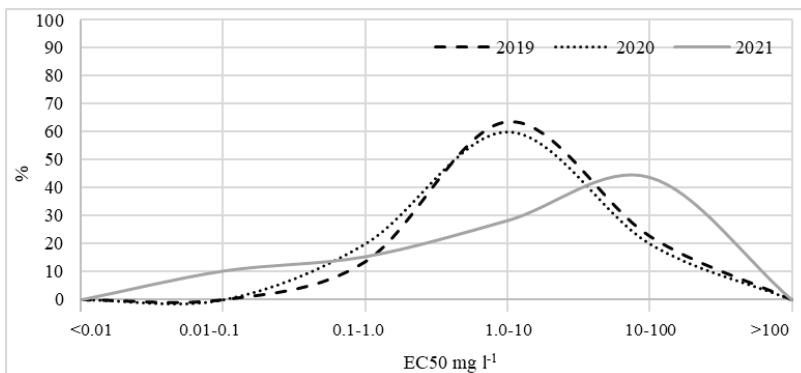
Atlikus analizę su triazolų grupės fungicidu protiokonazolu (21 paveikslas) nustatyta, kad didžiausias EC50 verčių dažnis 2019 metais buvo ties 3,0-10 mg l⁻¹, ir sudarė 38,1 % visų tirtų populiacijų. Sekančiais metais didžiausias šių verčių dažnis taip pat išliko ties 3,0-10 mg l⁻¹, tačiau padidėjo populiacijų turinčių šią vertę dalis, 2020 metais ji buvo 60 %, o 2021 – 77,8 %. Prieš dešimtmetį atliktų tyrimų duomenimis didžiausia dalis izoliatų taip pat turėjo EC50 vertes ties šiomis koncentracijomis (Ronis et al., 2014). 2019 net apie 10 % *Z. tritici* izoliatų EC50 vertės buvo ties žemesnėms protiokonazolo koncentracijoms (0,37-1,1 mg l⁻¹), tačiau 2020 ir 2021 metais nė vieno izoliato augimas nebuvo slopinamas esant šioms koncentracijoms.



21 paveikslas. Procentinis *Z. tritici* izoliatų pasiskirstymas pagal efektyvias fungicido protiokonazolo koncentracijas, kurios slopino patogeno augimą 50 % (EC50 mg l⁻¹), 2019–2021 metais

Figure 21. Percentage distribution of *Z. tritici* isolates according to the effective concentrations of the fungicide prothioconazole that inhibited the growth of the pathogen by 50% (EC50 mg l⁻¹) in 2019–2021

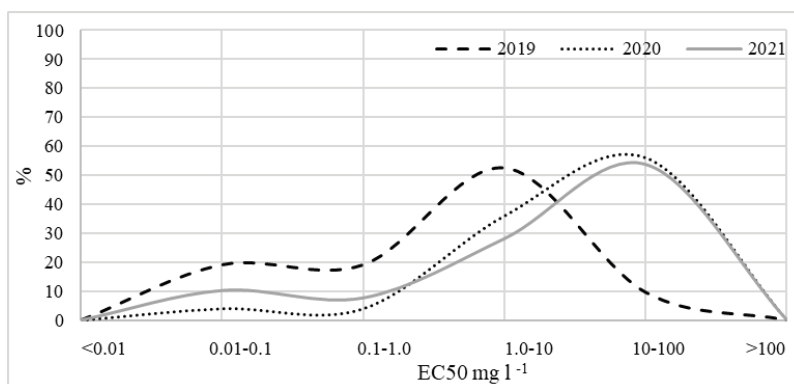
Atsparumo tyrimo strobilurinių grupės fungicidui azoksistrobinui rezultatai (22 paveikslas) rodo, kad didžiausias EC50 verčių dažnis 2019 bei 2020 metais buvo ties 1-10 mg l⁻¹. 2019 metais 63,4 %, o 2020 – 60 % izoliatų turėjo EC50 vertes ties minėtomis koncentracijomis. Sekančiais metais pastebėtas stiprus šių verčių padidėjimas, 2021 metais net 43,6 % izoliatų EC50 vertės buvo ties 10-100 mg l⁻¹. Tiesa tiek 2019, tiek 2020 metais dalis *Z. tritici* izoliatų jau turėjo šias EC50 vertes, 2019 – 22 %, o 2020 – 20 % izoliatų.



22 paveikslas. Procentinis *Z. tritici* izoliatų pasiskirstymas pagal fungicido azoksistrobino EC50 (mg l⁻¹) vertes 2019–2021 metais

Figure 22. Percentage distribution of *Z. tritici* isolates according to the EC50 values (mg l⁻¹) of the fungicide prothioconazole in 2019–2021

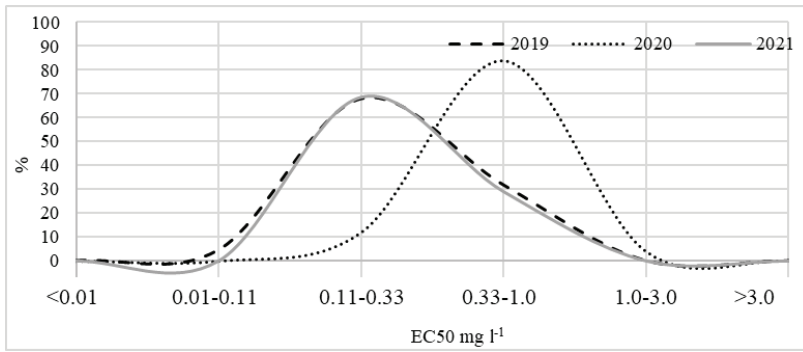
Procentinis *Z. tritici* izoliatų pasiskirstymas pagal efektyvias fungicido piraklostrobino koncentracijas (23 paveikslas), rodo kad didžiausias EC50 verčių dažnis 2019 metais buvo ties 1-10 mg l⁻¹. Kaip ir su ankstesniu strobilurinių grupės fungicidu taip ir su šiuo pastebėtas EC50 verčių didėjimas sekančiais metais. Didžiausias EC50 verčių dažnis 2020 ir 2021 metais buvo ties 10-100 mg l⁻¹. Šias vertes turėjo 56 % ir 53,8 % izoliatų, 2020 ir 2021 metais atitinkamai.



23 paveikslas. Procentinis *Z. tritici* izoliatų pasiskirstymas pagal fungicido piraklostrobino EC50 vertes (mg l⁻¹) 2019–2021 metais

Figure 23. Percentage distribution of the *Z. tritici* isolates according to the EC50 values (mg l⁻¹) of the fungicide pyraclostrobin over 2019–2021

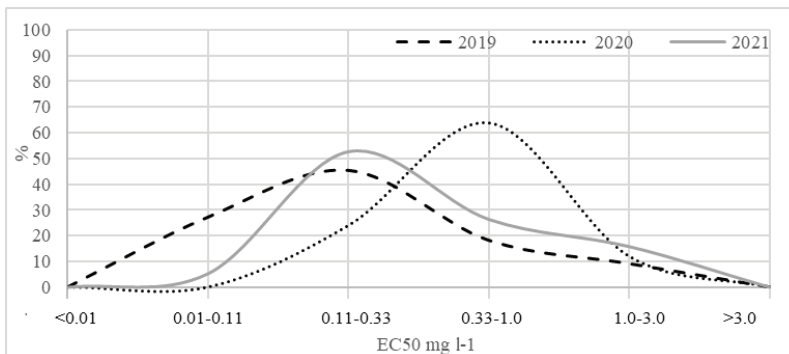
Procentinis *Z. tritici* izoliatų pasiskirstymas pagal efektyvias fungicido fluksapiroksado koncentracijas 2019 metais rodo didžiausią EC50 verčių dažnį ties 0,11-0,33 mg l⁻¹ (24 paveikslas). Nors 2020 metais pastebėtas ryškus EC50 verčių poslinkis į didesniąją pusę, ir net 84 % izoliatų EC vertės buvo ties 0,33-1,0 mg l⁻¹, tačiau 2021 metais daugiau kaip pusė *Z. tritici* izoliatų vis tik turėjo EC50 vertes ties 0,11-0,33 mg l⁻¹. Tokie svyravimai tarp metų yra dažnai pastebimi panašiuose tyrimuose (Heick et al., 2020; Kiiker et al., 2021), juos lemia didelė genetinė *Z. tritici* įvairovė ne tik regione ir ant lapo, bet net ir tarp piknidžių vienoje septoriozės dėmėje. Dauguma populiacijų ar atsparumo fungicidams tyrimų apima tik vieną izoliatą vienam lapui, o tyrimuose, kurie apima daugiau nei vieną izoliatą vienam lapui, paprastai nurodoma daugiau nei vienas unikalus genotipas vienam pažeistam lapui (Linde et al., 2002; Jürgens et al., 2006).



24 paveikslas. Procentinis *Z. tritici* izoliatų pasiskirstymas pagal fungicido fluksapiroksado EC50 vertes (mg l⁻¹) 2019–2021 metais

Figure 24. Percentage distribution of the *Z. tritici* isolates according to the EC50 values (mg l⁻¹) of the fungicide fluxapyroxad over 2019–2021

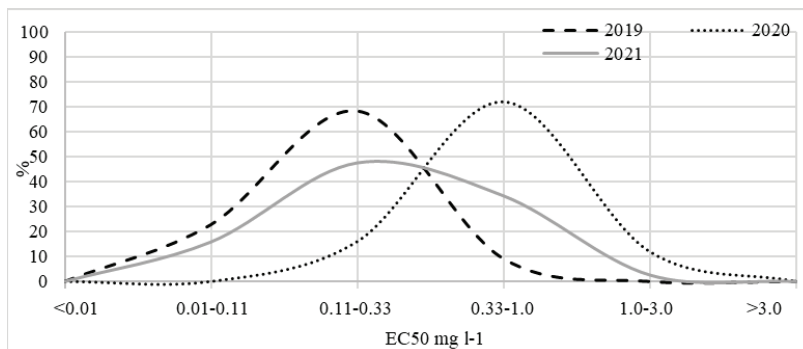
Įvertinus *Z. tritici* izoliatų pasiskirstymą pagal EC50 vertes karboksamidų grupės fungicidui biksafeniui (25 paveikslas), matomas panašus duomenų svyravimas tarp metų kaip ir su kitu šios grupės fungicidu fluksapiroksadu. 2019 metais didžioji dalis (45,5 %) izoliatų turėjo EC50 vertes ties koncentracija 0,11-0,33 mg l⁻¹, o 2020 metais 64 % izoliatų šios vertės buvo ties 0,33-1,0 mg l⁻¹ koncentracija. 2021 metais 52,6 % izoliatų EC50 vertės buvo ties 0,11-0,33 mg l⁻¹, kiek daugiau negu ketvirtadalis izoliatų turėjo šias vertes ties 0,33-1,0 mg l⁻¹ ir 15,8 % izoliatų EC50 vertės buvo didesnės negu 1 mg l⁻¹, taigi net 40 % *Z. tritici* izoliatų 2021 metais turėjo EC50 vertes didesnes negu 0,33 mg l⁻¹. Taip matomas aiškus pokytis į didesnes koncentracijas tarp 2019 ir 2021 metų, kadangi 2019 metais tik 28 % izoliatų turėjo EC50 vertes didesnes nei 0,33 mg l⁻¹. Tai taip pat pastebima tarp vidutinių EC50 reikšmių su šiuo fungicidu.



25 paveikslas. Procentinis *Z. tritici* izoliatų pasiskirstymas pagal fungicido biksafeno EC50 vertes (mg l⁻¹) 2019–2021 metais

Figure 25. Percentage distribution of the *Z. tritici* isolates according to the EC50 values (mg l⁻¹) of the fungicide bixafen over 2019–2021

Kaip ir su anksčiau aprašytais karboksamidų grupės fungicidais taip ir su kitu šios grupės atstovu benzovindiflupiru 2020 metais pastebėtas ryškus poslinkis į didesnes koncentracijas (26 paveikslas). Procentinis *Z. tritici* izoliatų pasiskirstymas pagal EC50 vertes rodo, kad 2019 metais 68,2 % izoliatų šios vertės buvo ties 0,11-0,33 mg l⁻¹, tuo tarpu 2020 metais 72 % izoliatų šios vertės buvo ties 0,33-1,0 mg l⁻¹. Nors tarp 2019 bei 2020 pastebėtas ryškus izoliatų EC50 pokytis į didesnes vertes, tačiau 2021 metų izoliatų EC50 verčių pasiskirstymas yra per vidurį lyginant su ankstesniais metais, 47,4 % izoliatų EC50 vertės buvo ties 0,11-0,33 mg l⁻¹ ir 34,2 % – ties 0,33-1,0 mg l⁻¹.



26 paveikslas. Procentinis *Z. tritici* izoliatų pasiskirstymas pagal fungicido benzovindiflupiro EC50 vertes (mg l⁻¹) 2019–2021 metais

Figure 26. Percentage distribution of the *Z. tritici* isolates according to the EC50 values (mg l⁻¹) of the fungicide benzovindiflupyr over 2019–2021

Įvertinus EC50 koncentracijų pasiskirstymo pokytį per tris tyrimo metus mažiausias pokytis pastebėtas su fungicidu protiokonazolu. Tai sutampa su kitų tyrėjų pastebėjimais, kad 2019 metais pastebėtas jautrumo šiam fungicidui kitimo nusistovėjimas. Tiesa šie pastebėjimai dažniausiai liečia tik tas *Z. tritici* padermes, kuriose nėra padidėjęs CYP51 geno raiškos ar kryžminio atsparumo (Heick et al., 2020).

Apibendrinimas

2019-2021 metais atlikus fungicidų *in vitro* testą *Z. tritici* atsparumo fungicidams nustatymui, bei įvertinus vidutines efektyvias koncentracijas, kurios slopino *Z. tritici* augimą 50 %, nustatyta, kad Lietuvos *Z. tritici* populiacija turi padidėjusį atsparumą QoI grupės fungicidams piraklostrobinui ir azoksistrobinui bei DMI grupės fungicidui protiokonazolui. SDHI grupės fungicidams (fluksapiroksadui, biksafenui ir benzovindiflupirui) bei naujoms veikliosioms medžiagoms mefentriflukonazolui (DMI grupė) bei fenpikoksamidui (QiI grupė) atsparumo padidėjimas nenustatytas. Tuo tarpu įvertinus EC50 verčių pasiskirstymą tarp

izoliatų nustatytas nežymus, bet nuoseklus jų didėjimas. Per tris tyrimo metus mažiausias EC50 koncentracijų pasiskirstymo pokytis pastebėtas su fungicidu protiokonazolu.

3.4.2. Mutacijų bei kitų mechanizmų lemiančių atsparumą fungicidams identifikavimas

Z. tritici izoliatai buvo ištirti siekiant nustatyti, ar juose yra *Cytb* geno mutacija G143A, kuri yra siejama su dideliu atsparumu QoI fungicidams. Tyrimas atliktas su 2019 (113) bei 2021 (42) metų izoliatais. Ši mutacija nustatyta 59,3 % (67 iš 113) izoliatų 2019 metais, bei 76,2 % (32 iš 42) izoliatų 2021 metais (13 lentelė). Šio tyrimo rezultatai parodė, kad šios mutacijos dažnis Lietuvos *Z. tritici* populiacijoje 2021 metais šiek tiek padidėjo, palyginti su Mäe et al. (2020) gautais rezultatais, o per pastaruosius aštuonerius metus jis padidėjo net keturis kartus (Heick et al., 2017).

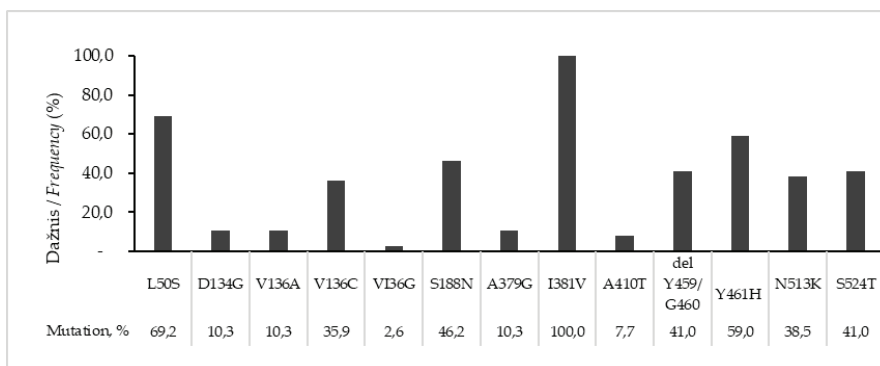
13 lentelė. Mutacijų lemiančių atsparumą strobilurinams ir karboksamidams dažnis Lietuvos *Z. tritici* populiacijoje 2019 ir 2021 metais

Table 13. Frequency of mutations conferring resistance to QoI and SDHI fungicides in Lithuanian *Z. tritici* population 2019 and 2021

Mutacija / Mutation	Laukinis tipas / Wild type	Turintys mutaciją / With mutation	Dažnis (%) / Frequency
2019			
G143A	46	67	59.3
N86S	113	0	0
T79N	113	0	0
2021			
G143A	10	32	76.2
N86S	42	0	0
T79N	42	0	0

Zymoseptoria tritici izoliatai 2019 bei 2021 metais taip pat buvo tirti siekiant identifikuoti mutacijas lemiančias atsparumą SDHI grupės fungicidams. Nors SDH C subvieneto mutacijų susijusių su mažesniu jautrumu SDHI grupės fungicidams yra daug, dažniausiai pasitaikančios yra T79N ir N86S (Rehfus et al., 2018; Helin et al., 2021; Jørgensen et al., 2022). Šio tyrimo duomenimis mutacijos C-T79N ir C-N86S nebuvo aptiktos *Z. tritici* izoliatuose. Nors 2019 metais nė viena iš šių mutacijų nebuvo nustatyta Estijoje ir Latvijoje (Hellin et al., 2021), tačiau 2020 metais nedideli kiekiai jau buvo aptikti Estijos *Z. tritici* populiacijoje (Kiiker et al., 2021). Lenkijoje ši mutacija buvo identifikuota 2021 metais (Jørgensen et al., 2022).

Atlikus 2021 metų *Z. tritici* izoliatų sekoskaitą, kiekviename izoliate nustatytos mažiausiai trys mutacijos. Iš viso tarp 39 izoliatų aptikta 13 skirtingų tikslinės vietos pakitimų (27 paveikslas). Dažniausiai pasitaikanti mutacija I381V buvo nustatyta visuose izoliatuose, taip išlikdama dominuojančia mutacija Lietuvoje (Heick et al., 2017; Vagndorf et al., 2018; Mäe et al., 2020).



27 paveikslas. CYP51 geno mutacijų įtakojančios atsparumo triazolų grupės fungicidams atsiradimą dažnis Lietuvos *Z. tritici* populiacijoje 2021 metais

Figure 27. Frequency (%) of the mutations conferring resistance to DMI fungicides in *Z. tritici* isolates from Lithuania in 2021

Amino rūgščių 459-461 pozicijose aptiktos dvi skirtingos modifikacijos: Y459 ir G460 delecija arba pakeitimas Y461H. Pastarasis pakeitimas aptiktas 59 % izoliatų, o likusiuose 41 % izoliatų buvo nustatyta Y459 ir G460 delecija. Kita dažnai aptinkama mutacija buvo L50S; šis pakeitimas nustatytas beveik 70 % izoliatų. Mutacijos L50S, S188N bei N513K pavieniui dažniausiai nėra siejamos su padidėjusiu atsparumu triazolų grupės fungicidams (Leroux et al., 2007), tačiau jos yra įtraukiamos į tokio pobūdžio tyrimus, nes yra aptinkamos deriniuose su kitomis mutacijomis (Cools and Fraaje, 2013). Nustatyta, kad galutinį *Z. tritici* atsparumą nulemia ne pavienės mutacijos, o specifinės jų kombinacijos (Mäe et al., 2020). Mutacija S524T, susijusi su sumažėjusiu jautrumu daugeliui triazolų, nustatyta 41 % izoliatų. Kaip pastebėta per pastarąjį dešimtmetį, Lietuvos *Z. tritici* populiacijoje pastebima mutacijų S524T ir V136C dažnio didėjimo tendencija (Wieczorek et al., 2015; Heick et al., 2017; Mäe et al., 2020). Šio tyrimo duomenimis tik 1 iš 16 izoliatų turinčių mutaciją S524T neturėjo mutacijos V136C, o ši kombinacija yra siejama su esmine įtaka atsparumui triazolams (Cools et al., 2011). Taip pat pastebėta, kad nors nežinoma, ar mefentriflukonazolas lemia specifines mutacijas, tačiau izoliatų, turinčių mutaciją A410T (7,7 %), EC50 vertės mefentriflukonazoliu buvo didesnės.

Įvertinus 39 *Z. tritici* izoliatų identifikuoti devyni CYP51 haplotipai (14 lentelė). Dažniausias haplotipas buvo D13, šį haplotipą atitinkantį mutacijų derinį turėjo 30,8 % izoliatų. D13 haplotipo izoliatai turi keturių mutacijų derinį: V136C, I381V, Y461H, S524T. Kitas dažniausiai identifikuotas haplotipas buvo F2 (L50S, S188N, I381V, Del459/460, N513K), 28,2 % izoliatų priskirti šiam haplotipui. Haplotipas C8 (L50S, I381V, Y461H) identifikuotas 10,3 % izoliatų, šie trys haplotipai sudarė beveik 70 procentų visų *Z. tritici* izoliatų Lietuvoje.

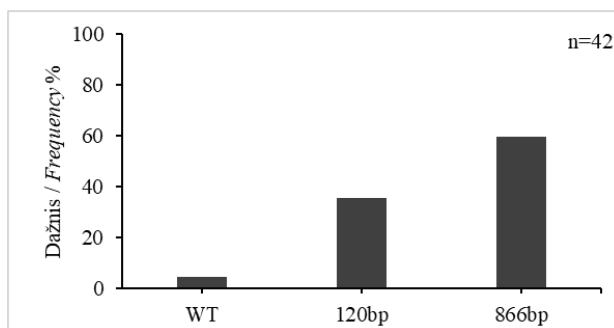
Tuo tarpu pagal Huf et al. (2018) kaimyninėje Lenkijoje dominuojantys haplotipai 2016 metais buvo C8 bei E4. Dviejų izoliatų haplotipai nebuvo identifikuoti, kadangi Huf et al. (2018) pateiktame sąrašė šių kombinacijų nebuvo. Vienas iš jų turėjo šiuos CYP51 pakeitimus L50S, S188N, A379G, I381V, A410T, Del459/460. Kitame buvo nustatytos šios mutacijos L50S, V136G, S188N, I381V, Del459/460, N513K.

14 lentelė. Lietuvos izoliatuose nustatytų *Z. tritici* CYP51 haplotipų dažnis ir juose esančių tikslinių mutacijų pozicijos

Table 14. The frequency of CYP51 haplotypes of *Z. tritici* found in the isolates from Lithuania and positions of target site mutations they contain

Haplotipai/ Haplotypes	Tikslinės vietos mutacijų pozicijos/ Position of target site mutation												Dažnis / Frequency (%)
	L50	D134	V136	S188	A379	I381	A410	Y459	G460	Y461	N513	S524	
C8	S	-	-	-	-	V	-	-	-	H	-	-	10.3
D13	-	-	C	-	-	V	-	-	-	H	-	T	30.8
E4	S	G	A	-	-	V	-	-	-	H	-	-	7.7
E7	S	-	C	-	-	V	-	-	-	H	-	T	2.6
F2	S	-	-	N	-	V	-	del	del	-	K	-	28.2
F4	S	-	C	N	-	V	-	-	-	H	-	T	5.1
F8	S	G	A	-	-	V	-	-	-	H	-	T	2.6
G1	S	-	-	N	G	V	-	del	del	-	K	-	2.6
H5	S	-	-	N	G	V	T	del	del	-	K	-	5.1

Siekiant nustatyti ar *Z. tritici* izoliatų geno CYP51 raiška yra padidėjusi, buvo atlikta PGR analizė intarpų geno promotoriaus *MgCYP51* regione nustatymui. Šios analizės buvo atliktos 2021 metais su 42 *Z. tritici* izoliatais (gauta CYP51 promotoriaus srities intarpų elektroforezės gelio nuotrauka pateikta 3 priede). Iš visų tirtų izoliatų dviejuose neaptikta jokių intarpų, šie izoliatai yra laikomi laukinio tipo (28 paveikslas).



28 paveikslas. Intarpų į CYP51 geno promotoriaus sritį dažnis (%) *Z. tritici* izoliatuose iš Lietuvos, 2021 metais

Figure 28. Frequency of inserts in the promoter region of the CYP51 gene (%) in *Z. tritici* isolates from Lithuania in 2021

Didžioji dauguma izoliatų (59,5 %) turėjo 866 bp ilgio intarpus. Pastarasis intarpas Lietuvos *Z. tritici* izoliatuose nustatytas dar 2017 metais (Heick et al., 2017). Tuo tarpu 120 bp ilgio intarpas rastas 35,7 % izoliatų. O 120 bp ilgio intarpas pirmą kartą aptiktas tik 2020 metais (Mäe et al., 2020). Mūsų tyrimo rezultatai parodė, kad pastarųjų dažnis patogeno populiacijoje padidėjo. Kaip ir kitų šalių tyrimuose (Cools et al., 2017; Huf et al., 2018) 120 bp ilgio intarpas buvo nustatytas izoliatuose, dažniausiai turinčiuose CYP51 haplotipą F2 (L50S, S188N, I381V, Del459/460, N513K).

Tuo tarpu atlikus padidėjusią *MgMFS1* geno raišką lemiančių intarpų nustatymo tyrimą, nė vienas iš anksčiau aprašytų intarpų nebuvo aptiktas, tačiau rastas vienas intarpas, apie kurį nebuvo pranešta anksčiau. Pirminiai tyrimai leidžia manyti, kad šis naujas intarpas nėra susijęs su padidėjusia *MgMFS1* geno raiška. Taigi nė vienas 2021 metų *Z. tritici* izoliatas neturėjo kryžminio atsparumo fungicidams.

Apibendrinimas

Atlikus molekulinis tyrimus mutacijų bei kitų mechanizmų lemiančių atsparumo fungicidams išsivystymą Z. tritici nustatyta, kad 2021 metais daugiau nei 3/4 izoliatų turėjo mutaciją G143A, kuri gali lemti visišką atsparumą QoI grupės fungicidams. Tuo tarpu mutacijos C-T79N ir C-N86S nebuvo aptiktos nė viename izoliate, tai paaiškina mažas SDHI grupės fungicidų EC50 vertes in vitro tyrimuose. Kaip aprašyta anksčiau, Z. tritici atsparumą DMI grupės fungicidams lemti gali keli mechanizmai. Pirmasis jų yra mutacijos. Įvertinus mutacijų kiekį izoliatuose nustatyta, kad kiekvienas izoliatas turėjo bent tris tikslinės vietos mutacijas. Net 41 % izoliatų turėjo mutaciją S524T, kuri yra siejama su atsparumo atsiradimu daugeliui šios grupės fungicidų. Antrasis mechanizmas yra padidėjusi geno CYP51 raiška, kurią lemia intarpai geno promotoriaus MgCYP51 regione. Nustatyta, kad tik 2 izoliatai neturėjo jokio intarpo. Nors didžioji dauguma izoliatų (59,5 %) turėjo 866 bp ilgio intarpus, tačiau su atsparumo atsiradimu dažniausiai yra siejamas 120 bp ilgio intarpas (Cools et al., 2012). Mūsų tyrimo duomenimis šiek tiek daugiau nei 1/3 izoliatų turėjo tokio ilgio intarpą. Trečiasis mechanizmas yra padidėjusi MgMFS1 geno raiška, dar vadinama kryžminiu atsparumu, kurią lemia intarpai MgMFS1 gene. Kryžminis atsparumas Z. tritici izoliatuose nebuvo nustatytas.

3.4.3. Fungicidų efektyvumas *Z. tritici* kontrolei

Nors patogenų atsparumas fungicidams gali būti pastebėtas laboratorijoje, tačiau prieš darant išvadas apie populiacijos atsparumą tam tikrame regione, būtina atlikti lauko bandymus ir įvertinti fungicido efektyvumą lauko sąlygomis (Brent and Hollomon, 2007). Pagrindinė priežastis, dėl kurios dažnai gali būti sunku susieti *in vitro* tyrimų rezultatus su veiksmingumu lauko bandymuose, yra ta, kad *Z. tritici* populiacija gali būti labai nevienalytė viename regione

ar net viename lauke (Stammler and Semar, 2011). Būtent dėl šios priežasties fungicidų, turinčių skirtingą veikimo būdą, veiksmingumas lauke buvo nustatytas įvertinus lapų septoriozės pažeisto lapų ploto sezono metu indekso (AUDPC) reikšmes. Lauko eksperimentai buvo atlikti 2020–2022 m., tyrimų metu vidutinės AUDPC reikšmės svyravo nuo 32,78 iki 184,53 (15 lentelė).

15 lentelė. Skirtingų fungicidų įtaka lapų septoriozės intensyvumui 2020–2022 metais

Table 15. Effect of different fungicides on STB severity in 2020–2022

Variantas / Treatment	AUDPC		
	2020	2021	2022
Nepurkšta / Untreated	184,53 d	133,26 e	177,57 h
Azoksistrobinas / Azoxystrobin 250 g l ⁻¹	106,95 c	81,75 d	136,85 g
Piraklostrobinas / Pyraclostrobin 250 g l ⁻¹	88,32 c	60,45 abc	118,89 f
Fluksapiroksadas / Fluxapyroxad 62,5 g l ⁻¹	43,65 a	49,19 a	33,22 ab
Benzovindiflupiras / Benzovindiflupyr 100 g l ⁻¹	46,74 ab	65,50 bcd	43,56 d
Protiokonazolas / Prothioconazole 250 g l ⁻¹	99,91 c	76,81 cd	69,15 e
Fluksapiroksadas / Fluxapyroxad 75 g l ⁻¹ + piraklostrobinas / pyraclostrobin 150 g l ⁻¹	46,49 ab	53,67 ab	32,78 a
Benzovindiflupiras / benzovindiflupyr 75 g l ⁻¹ + protiokonazolas / prothioconazole 150 g l ⁻¹	44,40 a	53,24 ab	37,14 bc
Biksafenas / Bixafen 60 g l ⁻¹ + Protiokonazolas / prothioconazole 200 g l ⁻¹	64,79 b	50,27 ab	40,69 cd

Pastaba. Tarp verčių, pažymėtų ta pačia raide, pagal Dunkano kriterijų ($P \leq 0.05$) esminių skirtumų nėra

Note. The difference between the values with the same letter was not significant at $P \leq 0.05$ according to Duncan's multiple range test.

Lauko tyrimų rezultatai, fungicidus sezono metu panaudojus vieną kartą, parodė vidutinę lapų septoriozės kontrolę, tačiau visais atvejais ligos kontrolė buvo statistiškai reikšminga. Fluksapiroksadas, naudotas kaip fungicidas su viena veikliąja medžiaga, pasižymėjo didžiausiu veiksmingumu visais tyrimų metais, sumažindamas AUDPC atitinkamai 76,2, 63,1 ir 81,3 % – 2020, 2021 bei 2022 metais. Tuo tarpu azoksistrobino veiksmingumas buvo mažiausias – 2020, 2021 ir 2022 metais atitinkamai 42,0, 38,7 ir 22,9 %. Triazolų grupės fungicido protiokonazolo efektyvumas kontroliuojant lapų septoriozę panaudojus jį vieną kartą tyrimų metais svyravo nuo 42,4 % iki 61,1 %, šie rezultatai sutampa su kitų tyrėjų Europoje duomenimis (Jørgensen et al., 2022). Lyginant fungicidų turinčių vieną veikliąją medžiagą efektyvumą su fungicidais, kurie turėjo po dvi veikliąsias medžiagas iš skirtingų cheminių grupių, nustatyta kad visais tyrimų metais mišiniai turėjo panašų veiksmingumą kaip fluksapiroksadas. Tam įtakos galėjo turėti tai, jog kiekvienas iš šių mišinių turėjo po SDHI grupės fungicidą kaip vieną iš veikliųjų medžiagų.

Įvertinus skirtingų fungicidų įtaka žieminių kviečių derlingumui 2020–2022 metais nustatyta (16 lentelė), jog tarp fungicidų turinčių vieną veikliąją medžiagą, karboksamidų grupės fungicidai benzovindiflupiras bei fluksapiroksadas turėjo didžiausią įtaką žieminių kviečių derlingumui. Visais trejais tyrimų metais strobilurinių grupės fungicidas piraklostrobinas nors ir turėjo teigiamos įtakos žieminių kviečių derlingumui, tačiau derliaus pokytis buvo statistiškai nereikšmingas. Vertinant atskirų metų duomenis 2019 metais fluksapiroksadas vienintelis turėjo statistiškai patikimą teigiamą įtaką. Tuo tarpu 2020 metais visi naudoti fungicidai išskyrus piraklostrobiną turėjo statistiškai reikšmingą įtaką žieminių kviečių derlingumui. O 2022 metais tik strobilurinių grupės fungicidai azoksistrobinas bei piraklostrobinas neturėjo statistiškai reikšmingos įtakos derlingumui. Nustatyta, kad fungicidų su dviem veikliosiomis medžiagomis įtaką žieminių kviečių derlingumui buvo panaši arba artima fungicido su fluksapiroksadu įtakai.

16 lentelė. Skirtingų fungicidų įtaka ($t\ ha^{-1}$) žieminių kviečių derlingumui 2020–2022 metais

Table 16. Effect of different fungicides ($t\ ha^{-1}$) on the yield of winter wheat in 2020–2022

Variantas / Treatment	Derlingumas, $t\ ha^{-1}$ Yield, $t\ ha^{-1}$		
	2020	2021	2022
Nepurkšta / Untreated	8,89 a	6,93 a	8,08 a
Azoksistrobinas / Azoxystrobin 250 $g\ l^{-1}$	8,90 abc	7,45 bcd	8,32 a
Piraklostrobinas / Pyraclostrobin 250 $g\ l^{-1}$	9,05 abc	7,08 ab	8,16 a
Fluksapiroksadas / Fluxapyroxad 62,5 $g\ l^{-1}$	9,34 c	7,92 ef	8,89 bc
Benzovindiflupiras / Benzovindiflupyr 100 $g\ l^{-1}$	9,17 abc	7,31 bc	9,05 cde
Protiokonazolas / Prothioconazole 250 $g\ l^{-1}$	9,15 abc	7,74 def	8,69 b
Fluksapiroksadas / Fluxapyroxad 75 $g\ l^{-1}$ + piraklostrobinas / pyraclostrobin 150 $g\ l^{-1}$	9,31 abc	7,62 cdef	9,23 de
Benzovindiflupiras / benzovindiflupyr 75 $g\ l^{-1}$ + protiokonazolas / prothioconazole 150 $g\ l^{-1}$	9,24 abc	7,99 f	9,26 e
Biksafenas / Bixafen 60 $g\ l^{-1}$ + Protiokonazolas / prothioconazole 200 $g\ l^{-1}$	9,19 abc	7,72 def	9,10 cde

Pastaba. Tarp verčių, pažymėtų ta pačia raide, pagal Dunkano kriterijų ($P \leq 0,05$) esminių skirtumų nėra

Note. The difference between the values with the same letter was not significant at $P \leq 0.05$ according to Duncan's multiple range test.

Europos tyrėjų duomenimis protiokonazolas padidina kviečių derlingumą 7,2 % (Jørgensen et al., 2022). Mūsų gautais duomenimis nors ir buvo variacija tarp skirtingų metų, tačiau apibendrinus trijų metų duomenis jie sutampa su Europos tyrėjų rezultatais.

Apibendrinimas

Trijų metų lauko eksperimentų duomenimis SDHI grupės fungicidai turėjo didžiausią statistiškai patikimą veiksmingumą kontroliuojant lapų septoriozę bei labiausiai didino žieminių kviečių derlingumą. Mažiausią veiksmingumą bei įtaką derlingumui turėjo azoksistrobinas bei piraklostrobinas. Dabartinė Z. tritici atsparumo fungicidams būklė Lietuvoje atitinka kitose Europos šalyse stebimas tendencijas. Nors QoI grupės fungicidų lauko veiksmingumą labai sumažino G143A tikslinės vietos mutacijos atsiradimas ir išplitimas, tuo tarpu DMI fungicidų lauko veiksmingumas kinta palaipsniui. Tai siejama su CYP51 mutacijų kombinacijų sudėtingumu ir ryškesniu kryžminio atsparumo modeliu. Apibendrinant visų atliktų tyrimų rezultatus galima teigti, kad tiek atsparumo fungicidams in vitro tiek mutacijų identifikavimo patogeno genome bei lauko tyrimų duomenys rodo padidėjusį Lietuvos Z. tritici populiacijos atsparumą strobilurinių grupės fungicidams, bei triazolų grupės fungicidams. Siekiant pratęsti tiek senų, tiek naujų veikliųjų medžiagų ilgaamžiškumą, būtina integruoti kovos su atsparumo vystymusi priemones, įtrauktas į IKOK rekomendacijas.

IŠVADOS

1. Įvertinus trijų metų duomenis, išryškėjo gausios askosporų plitimo laikotarpiai: rudenį – spalio mėnesį, o intensyvaus augalų vystymosi periodu – gegužės mėnesį. Taigi, oru plintančios lytinės *Z. tritici* askosporos Lietuvoje gali būti ne tik kaip pirminio užkrato šaltinis rudenį, bet ir kaip potencialus antrinis užkrato šaltinis pavasarį atsinaujinus augalų vegetacijai.
2. Pearsono koreliacinė analizė parodė stiprų ryšį tarp lapų septoriozės ir *Zymoseptoria tritici* DNR kiekio kviečių lapuose, abiejose sėjomainose.
3. Eksperimento vykdymo laikotarpiu nevienodos oro sąlygos lėmė žieminių kviečių lapų septoriozės intensyvumo skirtumus skirtingų rotacijų sėjomainose. Didesnis ligos intensyvumas dažniau buvo nustatytas po nemiglinių augalų augintuose žieminiuose kviečiuose.
4. Tyrimo duomenimis veiksmingesnė lapų septoriozės kontrolė buvo, kai fungicido panaudojimo laikas buvo pasirinktas atsižvelgiant į oro sąlygas (t.y. dienų skaičių po iškritusių kritulių) ir fungicidas buvo naudojamas du kartus.
5. Atlikus *Z. tritici* patogeniškumo testą nustatyta, kad izoliatai iš skirtingų rajonų skyrėsi savo agresyvumu. Koreliacijos tarp sporuliacijos ir inkubacinių arba latentinių periodų parodė neigiamą ryšį tarp šių rodiklių (t.y. kuo ilgesnis inkubacinis ir latentinis laikotarpis, tuo mažesnė sporuliacija).
6. Įvertinus *Zymoseptoria tritici* izoliatų surinktų Lietuvoje atsparumo lygį įvairiems fungicidams bei nustatius tai lemiančių mutacijų kiekį izoliatuose nustatytas atsparumo padidėjimas strobilurinių bei triazolų grupių fungicidams Lietuvos *Z. tritici* populiacijoje.
7. Trijų metų lauko eksperimentų duomenimis nustatyta, kad geriausiai lapų septoriozės infekcijos plitimą stabdo bei didžiausią derliaus priedą duoda karboksamidų grupės fungicidas fluksapiroksadas.

LITERATŪROS SARAŠAS

1. Abd-Elsalam K., Bahkali A. H., Moslem M., De Wit P. J., Verreet J. A. 2011. Detection of *Mycosphaerella graminicola* in wheat leaves by a microsatellite dinucleotide specific-primer. *International Journal of Molecular Sciences*, 12:682–693.
2. AHDB (*Agriculture and Horticulture Development Board*). 2021. Prieiga per internetą: <https://projectblue.blob.core.windows.net/media/Default/Imported%20Publication%20Docs/AHDB%20Cereals%20&%20Oilseeds/Disease/Wheat%20and%20barley%20disease%20management%20guide.pdf>
3. Alloui N., Siah A., Brinis L., Reignault Ph., Halama P. 2016. Identification of Qol-resistant genotypes of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in Algeria. *Phytopathologia Mediterranea*, 55: 89–97
4. Andersson B., Djurle A., Ørum J. E., Jalli M., Ronis A., Ficke A., Jørgensen L.N. 2022. Comparison of models for leaf blotch disease management in wheat based on historical yield and weather data in the Nordic-Baltic region. *Agronomy for Sustainable Development*, 42.
5. Arraiano L. S., Balaam N., Fenwick P. M., Chapman C., Feuerhelm D., Howell P., Smith S.J., Widdowson J.P., Brown J.K.M. 2009. Contributions of disease resistance and escape to the control of *Septoria tritici* blotch of wheat. *Plant Pathology*, 58: 910–922.
6. Avenot H. F., Michaelidis T. J. 2010. Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, 29: 643–651.
7. Baccar R., Fournier C., Dornbusch T., Andrieu B., Gouache D., Robert C, 2011. Modelling the effect of wheat canopy architecture as affected by sowing density on *Septoria tritici* epidemics using a coupled epidemic- virtual plant model. *Annals of Botany*, 108: 1179–1194.
8. Banke, S., Peschon, A., McDonald, B. 2004. Phylogenetic analysis of globally distributed *Mycosphaerella graminicola* populations based on three DNA sequence loci. *Fungal Genetics and Biology*, 41(2): 226–238.
9. Bankina B., Bimšteine G., Arhipova I., Kaņeps J., Stanka T. 2018. Importance of agronomic practice on the control of wheat leaf diseases. *Agriculture*, 8 (4): 56.
10. Bankina B., Bimšteine G., Ruža A., Priekule I., Paura L., Vaivade I., Fridmanis D. 2013. Winter wheat crown and root rot are affected by soil tillage and crop rotation in Latvia. . *Acta Agric. Scand. B Soil Plant Sci.*, 63(8): 723–730.

11. Bankina B., Gaile Z., Balodis O., Bimšteine G., Katamadze M., Kreita D., Paura L., Priekule I. 2014. Harmful winter wheat diseases and possibilities for their integrated control in Latvia. *Acta Agric. Scand. B Soil Plant Sci.* 64: 615–622.
12. Barrès, B., Micoud A., Corio-Costet M. F., Debieu D., Fillinger S., Walker A. S., Délye C., Grosman J., Siegwart M. 2016. Trends and challenges in pesticide resistance detection. *Trends in Plant Science*, 21 (10): 834-853.
13. Bartlett D. W., Clough J. M., Godwin J. R., Hall A. A., Hamer M., Parr-Dobrzanski B. 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Management Science*, 58(7), 649–662.
14. Barzman M., Bärberi P., Birch A. N. E., Boonekamp P., Dachbrodt-Saaydeh S., Graf B., Hommel B., Jensen J. E., Kiss J., Kudsk P., Lamichhane J. R., Messéan A., Moonen A. C., Ratnadass A., Ricci P., Sarah J. L., Sattin M. 2015. Eight principles of integrated pest management. *Agronomy for Sustainable Development*, 35:1199–1215.
15. Ben M'Barek, S., Karisto, P., Fakhfakh, M., Kouki, H., Mikaberidze, A., Yahyaoui, A. 2020. Improved control of Septoria tritici blotch in durum wheat using cultivar mixtures. *Plant Pathology* 69:1655–1665.
16. Berraies S., Salah Gharbi M., Belzile F., Yahyaoui A., Hajlaoui M. R., Trifi M., Jean M., Rezgui S. 2013. High genetic diversity of *Mycosphaerella graminicola* (*Zymoseptoria tritici*) from a single wheat field in Tunisia as revealed by SSR markers. *African Journal of Biotechnology*, 12: 1344–1349.
17. Beyer M., El Jarroudi M., Junk J., Pogoda F., Dubos T., Gorgen K., Hoffman L. 2012. Spring air temperature accounts for the bimodal temporal distribution of Septoria tritici epidemics in the winter wheat stands of Luxembourg. *Crop Protection*, 42: 250–255.
18. Beyer M., Marozsak B., Dam D., Parisot O., Pallez-Barthel M., Hoffmann L. 2022. Enhancing Septoria leaf blotch forecasts in winter wheat II: model architecture and validation results. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 129: 45–51,
19. Blake J. J., Gosling P., Fraaije B. A., Burnett F.J. , Knight S.M., Kildea S., Paveley N.D. 2018. Changes in field dose–response curves for demethylation inhibitor (DMI) and quinone outside inhibitor (QoI) fungicides against *Zymoseptoria tritici*, related to laboratory sensitivity phenotyping and genotyping assays. *Pest Management Science*, 74:302–313.
20. Brent K. J., Hollomon D.W., 2007. Fungicide resistance: The assessment of risk. *FRAC monograph No. 2*.
21. Brown, J. K., Chartrain, L., Lasserre-Zuber, P. Saintenac, C. 2015. Genetics of resistance to *Zymoseptoria tritici* and applications to wheat breeding. *Fungal Genetics and Biology*, 79: 33–41.

22. Brown J. K. M. 2002. Yield penalties of disease resistance in crops. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 339-344.
23. Brown J.S. 1975. The ascogenous state of *Septoria tritici* found in Victoria. *Australasian Plant Pathology Society Newsletter*, 4: 37.
24. Brown, J. S., Kellock, A. W., Paddock, R. G. 1978. Distribution and dissemination of *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schroeter in relation to the epidemiology of speckled leaf blotch of wheat. *Australian Journal of Agricultural Research*, 29: 1139–1145.
25. Burch M., Levetin E. 2002. Effects of meteorological conditions on spore plumes. *International Journal of Biometeorology*, 46: 107–117.
26. Byamukama E., Ali S., Kleinjan J., Yabwalo D. N., Graham C., Caffè-Tremblé M., Mueller N. D., Rickertsen J., Berzonsky W. A. 2019. Winter wheat grain yield response to fungicide application is influenced by cultivar and rainfall. *The Plant Pathology Journal*, 35 (1): 63–70.
27. 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*, 92: 131-133.
28. Coleman J. J., Mylonakis E. 2009. Efflux in Fungi: La Pièce de Résistance. *PLoS Pathogens*, 5(6):e10004865.
29. Cools H. J., Bayon C., Atkins S., Lucas J. A., Fraaije B. A. 2012. Overexpression of the sterol 14 α -demethylase gene (*MgCYP51*) in *Mycosphaerella graminicola* isolates confers a novel azole fungicide sensitivity phenotype. *Pest Management Science*, 68: 1034–1040.
30. Cools H. J., Fraaije B. A. 2013. Update on mechanisms of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola* and implications for future control. *Pest Management Science*, 69 (2): 150–155.
31. Cordo C. A., Mónaco C. I., Altamirano R., Perelló A. E., Larrán S., Kripelz N. I., Simón M.R. 2017. Weather conditions associated with the release and dispersal of *zymoseptoria tritici* spores in the Argentine pampas region. *International Journal of Agronomy*, 1468580.
32. Cordo C. A., Simón M. R., Perello A. E., Alippi H. E. 1999. Spore dispersal of leaf blotch pathogens of wheat (*Mycosphaerella graminicola* and *Septoria tritici*). In: van Ginkel M., Krupinsky J., eds *Septoria and Stagonospora Diseases of Cereals: A Compilation of Global Research*. Mexico city, Mexico: CIMMYT, 98–101.

33. Corkley I., Fraaije B., Hawkins N. 2022. Fungicide resistance management: maximizing the effective life of plant protection products. *Plant Pathology*, 71:150–169.
34. Corteva. 2021. Corteva Agriscience Inatreq™ Active Approved in UK. <https://www.corteva.co.uk/news-and-resources/Corteva-Agriscience-Inatreq-Active-Approved-in-UK.html>
35. Cowger, C. Mundt, C.C. 2002. Effects of wheat cultivar mixtures on epidemic progression of *Septoria tritici* blotch and pathogenicity of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology*, 92: 617–623.
36. Dancer J., Daniels A., Cooley N., Foster S. 1999. *Septoria tritici* and *Stagonospora nodorum* as model pathogens for fungicide discovery. In: Lucas J. A., Bowyer P., Anderson H.M. (Eds.), *Septoria on Cereals: A study of Pathosystems*. CABI publishing. Oxford, p. 316–331.
37. Darguza M., Gaile Z. 2019. Yield and quality of winter wheat. depending on crop rotation and soil tillage. *Proceedings of 25th International Scientific Conference 'Research for Rural Development-2019'*. Jelgava, Latvia, vol. 2, p. 29–35.
38. De Waard M. A., Andrade A. C., Hayashi K., Schoonbeek H. J., Stergiopoulos I., Zwieters L. H. 2006. Impact of fungal drug transporters on fungicide sensitivity, multidrug resistance and virulence. *Pest Management Science*, 62: 195-207.
39. 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 Management Science*, 72: 2203–2207.
40. Drabešová J., Ryšánek P., Brunner P., McDonald B. A., Croll D. 2013. Population genetic structure of *Mycosphaerella graminicola* and Quinone Outside Inhibitor (QoI) resistance in the Czech Republic. *European Journal of Plant Pathology*, 135: 211–224.
41. Duvivier M., Dedeurwaerder G., De Proft M., Moreau J.M., Legrève A. 2013. Real-time PCR quantification and spatio-temporal distribution of airborne inoculum of *Mycosphaerella graminicola* in Belgium. *European Journal of Plant Pathology*, 137(2): 325–341.
42. European Food Safety Authority (EFSA). Arena M., Auteri D, Barmaz S., et al. 2018. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance chlorothalonil. *EFSA Journal*, 16(1), e05126.
43. El Chartouni L., Tisserant B., Siah A., Duyme F., Leducq J.-B., Deweer C., Fichter-Roisin C., Sanssené J., Durand R., Halama P., Reignault P. 2011. Genetic diversity and population structure in French populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Mycologia*, 103(4): 764–774.

44. El Jarroudi M., Delfosse P., Maraite H., Hoffmann L., Tychon B. 2009. Assessing the Accuracy of Simulation Model for Septoria Leaf Blotch Disease Progress on Winter Wheat. *Plant Disease*, 93(10): 983–992.
45. El Jarroudi M., Kouadio L., Beyer M., Junk J., Hoffmann L., Tychon B., Maraite H., Bock C.H., Delfosse P. 2015. Economics of a decision–support system for managing the main fungal diseases of winter wheat in the Grand-Duchy of Luxembourg. *Field Crops Research*, 172: 32–41.
46. El Jarroudi M., Kouadio L., El Jarroudi M., Junk J., Bock C., Diouf A. A., Delfosse P. 2017. Improving fungal disease forecasts in winter wheat: A critical role of intraday variations of meteorological conditions in the development of Septoria leaf blotch. *Field Crops Research*, 213: 12–20.
47. El Jarroudi M., Kouadio L., Junk J., Maraite H., Tychon B., Delfosse P. 2022. Assessing the Interplay between Weather and Septoria Leaf Blotch Severity on Lower Leaves on the Disease Risk on Upper Leaves in Winter Wheat. *Journal of Fungi*, 8: 1119.
48. Eriksen L., Munk L. 2003. The occurrence of *Mycosphaerella graminicola* and its anamorph *Septoria tritici* in winter wheat during the growing season. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 253–259.
49. Estep L. K., Zala M., Anderson N. P., Sackett K. E., Flowers M. D., McDonald B. A., Mundt C. 2013. First report of resistance to QoI fungicides in North American populations of *Zymoseptoria tritici*, causal agent of Septoria tritici blotch of wheat. *Plant Disease*, 97: 1511.
50. European Commission. 2019. Commission Implementing Regulation (EU) 2019/677 of 29 April 2019 concerning the non-renewal of the approval of the active substance chlorothalonil, in accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market, and amending Commission Implementing Regulation (EU) No 540/2011. *Official Journal of the European Union*, L 114: 15.
51. European Commission. 2023. Prieiga per internetą: https://food.ec.europa.eu/horizontal-topics/farm-fork-strategy_en
52. FAO (2023) NSP – Integrated Pest Management, FAO definition. Prieiga per internetą: <http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/pests/ipm/en/>
53. Fones H., Gurr S. 2015. The impact of Septoria tritici Blotch disease on wheat: An EU perspective. *Fungal Genetics and Biology*, 79: 3–7.
54. Fouché G., Michel T., Lalève A., Wang N., Young D., Meunier B., Debieu D., Fillinger S., Walker A.S. 2021. Directed Evolution Predicts Cytochrome b G37V Target Site

- Modification as Probable Adaptive Mechanism towards the Qil Fungicide Fenpicoxamid in *Zymoseptoria Tritici*. *Environmental Microbiology*, 24: 1117–1132.
55. Fraaije B. A., Lucas J. A., Clark W.S., Burnett F. J. 2003. QoI resistance development in populations of cereal pathogens in the UK Proceedings of the BCPC International Congress, Crop Science and Technology, The British Crop Protection Council, Alton, Hampshire, UK, pp. 689–694.
56. FRAC. 2023. Fungicide Resistance Action Committee. Prieiga per internetą: <https://www.frac.info/home>
57. Garnault M., Duplaix C., Leroux P., Couleaud G., Carpentier F., David O., Walker A.S. 2019. Spatiotemporal dynamics of fungicide resistance in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in France. *Pest Management Science*, 75: 1794–1807.
58. Gaurilčikienė I., Butkutė B., Mankevičienė A. 2010. A multi-aspect comparative investigation on the use of strobilurin and triazole-based fungicides for winter wheat disease control. Carisse O. (ed.). *Fungicides*, pp. 69–94.
59. Gaurilčikienė I., Ramanauskienė J. 2011. Co-occurrence of *Phaeosphaeria nodorum* and *Mycosphaerella graminicola* in winter wheat in Lithuania. 8th International Symposium on Mycosphaerella and Stagonospora diseases of cereals. *Book of Abstracts*. Eds. E. Duveiller, P. K. Singh et al., Mexico City, Mexico, pp. 78.
60. Gigot C., Saint-Jean S., Huber L., Maumené C., Leconte M., Kerhornou B., de Vallavieille-Pope C. 2013. Protective effects of a wheat cultivar mixture against splash-dispersed *Septoria tritici* blotch epidemics. *Plant Pathology*, 62: 1011–1019.
61. Glazek M., Sikora H. 1998. The occurrence of *Septoria tritici* and its anamorph *Mycosphaerella graminicola* in the region of Upper Silesia in 1996. *Journal of Plant Protection Research*, 38: 23–29.
62. Gouache D., Bensdoun A., Brun F., Oage C., Makowski D., Wallach D. 2013. Modelling climate change impact on *Septoria tritici* Blotch (STB) in France: accounting for climate model and disease model uncertainty. *Agricultural and Forest Meteorology*, 170: 242–252.
63. Grimmer M. K., van den Bosch F., Powers S.J., Paveley N. D. 2014. Fungicide resistance risk assessment based on traits associated with the rate of pathogen evolution. *Pest Management Science*, 71(2): 207–215.
64. Gutiérrez-Alonso O., Hawkins N. J., Cools H. J., Shaw M. W., Fraaije B. A. 2017. Dose-dependent selection drives lineage replacement during the experimental evolution of SDHI fungicide resistance in *Zymoseptoria tritici*. *Evolutionary Applications*, 10: 1055–1066.

65. Haggag W. M., Abouzienna H. F., Abd-El-Kreem F., El Habbasha S. 2015. Agriculture biotechnology for management of multiple biotic and abiotic environmental stress in crops. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(10):882–889.
66. Hahn, M., Leroch, M. 2015. Multidrug Efflux Transporters. In H. Ishii, D. W. Hollomon (Eds.), *Fungicide Resistance in Plant Pathogens. Principles and a Guide to Practical Management* (pp. 233–248). Tokyo, Japan: Springer.
67. Halama P. 1996. The occurrence of *Mycosphaerella graminicola*, teleomorph of *Septoria tritici* in France. *Plant Pathology*, 45: 135– 138.
68. Hassine M., Siah A., Hellin P., Cadalen T., Halama P., Hilbert J.-L., Hamada W., Baraket M., Yahyaoui A., Legrève A., Duvivier M. 2019. Sexual reproduction of *Zymoseptoria tritici* on durum wheat in Tunisia revealed by presence of airborne inoculum, fruiting bodies and high levels of genetic diversity. *Fungal Biology*, 123(10): 763–772.
69. Hehir J. G., Connolly C., O’Driscoll A., Lynch J. P., Spink J., Brown J. K. M. Doohan F., Mullins E. 2018. Temporal and spatial field evaluations the importance of the presymptomatic phase in supporting strong partial resistance in *Triticum aestivum* against *Zymoseptoria tritici*. *Plant Pathology*, 67: 573– 583.
70. Heck 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.
71. Heck T. M., Matzen N., Jørgensen N. L. 2020. Reduced field efficacy and sensitivity of demethylation inhibitors in the Danish and Swedish *Zymoseptoria tritici* populations. *European Journal of Plant Pathology*, 157: 625–636.
72. Hellin P., Duvivier M., Clinckemaiillie A., Bataille C., Legrève A., Heck T. M., Jørgensen L. N., Andersson B., Samil B., Rodemann B., Berg G., Kildea S. 2020. Multiplex qPCR assay for simultaneous quantification of CYP51-S524T and SdhC-H152R substitutions in European populations of *Zymoseptoria tritici*. *Plant Pathology*, 69: 1666–1677.
73. Hellin P., Duvivier M., Heck T. M., Fraaije B. A., Bataille C., Clinckemaiillie A., Legrève A., Jørgensen L. N., Andersson B., Samil B., Rodemann B., Berg G., Hutton F., Garnault M., El Jarroudi M., Couleaud G., Kildea S. 2021. Spatio-temporal distribution of DMI and SDHI fungicide resistance of *Zymoseptoria tritici* throughout Europe based on frequencies of key target-site alterations. *Pest Management Science*, 77(12), 5576–5588.

74. Holmes S. J. I., Colhoun J. 1974. Infection of wheat by *Septoria nodorum* and *S. tritici* in relation to plant age, air temperature and relative humidity. *Transactions of the British Mycological Society*, 63: 329–338.
75. Hunter, T., Coker, R., Royle, D. 1999. The teleomorph stage, *Mycosphaerella graminicola*, in epidemics of Septoria Tritici Blotch on winter wheat in the UK. *Plant Pathology*, 48: 51–57.
76. Jalli M., Huusela E., Jalli H., Kauppi K., Niemi M., Himanen S., Jauhiainen L. 2021. Effects of Crop Rotation on Spring Wheat Yield and Pest Occurrence in Different Tillage Systems: A Multi-Year Experiment in Finnish Growing Conditions. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5: 647335.
77. 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. 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. *Journal of Integrative Agriculture*, 13: 265–281.
78. 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*, 105: 16–27.
79. 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., Ban R., Hellin P., Kildea S., Stammler G. 2022. Shifting sensitivity of septoria tritici blotch compromises field performance and yield of main fungicides in Europe. *Frontiers Plant Science*, 13:1060428.
80. Jørgensen L. N., Matzen N., Ficke A., Nielsen G. C., Jalli M., Ronis A., Andersson B., Djurle A. 2020. Validation of risk models for control of leaf blotch diseases in wheat in the Nordic and Baltic countries. *European Journal of Plant Pathology*, 157: 599–613.
81. Jørgensen L. N., van den Bosch F., Oliver R. P., Heick T. M., Paveley N. D. 2017. Targeting Fungicide Inputs According to Need. *Annual Review of Phytopathology*, 55(1): 181–203.
82. Jürgens T., Linde C. C., McDonald B. A. 2006. Genetic structure of *Mycosphaerella graminicola* populations from Iran, Argentina and Australia. *European Journal of Plant Pathology*, 115: 223–233.

83. Karisto P., Hund A., Yu K., Anderegg J., Walter A., Mascher F., McDonald B. A., Mikaberidze A. 2018. Ranking quantitative resistance to *Septoria tritici* blotch in elite wheat cultivars using automated image analysis. *Phytopathology*, 108(5): 568–581.
84. Kema G. H. J., Yu D. Z., Rijkenberg F. H. J., Shaw M. W., Baayen R. P. 1996a. Histology of the pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Phytopathology*, 86: 777–786.
85. Kema G. H. J., Verstappen E. C. P., Todorova M., Waalwijk C. 1996b. Successful crosses and molecular tetrad and progeny analyses demonstrate heterothallism in *Mycosphaerella graminicola*. *Current Genetics*, 30: 251–258.
86. 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. *Microorganisms*, 9(4):814.
87. Kildea S., Mehenni-Ciz J., Spink J.; O’Sullivan E. 2014. Changes in the frequency of Irish *Mycosphaerella graminicola* CYP51 variants 2006–2011. In H. W. Dehne, H. B. Deising, B. Fraaije, U. Gisi, D. Hermann, A. Mehl, et al. (Eds.), *17th international Reinhardtsbrunn symposium* (pp. 143–144). DPG Spectrum Phytomedizin: Braunschweig, Germany.
88. Kildea S., Heick T. M., Grant J., Mehenni-Ciz J., Dooley H. 2019. A combination of target-site alterations, overexpression and enhanced efflux activity contribute to reduced azole sensitivity present in the Irish *Zymoseptoria tritici* population. *European Journal of Plant Pathology*, 154: 529–540.
89. Kildea S., Hellin P., Heick T. M., Hutton F. 2022. Baseline sensitivity of European *Zymoseptoria tritici* populations to the complex III respiration inhibitor fenpicoxamid. *Pest Management Science*, 78(11):4488–4496.
90. Kirikyali N., Diez P., Luo J., Hawkins N., Fraaije B. A. 2017. Azole and SDHI sensitivity status of *Zymoseptoria tritici* field populations sampled in France, Germany and the UK during 2015, in *Modern Fungicides and Antifungal Compounds VIII*, ed. by Deising HB, Fraaije BA, Mehl A, Oerke EC, Sierotzki H. and Stammer G. Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, Braunschweig, Germany, pp. 153–158.
91. Koen J., Antoniw J., Rudd J., Skinner W., Hargreaves J., Hammond-Kosack K. 2005. Analysis of expressed sequence tags from the wheat leaf blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*). *Fungal Genetics and Biology*, 42: 376–389.

92. Kristoffersen R., Bonde Eriksen L., Cordsen Nielsen G., Jørgensen J. R. Jørgensen L. N. 2021. Management of *Septoria tritici* blotch using cultivar mixtures. *Plant Disease*, 106: 1341–1349.
93. Lamichhane J. R., Aubertot J.-N., Begg G., Birch A. N. E., Boonekamp P., Dachbrodt-Saaydeh S., Hansen J. G., Al E., 2016. Networking of Integrated Pest Management: a powerful approach to address common challenges in agriculture. *Crop Protection*, 89: 139–151.
94. 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 *Mycosphaerelia graminicola*. *Pest Management Science*, 63(7): 688–698.
95. Leroux P., Walker AS. 2011. Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14alpha-demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science*, 67:44–59.
96. Leonard K. J. 1969. Factors Affecting Rates of Stem Rust Increase in Mixed Plantings of Susceptible and Resistant Oat Varieties. *Phytopathology*, 59(12.0): 1845-1850.
97. Linde C. C., Zhan J., McDonald B. A., 2002. Population structure of *Mycosphaerella graminicola*: from lesions to continents. *Phytopathology* 92: 946–955.
98. Lovell D. J., Parker S. R., Hunter T., Welham S. J., Nichols A. R. 2004. Position of inoculum in the canopy affects the risk of *Septoria tritici* blotch epidemics in winter wheat. *Plant Pathology*, 53: 11–21.
99. Lovell D. J., Parker S. R., Paveley N. D., Worland A. J. 2002. Understanding field resistance mechanisms for improved control of *Septoria tritici*. *Plant Protection Science*, 38: 165–169.
100. Lucas J. A. 2017. Fungi, food crops, and biosecurity: advances and challenges. *Advances in Food Security and Sustainability*, 2:1-40.
101. Lucas J. A., Hawkins N. J., Fraaije B.A. 2015. The evolution of fungicide resistance. *Advances in Applied Microbiology*, 29–92.
102. Mahtour A., El Jarroudi M., Delobbe L., Hoffmann L., Maraite H., Tychon B. 2011. Site-Specific *Septoria* Leaf Blotch Risk Assessment in Winter Wheat Using Weather-Radar Rainfall Estimates. *Plant Diseases*, 95(4):384–393.
103. Marroni, M. V., Butler, R. C., Deng, Y. 2006. Fungicide timing for the control of *septoria tritici* blotch of wheat. *New Zealand Plant Protection*, 59: 160–165.
104. Matzen N., Jørgensen J. R., Holst N., Jørgensen L. N. 2019. Grain quality in wheat – Impact of disease management. *European Journal of Agronomy*, 103: 152–164.

105. 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. *Frontiers in Plant Science*, 11:385.
106. McDonald B. A., Mundt C. C. 2016. How Knowledge of Pathogen Population Biology Informs Management of Septoria Tritici Blotch. *Phytopathology*, 106(9): 948–955.
107. McDonald M., McDonald B., Solomon P. 2015. Recent advances in the *Zymoseptoria tritici* – wheat interaction; Insights from pathogenomics. *Frontiers in Plant Science*, 6:102.
108. McDonald B. A., Suffert F., Bernasconi A., Mikaberidze A. 2022. How large and diverse are field populations of fungal plant pathogens? The case of *Zymoseptoria tritici*. *Evolutionary Applications*, 15: 1360–1373.
109. Miedaner T., Zhao Y., Gowda M., Longin C. F., Korzun V., Ebmeyer E., Kazman E., Reif J. C. 2013. Genetic architecture of resistance to Septoria tritici blotch in European wheat. *BMC Genomics*, 14: 858.
110. Morais D., Laval V., Sache I., Suffert F. 2015. Comparative pathogenicity of sexual and asexual spores of *Zymoseptoria tritici* (septoria tritici blotch) on wheat leaves. *Plant Pathology*, 64, 1429–1439.
111. Morais D., Sache I., Suffert F., Laval V. 2016. Is onset of Septoria tritici blotch epidemics related to local availability of ascospores? *Plant Pathology*, 65: 250–260.
112. Nicolaisen M., Supronienė S., Nielsen L. K., Lazzaro I., Spliid N. H., Justesen A. F. 2009. Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *Journal of Microbiological Methods*, 76: 234–240.
113. O’Driscoll A., Kildea S., Doohan F., Spink J., Mullins E. 2014. The wheat–Septoria conflict: a new front opening up? *Trends in Plant Science*, 19: 602–610.
114. Oerke E. C. 2006. Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144: 31–43.
115. Oficialios statistikos portalas 2023. Prieiga per internetą: <https://osp.stat.gov.lt/zemesukis>
116. Oliver R. P., Hewitt H. G. 2014. Fungicides in crop protection. 2nd Edition. Cabi.
117. Omrane S., Sghyer H., Audéon C., Lanen C., Duplaix C., Walker A.S., Fillinger S. 2015. Fungicide efflux and the MgMFS1 transporter contribute to the multidrug resistance phenotype in *Zymoseptoria tritici* field isolates. *Environmental Microbiology*, 17(8):2805–2823.

118. Omrane S., Audéon C., Ignace A., Duplaix C., Aouini L., Kema G., Walker A. S., Fillinger S. 2017. Plasticity of the *MFSI* promoter leads to multidrug resistance in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *mSphere* 2:e00393-17.
119. Orellana-Torrejon C., Vidal T., Boixel A.-L., Gélisse S., Saint-Jean S., Suffert F. 2022. Annual dynamics of *Zymoseptoria tritici* populations in wheat cultivar mixtures: a compromise between the efficacy and durability of a recently broken-down resistance gene? *Plant Pathology*, 71: 289–303.
120. Owen W. J., Yao C., Myung K., Kemmitt G., Leader A., Meyer K.G., Bowling A. J., Slanec T., Kramer V. J. 2017. Biological characterization of fenpicoxamid, a new fungicide with utility in cereals and other crops. *Pest management science*, 73(10): 2005–2016.
121. Pariaud B., Ravigne V., Halkett F., Goyeau H., Carlier J., Lannou C. 2009. Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathology*, 58: 409–429.
122. Pastircak M. 2005. Occurrence of *Mycosphaerella graminicola*, teleomorph of *Septoria tritici*, in Slovakia. *Phytoparasitica*, 33: 377–379.
123. Paveley N. D., Blake J., Gladders P., Cockerell V. 2012. HGCA Wheat disease management guide. HGCA Publications, pp. 32 .
124. Paveley N. D., Lockley D., Vaughan T. B., Thomas J., Schmidt K. 2000. Predicting effective fungicide doses through observation of leaf emergence. *Plant Pathology*, 49 (6): 748–766.
125. Pielaat A., van den Bosch F., Fitt B. D. L., Jeger M. J. 2002. Simulation of vertical spread of plant diseases in a crop canopy by stem extension and splash dispersal. *Ecological Modelling*.151: 195–212.
126. Pietravalle S., Shaw M. W., Parker S. R., van den Bosch F. 2003. Modelling of relationships between weather and *Septoria tritici* epidemics on winter wheat: a critical approach. *Phytopathology*, 93 (10): 1329–1339.
127. Piliponyte-Dzikiene A., Kaczmarek J., Petraitiene E., Kasprzyk I., Brazauskiene I., Brazauskas G., Jedryczka M. 2014. Microscopic and molecular detection of airborne ascospores of *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* in Lithuania and Poland. *Zemdirbyste-Agriculture*, 101: 303–312.
128. Pilo P., Lawless C., Tiley A. M. M., Karki S. J., Burke J. I., Feechan A. 2022. Comparison of microscopic and metagenomic approaches to identify cereal pathogens and track fungal spore release in the field. *Frontiers in Plant Science*, 13: 1039090.

129. Ponomarenko, A., Goodwin, S. B., Kema, G. H. J. 2011. Septoria tritici blotch (STB) of wheat. *Plant Health Instructor*.
130. Prahll K.C., Klink H., Hasler M., Verreet J-A., Birr T. 2023. Will Climate Change Affect the Disease Progression of Septoria Tritici Blotch in Northern Europe? *Agronomy*, 13(4):1005.
131. Précigout P.-A., Claessen D., Makowski D., Robert C. 2020. Does the latent period of leaf fungal pathogens reflect their trophic type? A meta-analysis of biotrophs, hemibiotrophs, and necrotrophs. *Phytopathology*, 110:345–361.
132. Quaedvlieg W., Kema G. H. J., Groenewald J. Z., Verkley G. J. M., Seifbarghi S., Razavi M., Mirzadi Gohari A., Mehrabi R., Crous P. W. 2011. *Zymoseptoria* gen. nov.: A new genus to accommodate Septoria-like species occurring on graminicolous hosts. *Persoonia Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 26: 57–69.
133. Rahman A., Dooham F., Mullins E. 2020. Quantification of In Planta *Zymoseptoria tritici* Progression Through Different Infection Phases and Related Association with Components of Aggressiveness. *Phytopathology*, 110(6):1208–1215.
134. Raudonius S. 2017. Application of statistics in plant and crop research: important issues. *Zemdirbyste-Agriculture*, 104 (4): 377–382.
135. 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*, 67: 175–180.
136. Riaz A., KockAppelgren P., Hehir J. G., Kang J., Meade F., Cockram J., Milbourne D., Spink J., Mullins E., Byrne S. 2020 Genetic Analysis Using a Multi-Parent Wheat Population Identifies Novel Sources of Septoria Tritici Blotch Resistance. *Genes (Basel)*, 11(8): 887.
137. Rodrigo S., Cuello-Hormigo B., Gomes C., Santamaria O., Costa R., Poblaciones M. J. 2015. Influence of fungicide treatment on disease severity caused by *Zymoseptoria tritici*, and on grain yield and quality parameters of bread-making wheat under Mediterranean conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 141: 99–109.
138. Ronis A., Jørgensen L. N., Semaškienė R., Gaurilčikienė I., Ramanauskienė J. 2014. Sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* isolates to demethylation-inhibiting (DMI) fungicides. *Zemdirbyste-Agriculture*, 101 (2): 177–184.
139. Rudd J. J., Kanyuka K., Hassani-Pak K., Derbyshire M., Andongabo A., Devonshire J., Lysenko A., Saqi M., Desai N. M., Powers S. J., Hooper J., Ambroso L., Bharti A., Farmer A., Hammond-Kosack K. E., Dietrich R. A., Courbot M. 2015. Transcriptome and metabolite profiling of the infection cycle of *Zymoseptoria tritici* on wheat reveals

- a biphasic interaction with plant immunity involving differential pathogen chromosomal contributions and a variation on the hemibiotrophic lifestyle definition. *Plant Physiology*, 167: 1158–1185.
140. Razavi M., Hughes G. R. 2004. Microsatellite markers provide evidence for sexual reproduction of *Mycosphaerella graminicola* in Saskatchewan. *Genome*, 47(5): 789–794.
141. Saintenac C., Lee W. S., Cambon F., Rudd J. J., King R. C., Marande W., Powers S. J., Bergès H., Phillips A. L., Uauy C., Hammond-Kosack K. E., Langin T., Kanyuka K. 2018. Wheat receptor-kinase-like protein Stb6 controls gene-for-gene resistance to fungal pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Nature Genetics* 50: 368–374.
142. Samils B., Andersson B., Edin E., Elfstrand M., Rönneburg T., Bucur D., Hutton F., Heick T. M., Hellin P., Kildea S. 2021. Development of a PacBio Long-Read Sequencing Assay for High Throughput Detection of Fungicide Resistance in *Zymoseptoria tritici*. *Frontiers in Microbiology*, 12:692845.
143. Sanderson F. R. 1972. A *Mycosphaerella* species as the ascogenous state of *Septoria tritici* Rob. and Desm. *New Zealand Journal of Botany*, 10: 707–709.
144. Sardinha-Francisco C., Ma X., Zwyssig M., McDonald B. A., Palma-Guerrero J. 2019. Coping with stress: Morphological changes in response to environmental stimuli in a fungal plant pathogen. *Scientific Reports*, 9: 9642.
145. Savary S., Willocquet L., Pethybridge S. J., Esker P., McRoberts N., Nelson A. 2019. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution*, 3: 430–439.
146. Scalliet G., Bowler J., Luksch T., Kirchhofer-Allan L., Steinhauer D., Ward K., Niklaus M., Verras A., Csukai M., Daina A., Fonné-Pfister R. 2012. Mutagenesis and functional studies with succinate dehydrogenase inhibitors in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *PloS One* 7 (4),e35429.
147. Schleinitz D., DiStefano J. K., Kovacs P. 2011. Targeted SNP genotyping using the TaqMan® assay. Disease gene identification. *Methods in Molecular Biology*. Springer, 77–87.
148. Schneider F., Koch G., Jung C., Verreet J. A. 2001. Genotypic diversity of the wheat leaf blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola* (anamorph) *Septoria tritici* in Germany. *European Journal of Plant Pathology*, 107: 285–290.
149. Schoeny A., Menat J., Darsonval A., Rouault F., Jumel S., Tivoli B. 2008. Effect of pea canopy architecture on splash dispersal of *Mycosphaerella pinodes* conidia. *Plant Pathology*, 57 (6): 1073–1085.

150. Scott P. R., Sanderson F. R., Benedikz P. W. 1988. Occurrence of *Mycosphaerella graminicola*, telemorph of *Septoria tritici*, on wheat debris in the UK. *Plant Pathology*, 37: 285–290.
151. Shaw M. W. 1987. Assessment of upward movement of rain splash using a fluorescent tracer method and its application to the epidemiology of cereal pathogens. *Plant Pathology*, 36: 201–213.
152. Shaw M. W., Bearchell S. J., Fitt B. D. L., Fraaije B. A. 2008. Long-term relationships between environment and abundance in wheat of *Phaeosphaeria nodorum* and *Mycosphaerella graminicola*. *New Phytologist*, 177, 229–238.
153. Shaw M. W., Royle D. J. 1989. Airborne inoculum as a major source of *Septoria tritici* (*Mycosphaerella graminicola*) infections in winter wheat crops in the UK. *Plant Pathology*, 38: 35–43.
154. Siah A., Bomble M., Tisserant B., Cadalen T., Holvoet M., Hilbert J. L., Halama P., Reignault P. 2018. Genetic structure of *Zymoseptoria tritici* in northern France at region, field, plant, and leaf layer scales. *Phytopathology*, 108 (9): 1114–1123.
155. Siah A., Deweer C., Morand E., Reignault P., Halama P. 2010. Azoxystrobin resistance of French *Mycosphaerella graminicola* strains assessed by four in vitro bioassays and by screening of G143A substitution. *Crop Protection*, 29: 737–743.
156. Siah A., Elbekali A.Y., Ramdani A., Reignault P., Torriani S.F.F., Brunner P.C., Halama P. 2014. QoI resistance and mitochondrial genetic structure of *Zymoseptoria tritici* in Morocco. *Plant Diseases*, 98: 1138–1144.
157. Sierotzki H, Scalliet G, 2013. A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. *Phytopathology*, 103: 880–887.
158. Simko I, Piepho H.-P. 2012. The area under the disease progress stairs: calculation, advantage, and application. *Phytopathology*, 102 (4): 381–389.
159. Simón M. R., Ayala F. M., Cordo C. A., Röder M. S. Börner A. 2004. Molecular mapping of quantitative trait loci determining resistance to *Septoria tritici* blotch caused by *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Euphytica*, 138: 41–48.
160. Simón M. R., Cordo C. A., Perelló A. E., Struik P. C. 2003. Influence of nitrogen supply on the susceptibility of wheat to *Septoria tritici*. *Journal of Phytopathology*, 151: 283–289
161. Singh R. P., Singh P. K., Rutkoski J., Hodson D. P., He X., Jørgensen L. N., Hovmøller M. S., Huerta-Espino J. 2016. Disease Impact on Wheat Yield Potential and Prospects of Genetic Control. *Annual Review of Phytopathology*, 54: 303–322.

162. Stammler G., Brix H. D., Nave B., Gold R., Schoeﬂ U. 2008a. Studies on the biological performance of boscalid and its mode of action. In H. W. Dehne, H. B. Deising, U. Gisi, K. H. Kuck, P. E. Russel, & H. Lyr (Eds.), *Modern Fungicides and Antifungal Compounds V* (pp. 45–51). Braunschweig, Germany: Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft.
163. Stammler G., Carstensen M., Koch A., Semar M., Strobel D., Schlehuber S. 2008b. Frequency of different CYP51-haplotypes of *Mycosphaerella graminicola* and their impact on epoxiconazole-sensitivity and -field efficacy. *Crop Protection*, 27: 1448–1456.
164. Stammler G., Semar M. 2011. Sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* (Anamorf: *Septoria tritici*) to DMI fungicides across Europe and impact on field performance. *EPPO Bulletin* 41: 149–155.
165. Stammler G., Wolf A., Glaettli A., Klappach K. 2015. Respiration inhibitors: Complex II. In: Ishii H, Hollomon D, eds. *Fungicide Resistance in Plant Pathogens*. Tokyo, Japan: Springer, 102–117.
166. Steinberg G. 2015. Cell biology of *Zymoseptoria tritici* : Pathogen cell organization and wheat infection. *Fungal Genetics and Biology*, 79: 17–23.
167. Stewart E. I., Croll D., Lendenmann M. H., Sanchez-Vallet A., Hartmann F. E., Palma-Guerrero J., Ma X., McDonald B. A. 2017. Quantitative trait locus mapping reveals complex genetic architecture of quantitative virulence in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Molecular Plant Pathology*, 19: 201–216.
168. Stewart E. L., Hagerty C. H., Mikaberidze A., Mundt C. C., Zhong Z., McDonald B. A. 2016. An improved method for measuring quantitative resistance to the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* using high-throughput automated image analysis. *Phytopathology*, 106(7): 782–788.
169. Stewart E. L., McDonald B. A. 2014. Measuring quantitative virulence in the wheat pathogen *zymoseptoria tritici* using high-throughput automated image analysis. *Phytopathology*, 104: 985–992.
170. Suffert F., Sache I. 2011. Relative importance of different types of inoculum to the establishment of *Mycosphaerella graminicola* in wheat crops in north-west Europe. *Plant Pathology*, 60: 878–889.
171. 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*, 60: 166–177.

172. Suffert F., Sache I., Lannou C., 2013. Assessment of quantitative traits of aggressiveness in *Mycosphaerella graminicola* on adult wheat plants. *Plant Pathology*, 62(6): 1330–1341.
173. Suffert F. and Thompson R. N. 2018. Some reasons why the latent period should not always be considered constant over the course of a plant disease epidemic. *Plant Pathology*, 67: 1831–1840.
174. Taylor N. P., Cunniffe N.J. 2023. Modelling quantitative fungicide resistance and breakdown of resistant cultivars: Designing integrated disease management strategies for Septoria of winter wheat. *PLoS Comput Biol* 19(3): e1010969.
175. Thomas M. R., Cook R. J., King J. E. 1989. Factors affecting development of *Septoria tritici* in winter wheat and its effect on yield. *Plant Pathology*, 38: 246–257.
176. Tivoli B., Calonnec A., Richard B., Ney B., Andrivon D. 2012. Current knowledge on plant/canopy architectural traits that reduce the expression and development of epidemics. *European Journal of Plant Pathology*, 135: 471–478.
177. Tonti S., Alvisi G., Pisi A., Nipoti P., Prodi A. 2019. DNA quantification to assess *Zymoseptoria tritici* on a susceptible cultivar of durum wheat to establish the best timing for fungicide application in an Italian environment. *Cereal Research Communications*, 47 (2): 304–313.
178. Torriani S. F. F., Brunner P. C., McDonald B. A., Sierotzki H. 2009. QoI resistance emerged independently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science*, 65: 155–162.
179. Torriani S. F., Melichar J. P., 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*, 79: 8–12.
180. Trout C., Levetin E. 2001. Correlations of spring spore concentrations and meteorological conditions in Tulsa, Oklahoma. *International Journal of Biometeorology*, 45: 64–74.
181. Ünal G., Kayim M., Ay T., Yones A.M. 2017. Evaluation of disease intensity and molecular identification of *Zymoseptoria tritici* causing *Septoria* leaf blotch on wheat in the Eastern Mediterranean Region of Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 41: 1–9.
182. Vagndorf N., Heck 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*, 152: 327–341.

183. Vagndorf N., Justesen, A., Andersen J., Jahoor A., Sindberg S., Jørgensen L. 2019. Resistance stability to *Septoria tritici* blotch and comparison of screening methods for ranking STB disease. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 126: 191–201.
184. van den Berg F., van den Bosch F., Paveley N. D. 2013. Optimal fungicide application timings for disease control are also an effective anti-resistance strategy: a case study for *Zymoseptoria tritici* (*Mycosphaerella graminicola*) on wheat. *Phytopathology*, 103 (12): 1209–1219.
185. van den Bosch F., Oliver R., van den Berg F., Paveley N. D. 2014. Governing principles can guide fungicide-resistance management tactics. *Annual Review of Phytopathology*, 52: 175–195.
186. Van Der Plank J. E. 1963 *Plant Disease: Epidemics and Control*. Academic Press, New York, pp. 349.
187. van Ginkel M., Scharen A. L. 1988 .Host-pathogen relationships of wheat and *Septoria tritici*. *Phytopathology*, 78: 762–766.
188. VATŽUM. 2023. Prieiga per internetą: <http://www.vatzum.lt/lt/veiklos-sritys/augalu-apsaugos-produktu-registravimas/>
189. Verreet J. A., Hoffman G. M., Portner I. 1990. Evidence of the telemorph *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schroeter (anamorph: *Septoria tritici* Rob. apud Desm.) in the Federal Republic of Germany. *Journal of Phytopathology*, 130: 10–113.
190. Vestergård N. F., Jørgensen L. N., Hellin P. Heick T. M. 2023. Fungicide spraying intensity in the field drives the selection of amino acid alteration conferring resistance in *Zymoseptoria tritici*. *European Journal of Plant Pathology*.
191. 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*, 246: 154–161.
192. Viljanen-Rollinson S. L. H., Marroni M. V., Butler R. C., Deng Y., Armour T. 2005. Latent periods of *Septoria tritici* blotch on ten cultivars of wheat. *New Zealand Plant Protection*, 58: 256–260.
193. Wenda-Piesik A., Lemańczyk G., Pańka D., Piesik D. 2016. Risk assessment posed by diseases in context of integrated management of wheat. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 123: 3–18.
194. West J. S., Atkins S. D., Emberlin J., Fitt B. D.L. 2008. PCR to predict risk of airborne disease. *Trends in Microbiology*, 16(8): 380–387.

195. Wieczorek T. M., Berg G., Semaškienė R., Mehl A., Sierotzki H., Stammler G., Justesen 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*, 143: 861–871.
196. Young D. H., Wang N. X., Meyer S. T., Avila-Adame C. 2018. Characterization of the mechanism of action of the fungicide fenpicoxamid and its metabolite UK-2A. *Pest Management Science*, 74: 489–498.
197. Zhan J., Pettway R. E., McDonald B. A. 2003. The global genetic structure of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* is characterized by high nuclear diversity, low mitochondrial diversity, regular recombination, and gene flow. *Fungal Genetics and Biology*, 38(3): 286–297.
198. Zhan J., Torriani S. F. F., McDonald B. A. 2007. Significant difference in pathogenicity between MAT1-1 and MAT1-2 isolates in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Fungal Genetics and Biology*, 44: 339–346.
199. Zhong Z., Marcel T. C., Hartmann F. E., Ma X., Plissonneau C., Zala M., Ducasse A., Confais J., Compain J., Lapalu N., Amselem J., McDonald B. A., Croll D., Palma-Guerrero J. 2017. A small secreted protein in *Zymoseptoria tritici* is responsible for avirulence on wheat cultivars carrying the *Stb6* resistance gene. *New Phytologist*, 214: 619–631.

PRIEDAI

1 priedas. *Z. tritici* izoliatų naudotų patogeniškumo testams vietovės ir jų koordinatės 2019 metais

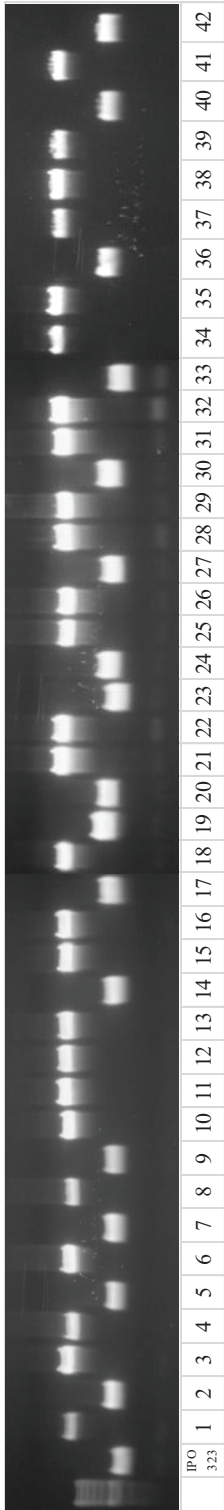
Annex I. Locations and coordinates of Z. tritici isolates used for pathogenicity tests in 2019

Izoliato pavadinimas/ <i>Isolate name</i>	Vietovės pavadinimas/ <i>Location name</i>	GPS koordinatės / <i>GPS coordinates</i>	
		Platuma / <i>Latitude</i>	Ilguma / <i>Longitude</i>
Kėdainių r. I	Akademija	55.40412	23.86636
Kėdainių r. II	Valinava	55.40201	23.86651
Raseinių r.	Vičiai	55.57604	23.20094
Radviliškio r. I	Grinkiškis	55.56259	23.62296
Radviliškio r. II	Skėmiai	55.54920	23.77158
Panevėžio r.	Šiaudinė	55.81048	24.26898
Pasvalio r. I	Pušalotas	55.91833	24.23536
Pasvalio r. II	Joniškėlis	56.00925	24.16345
Pakruojo r. I	Vaišvydžiai	55.97210	23.92935
Pakruojo r. II	Vėbariai	55.98617	23.69965
Joniškio r.	Jauniūnai	56.09520	23.47313
Šiaulių r. I	Bubiai	55.87129	23.18596
Šiaulių r. II	Naisiai	56.02175	23.52406
Marijampolės r.	Gudeliai	54.73305	23.63889
Šakių r.	Paluobiai	54.87307	23.25309
Prienų r.	Gyviai	54.74549	23.69676
Vilkaviškio r.	Pilviškiai	54.72184	23.25056
Kauno r.	Virbališkiai	54.89889	23.77219
Širvintų r.	Šešuoliėliai	55.06012	25.13270
Vilniaus r.	Miežionys	54.86607	24.89248

2 priedas. *Z. tritici* izoliatų naudotų patogeniškumo testams vietovės ir jų koordinatės 2020 metais

Annex 2. Locations and coordinates of Z. tritici isolates used for pathogenicity tests in 2020

Izoliato pavadinimas / <i>Isolate name</i>	Vietovės pavadinimas / <i>Location name</i>	GPS koordinatės / <i>GPS coordinates</i>	
		Platuma / <i>Latitude</i>	Ilguma / <i>Longitude</i>
Kėdainių r. 1	Akademija	55.38607	23.85391
Kėdainių r. 2	Kuigaliai	55.19229	24.07596
Raseinių r. 1	Dievogala	55.50267	23.52726
Raseinių r. 2	Nemakščiai	55.42855	22.75741
Kelmės r.	Tytuvėnai	55.58503	23.20523
Radviliškio r. 1	Skėmiai	55.55150	23.77050
Radviliškio r. 2	Niauduva	55.76881	23.79028
Panevėžio r. 1	Katinai	55.59983	24.44248
Panevėžio r. 2	Žvalgai	55.82889	23.99794
Pakruojo r.	Poškiečiai	55.98143	23.75303
Biržų r.	Mockūnai	56.00342	23.73998
Joniškio r.	Getaučiai	56.08957	23.46645
Šiaulių r. 1	Naisiai	56.01767	23.53164
Šiaulių r. 2	Šiauliai	55.93441	23.37558
Šakių r.	Degutinė	54.81143	23.12392
Jurbarko r.	Žygėnai	55.04637	22.88131
Kauno r.	Babtai	55.09890	23.80152
Jonavos r.	Jadvygava	55.10353	24.33716
Kaišiadorių r.	Stabintiškės	54.89265	24.59169
Trakų r.	Keliakėmis	54.72725	24.87857



3 priedas. CYP51 promotoriaus sritys intarpų elektroforezės gelio nuotrauka (Izoliatas IPO 323 buvo įtrauktas kaip standartas sulyginimui)

Annex 3. The electrophoresis gel pictures for the insertions in the CYP51 promoter region (The isolate IPO 323 was included as a reference)

PASKELBTŲ PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS DISERTACIJOS TEMA

Straipsniai leidiniuose, referuojamuose ir turinčiuose citavimo indeksą duomenų bazėje „Clarivate Analytics Web of Science“

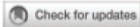
1. **Verikaitė K.**, Ramanauskienė J., Armonienė R., Ronis A. 2022. Evaluation of fungicide application programmes for Septoria tritici blotch control in winter wheat. *Zemdirbyste-Agriculture* 109, Nr. 2. 149-156. IF – 1,281
2. **Lavrukaitė K.**, Heick T. M., Ramanauskienė J., Armonienė R., Ronis A. 2023. Fungicide Sensitivity Levels in the Lithuanian *Zymoseptoria tritici* Population in 2021. *Front. Plant Sci.* 13:1075038. IF- 6,627

Santraukos konferencijų leidiniuose

1. **Verikaitė K.** 2019. Effects of fungicide application programs on Septoria tritici blotch severity and grain yield of winter wheat. Tarptautinės jaunųjų mokslininkų konferencijos „Young scientists for advance of agriculture“ santraukų leidinys.
2. **Verikaitė K.** 2020. *Zymoseptoria tritici* izoliatų patogeniškumas ir atsparumas fungicidams. Tarptautinėje jaunųjų mokslininkų konferencijoje „Jaunieji mokslininkai – Žemės ūkio pažangai“ – 2020 m. lapkričio 12 d., Vilnius.
3. **Verikaitė K.**, J. Ramanauskienė. 2021. Determining the effective period of fungicides against *Zymoseptoria tritici*. 17th International Conference Of Young Scientists On Energy And Natural Sciences Issues (CYSENI). Nuotolinė sesija.
4. **Verikaitė K.** 2022. Evaluation of *Zymoseptoria tritici* population aggressiveness in Lithuania. 18th International Conference Of Young Scientists On Energy And Natural Sciences Issues (CYSENI). Nuotolinė sesija.

Mokslo populiarinimo straipsniai

1. Ramanauskienė J., **Verikaitė K.** 2020. Lapų septoriozė – žalingiausia liga javų pasėliuose. *Mano ūkis*, 5:32-34.
2. Ramanauskienė J., **Verikaitė K.** 2022. Žieminių kviečių ligų plitimo rizikos. *Mano ūkis*, 4: 28-31.
3. **Lavrukaitė K.** 2023. Lapų septoriozės sukėlėjo atsparumo fungicidams vystymasis. *Mano ūkis*, 5: 24-27.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Prasad Prasad,
Indian Institute of Wheat and Barley
Research (ICAR), India

REVIEWED BY
Fengping Chen,
Fujian Agriculture and Forestry
University, China
Mustafa Zakieh,
Swedish University of Agricultural
Sciences, Sweden
Lee Põllumäe,
Estonian Crop Research Institute,
Estonia

*CORRESPONDENCE
Karolina Lavrukaitė
✉ karolina.lavrukait@iammc.lt

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Plant Pathogen Interactions,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

RECEIVED 20 October 2022
ACCEPTED 20 December 2022
PUBLISHED 11 January 2023

CITATION
Lavrukaitė K, Heick TM,
Ramanauskienė J, Armonienė R and
Ronis A (2023) Fungicide sensitivity
levels in the Lithuanian *Zymoseptoria
tritici* population in 2021.
Front. Plant Sci. 13:1075038.
doi: 10.3389/fpls.2022.1075038

COPYRIGHT
© 2023 Lavrukaitė, Heick,
Ramanauskienė, Armonienė and Ronis.
This is an open-access article
distributed under the terms of the
Creative Commons Attribution License
(CC BY). The use, distribution or
reproduction in other forums is
permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s)
are credited and that the original
publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic
practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does
not comply with these terms.

Fungicide sensitivity levels in the Lithuanian *Zymoseptoria tritici* population in 2021

Karolina Lavrukaitė^{1*}, Thies M. Heick²,
Jūratė Ramanauskienė¹, Rita Armonienė¹ and Antanas Ronis¹

¹Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Institute of Agriculture, Akademija, Lithuania,
²Department of Agroecology, Aarhus University, Slagelse, Denmark

Zymoseptoria tritici causes the disease known as septoria leaf blotch in winter wheat and is a major factor in yield loss worldwide. Farmers are inclined to use fungicides to protect their crops; however, the efficacy of these measures is rapidly decreasing due to the natural mechanisms of mutation emergence in pathogen populations. Increasing fungicide resistance is being recorded worldwide, therefore, screening of the current situation in Lithuania is essential to determine the subsequent steps of crop protection strategies. In this study, *in vitro* fungicide sensitivity tests, mutation detection, and field experiments were carried out. The mean EC₅₀ values for prothioconazole-dethio and mefentrifluconazole were 0.14 and 0.28 mg/l, respectively. Increased frequency of the mutation S524T, linked to DMIs resistance, was observed. Results revealed that the dominant point mutation in the gene *CYP51* was I381V, and the most frequent *CYP51* haplotype was D13 (V136C, I381V, Y461H, S524T). The mutation G143A, linked to QoI resistance, was detected in ¾ of the population. Mutations conferring resistance to SDHIs were not detected in single pycnidium isolates. Two-year field experiments likewise showed no decline in field efficacy of SDHI fungicide in Lithuania. Moreover, the baseline sensitivity of the Lithuanian *Z. tritici* population to QoI fungicide fenpicoxamid was established. The findings of this study provide an update on the current status of fungicide resistance in the Lithuanian *Z. tritici* population.

KEYWORDS

fungicide resistance, DMI, QoI, QoI, SDHI, Septoria tritici blotch

1 Introduction

The estimated wheat yield loss due to pests and diseases ranges from 10.1 to 28.1% globally and reaches almost 25% in Northwest Europe (Savary et al., 2019). Despite the availability of different disease control methods, such as varietal resistance or crop rotation, continuous fungicide application is the most prevalent way of reducing yield

loss (Lynch et al., 2017). However, farmers are currently facing the challenge of increased fungicide resistance in various plant pathogens (Jørgensen et al., 2018a). Over the last decade, numerous studies have reported cases of fungicide resistance in such pathogens, especially *Zygomycetia tritici* which causes the foliar wheat disease Septoria tritici blotch (STB) (Rehfus et al., 2018; Mäe et al., 2020; Jørgensen et al., 2021a). STB is distributed worldwide and occurs in areas with moderate temperatures and higher humidity (Torriani et al., 2015). The rapid development of resistance to various classes of fungicide in *Z. tritici* had been linked to its mixed (asexual and sexual) reproductive system (Brunner et al., 2008).

Fungicides with different modes of action (MoA) are used in STB disease control, for example, 14-demethylation inhibitors (DMI), succinate dehydrogenase inhibitors (SDHI), quinone outside inhibitors (QoI), and multi-site inhibitors, such as folpet and sulfur. The use of single-site fungicides, such as DMIs, SDHIs, and QoIs, increases the risk of resistance development. The multi-site inhibitors, however, affect multiple target sites in the pathogen and, thus, the pathogen is less likely to develop resistance against it (Hobbelen et al., 2011). Nevertheless, there are currently no products containing multi-site inhibitors against *Z. tritici* in Lithuania.

QoI fungicides inhibit cellular respiration by binding to the Qo site of the cytochrome b (Cytb) complex. The point mutation G143A in the Cytb gene had been linked to resistance to QoI fungicides in *Z. tritici* (Grasso et al., 2006), and is broadly spread across Europe (Cheval et al., 2017; Heick et al., 2017; Mäe et al., 2020). In addition, resistance to QoI fungicides had been recorded to spread independently in separate locations (Torriani et al., 2009). Therefore, these fungicides are not recommended for use against STB. However, QoIs are still used in Lithuania and other Northeast European countries, mainly targeting rust diseases (Mäe et al., 2020). Following the recent introduction of a new active ingredient fenpicoxamid, another group of fungicides, which act upon a different site of Cytb, had been receiving more attention. This active ingredient belongs to the quinone inside inhibitors (Qil) group, which inhibit the mitochondrial respiratory bc1 complex at the Q_i binding site (Owen et al., 2017).

SDHIs inhibit fungal respiration by disrupting the functioning of the succinate dehydrogenase (SDH) enzyme in the pathogens' mitochondria. The mutations conferring resistance to SDHIs occur in SDH enzyme subunits B, C, and D (Sierotzki and Scalliet, 2013). Although studies had shown good efficacy of SDHIs against *Z. tritici* (Rehfus et al., 2018; Kölker et al., 2021), over the last two decades, a decline in sensitivity has been observed in Germany (Birr et al., 2021). Several mutations had been linked to reduced sensitivity to SDHI fungicides, such as B-T268I, C-T79N, V-N86S, and C-H152R (Rehfus et al., 2018; FRAC, 2022).

DMI fungicides target the sterol 14- α -demethylase of the pathogen, thus preventing the demethylation and production of

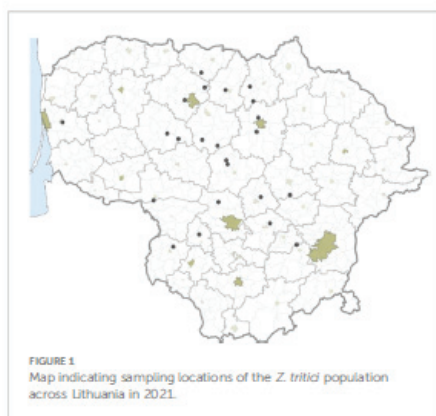
sterols, which are essential to the maintenance of membrane fluidity and permeability (Jefcoate, 1978). The control of fungal diseases had relied heavily on DMI fungicides since their introduction to the present day (Russell, 2005; Jørgensen and Heick, 2021b; Klink et al., 2021). This fungicide group possesses not only protective, but also curative activity when used against *Z. tritici* (Jørgensen et al., 2018b). However, the reduction in *Z. tritici* sensitivity towards DMI fungicides had been recorded by several researchers worldwide (Sykes et al., 2018; Mäe et al., 2020; Jørgensen et al., 2021a; Klink et al., 2021). Declined DMI sensitivity in *Z. tritici* had been linked to multiple mechanisms, such as mutations in the target gene (CYP51), overexpression of the CYP51 gene, and enhanced active fungicide efflux (Ziogas and Malandrakis, 2015). Moreover, cross-resistance within the group of DMIs adds to the reduction in sensitivity of *Z. tritici* (Omrane et al., 2017). As described previously, mutations in the CYP51 gene are associated with a decrease in sensitivity (Jørgensen et al., 2021a). These mutations include D134G, V136A/C/G, A379G, B81V, S524T, changes among amino acids 459 to 461, and so forth (Cools and Fraaije, 2013). Various attempts have been made to classify CYP51 haplotypes. One method employed the distinction of haplotypes based on DMI resistance, whereas another evaluated the number of key alterations within a haplotype (Leroux et al., 2007; Huf et al., 2018).

The prevalence of fungicide resistance in *Z. tritici* challenges farmers and researchers to pursue novel and efficient methods of plant protection. It is essential to conduct routine monitoring in order to select the most appropriate protection strategies and fungicides for a specific region (Kölker et al., 2021). Notably, a pattern of gradually increasing numbers of fungicide resistance cases and mutation frequencies had been observed from East to West Europe (Jørgensen et al., 2018b; Hellin et al., 2021). Thus, the main aim of this work was to determine the current status of resistance to fungicides with different MoA in relation to resistance-linked mutations in the Lithuanian *Z. tritici* population. In order to provide a comprehensive overview and a sound recommendation for farmers, a molecular mutation screening was carried out as well as *in vitro* sensitivity assays and field experiments.

2 Materials and methods

2.1 Field sampling and isolate collection

Leaves with typical STB lesions were collected in 2021 from commercial winter wheat fields in 23 locations across Lithuania (Figure 1). Samples from these locations were used for *Z. tritici* single pycnidium isolates isolation and as bulk samples for DNA extraction from leaves. A total of 42 *Z. tritici* single pycnidium isolates were isolated (1-2 isolates from each of the 23 locations). Without prior surface sterilization, the 3-4 cm leaf pieces with characteristic STB lesions were placed in 9 cm Petri dishes,



containing filter paper moistened with demineralized water, and kept at room temperature for 24 h. Using a sterile needle, cirrhi from a single pycnidium were transferred onto potato dextrose agar (PDA), containing 0.01% streptomycin. The plates containing PDA were incubated at 17°C with a 12 h white light/12 h darkness cycle for 5 days. Individual spore colonies were collected and conserved in 20% glycerol at -80°C.

2.2 Fungicide sensitivity test

In vitro sensitivity test was performed with the fungicides prothioconazole-desthio, mefenftrifluconazole, and fenpicoxamid (all Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Sensitivity tests were conducted as described by Heick et al. (2020), with the concentrations of prothioconazole-desthio set to 0.0165, 0.049, 0.15, 0.44, 1.33, 4.0, 12.0 mg L⁻¹ and mefenftrifluconazole and fenpicoxamid both set to 0.01, 0.02, 0.1, 0.2, 1.0, 2.0, 6.0 mg L⁻¹. Sensitivity to fungicides was calculated by non-linear regression (curve-fit) as the concentration of fungicide, which inhibits fungal growth by 50% (EC₅₀). The calculations were carried out using GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). The isolate IPO 323 (Dutch field strain first isolated in 1984) was included in the sensitivity test as a reference. Resistance factors (R.F.) were calculated using the formula: (EC₅₀ of the isolate)/(EC₅₀ of reference isolate IPO 323).

2.3 DNA extraction from a bulk of leaf samples and *Z. tritici* fungal isolates

From each sample (from 23 locations), 50 leaf cores (5 cores from 10 leaves each) containing STB lesions, were excised using

a 2 mm biopsy puncher. Each bulk of samples comprised of 50 leaf cores was freeze-dried and homogenized using a Geno/Grinder® 2010 (Spex® SamplePrep, Stanmore, United Kingdom) for 3x45 s at 1,500 rpm in 1.5 mL tubes with a steel ball (ø 5 mm) inside. The bulked samples represent the same field, from which the respective single isolates were collected. The same procedure was applied for the homogenization of fungal isolates. For each of the 42 isolates, 30 mg of fungal material were used. DNA was extracted from the homogenized leaf/fungal material using Sbeadex™ mini plant kit (LG Genomics, Teddington, UK) according to the manufacturer's protocol on a KingFisher™ Flex Purification System (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Denmark) and eluted in 50 µl elution buffer

2.4 Molecular analysis of target site mutations

Forty-two single pycnidium isolates were tested for mutations conferring resistance to QoI, SDHI, and DMI fungicides. The presence of mutation G143A in the *Cytb* gene was determined using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP) (LGC Genomics, Teddington, U.K.) genotyping (Kildea et al., 2014). The frequencies of mutations C-T79N and C-N86S in SDH-C genes were determined using qPCR assays as described by Hellin et al. (2021). Moreover, the DNA of bulk leaf samples from each of the 23 locations were also screened to determine the frequencies of mutations C-T79N and C-N86S in SDH-C genes.

The presence of target site mutations in the *CYP51* gene was determined, as described by Kildea et al. (2019). The complete *CYP51* gene sequence in the isolates was determined by following the amplification of the gene in each isolate using three overlapping PCRs. All PCR reactions were performed using: 1 unit GoTaqFlexi DNA polymerase (Promega, Madison, USA), 5.0 µl 5x GoTaqFlexi PCR Buffer (Promega, Madison, USA), 1.5 µl MgCl₂, 2.0 µl of dNTPs (2.5 mM each), 2.5 µl forward and reverse primers (both 10µM) (see Table S1), and 1.0 µl DNA and brought to a final reaction volume of 25 µl with Gibco water. The conditions for PCR reactions were as follows: initial denaturation at 94°C for 2 min, 35 cycles at 94°C for 30 s, annealing at 58°C for 30 s, and 72°C for 1 min, with the final extension step at 72°C for 10 min. PCR products were purified and sequenced by Macrogen Europe B.V. (Amsterdam, Netherlands). Sequence assembly and alignment were performed using the CLC workbench (QIAGEN, Aarhus, Denmark), where *Z. tritici* *CYP51* protein (GenBank accession no. AY730587) was used as a reference. According to the combination of target site mutations in the *CYP51* gene, the isolates were assigned to *CYP51* haplotypes, as described by Huf et al. (2018). All reactions described above were carried out using an Applied Biosystems ViiATM 7 Real-time PCR system machine (Thermo Fisher Scientific, Denmark).

2.5 Overexpression of the *CYP51* and *MFS1* genes

The presence of insertions in the *CYP51* promoter region conferring overexpression of the gene was determined for all isolates as described by Cools et al. (2012). PCR reactions were carried out in a total volume of 25 μ l containing 10.375 μ l Gibco water, 5.0 μ l 5 \times GoTaqFlexi PCR buffer (Promega, Madison, USA), 1.5 μ l $MgCl_2$, 2.0 μ l of each dNTP, 10 μ M forward primer Mg51-proF and reverse primer Mg51-seqR each, 1 unit GoTaqFlexi DNA polymerase (Promega, Madison, USA), and 1.0 μ l DNA (approximately 5 ng μ l⁻¹). The conditions for PCR reactions were as follows: initial denaturation at 94°C for 2 min, 40 cycles at 94°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s, and 72°C for 1 min, with the final extension step at 72°C for 5 min. PCR reactions were carried out in an Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Denmark). The DNA amplicons were loaded on a 1% agarose gel containing SYBR[®] Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific, Denmark) and run at 100 V for 45 min.

The presence of enhanced efflux, also referred to as multi-drug resistance (MDR), in the isolates was determined using PCR with specific primers MFS_2F and MFS_4R as described by Omrane et al. (2015). PCR reactions were carried out in an Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Denmark). The DNA amplicons were loaded on a 1% agarose gel containing SYBR[®] Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific, Denmark) and run at 100 V for 45 min.

2.6 Field trials

Two field experiments were conducted on winter wheat in Lithuania to test the efficacy of fungicides with different MoA against STB in 2020 and 2021 (GPS coordinates: 55.3820, 23.8556). The experiments were set up with four replicates and complete randomization within each replicate. The trials included five different solo fungicides at full dose and an untreated control; the details of the fungicide doses are shown in Table 1. Fungicide application was performed at growth stage 39 (Zadoks et al., 1974) using a bicycle plot sprayer at low pressure (3 bar), flat fan nozzles, and water volume of 300 l ha⁻¹. The winter wheat cultivar 'KWS Emil' was selected for both years. Local wheat-growing practices were applied for other plant protection measures and fertilization.

Disease assessments on three upper leaves were carried out at growth stages 39, 59, and 77 according to EPPO guideline 1/26 (4) at. The severity of the disease per season was expressed by the area under the disease progress curve (AUDPC) value (Simko and Piepho, 2012):

$$AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{y_i + y_{i+1}}{2} x(t_{i+1} - t_i)$$

TABLE 1 Fungicide treatments (active ingredients g ha⁻¹) applied in the field trials at GS 39.

Treatment	MoA	g a.i. ha ⁻¹
Untreated	–	–
Azoxystrobin	QoI	250
Pyraclostrobin	QoI	250
Fluxapyroxad	SDHI	125
Benzovindiflupyr	SDHI	75
Prothioconazole	DMI	200

where n is the total number of assessments; y_i – disease severity (%) at the i th assessment; t_i – days at the i th assessment.

The trials were harvested with a small plot harvester Haldrup C-85 (Germany). Grain yield was adjusted to 15% moisture content and converted to t/ha.

2.7 Statistical analysis

Statistical analysis of the experimental data was performed by applying the analysis of variance (ANOVA) using the PROC GLM procedure of software SAS, version 9.4 (SAS Institute, USA). Duncan's multiple range test was selected to determine the differences between treatments ($p < 0.05$) (Raudonius, 2017).

3 Results

3.1 Fungicide sensitivity screening

Forty isolates were tested for sensitivity to prothioconazole-desthio, mefentrifluconazole, and fenpicoxamid, as 2 of the initial isolates (out of 42) were contaminated by other microorganisms. The mean EC₅₀ value for prothioconazole-desthio was 0.14 mg/l, with single isolates ranging from 0.01 to 1.37 mg/l (Table 2). The average EC₅₀ value for mefentrifluconazole was 0.28 mg/l, with single isolates ranging from 0.01 to 1.7 mg/l. The EC₅₀ values of reference isolate IPO 323 was 0.01 mg/l both for prothioconazole-desthio and mefentrifluconazole. The average resistance factors for prothioconazole-desthio and mefentrifluconazole were 14 and 28, respectively. The average EC₅₀ value for fenpicoxamid was 0.24 mg/l, with single isolate values ranging from 0.06 to 0.95 mg/l. The EC₅₀ value of the reference isolate IPO 323 for fenpicoxamid was likewise 0.24 mg/l, therefore, the mean resistance factor for it was 1, ranging from 0 to 4.

TABLE 2 Mean EC₅₀ (mg/l) values and resistance factors (RF) for prothioconazole-dethio, mefentrifluconazole and fenpicoxamid in *Z. tritici* isolates from Lithuania.

	Reference IPO323	Average	RF
Prothioconazole-dethio	0.01	0.14 (0.01-1.37)	14
Mefentrifluconazole	0.01	0.28 (0.01-1.7)	28
Fenpicoxamid	0.24	0.24 (0.06-0.95)	1

3.2 QoI and SDHI resistance

All 42 *Z. tritici* single pycnidium isolates were tested to determine the presence of *Cytb* gene mutation G143A which had been linked to high resistance levels to QoI fungicides. The mutation was found in 76.2% (32 out of 42) isolates (Table 3). The mutations C-T79N and C-N86S, related to resistance to SDHI fungicides, were not detected in the single pycnidium isolates.

A total of 23 DNA samples from a bulk of leaves, originating from 23 locations throughout Lithuania, were tested to determine the frequency of the alterations C-T79N and C-N86S in SDH-C. The alteration C-T79N was not detected in these samples. The alteration C-N86S, however, was found in 3 samples at low frequencies (5.83, 8.28, and 17%).

3.3 DMI resistance-conferring mechanisms

The sequencing of *Z. tritici* isolates from Lithuania revealed at least three mutations per isolate. A total of 13 target site alterations were detected amongst 39 isolates (Figure 2). The most frequent mutation, I381V, was found in all the isolates. Two different alterations were found at amino acid positions 459-461; either by deletion of Y459 and G460 or by the substitution Y461H. The latter was detected in 59% of the isolates, while the remaining 41% of the isolates contained the deletion of Y459 and G460. Another frequently detected mutation was L50S; this alteration was found in nearly 70% of isolates. The alteration S524T, related to decreased sensitivity to many azoles, was found in 41% of the isolates.

Across all 39 isolates of *Z. tritici*, 9 different *CYP51* haplotypes were identified (Table 4). Haplotype D13 showed the highest frequency, representing 30.8% of isolates. This haplotype consists of four mutations in *CYP51*: V136C, I381V, Y461H, and S524T. The second most frequent haplotype was F2 (L50S, S188N, I381V, Del459/460, and N513K), representing 28.2% of the isolates. Haplotype C8 (L50S, I381V, and Y461H)

represented 10.3% of the isolates. These 3 haplotypes comprised almost 70% of the *Z. tritici* population of isolates from Lithuania. The haplotypes of the two isolates were not identified. One of those consisted of alterations L50S, S188N, A379G, I381V, A410T, Del459/460 in *CYP51*. Another one contained alterations L50S, V136G, S188N, I381V, Del459/460, N513K.

Forty-two isolates were screened for the presence of inserts in the *CYP51* promoter region. Two isolates from the Lithuanian population contained the wild-type promoter without inserts (Figure 3). The insert of 120 bp was detected in 35.7% of the isolates. In the majority (59.5%) of the isolates, the 866 bp insert was detected.

The assay to determine possible MDR revealed that one of the isolates (21-ZT-LT-14-01) had a promoter insert in the *MFS1* gene. It was determined to be a novel type of insert.

3.4 Field experiment

The field efficacy of fungicides with different MoA was determined via the area under disease progress curve (AUDPC) values. Field experiments were carried out in 2020 and 2021; average AUDPC values varied from 43.65 to 184.53 (Table 5). The results from field trials showed moderate control of STB in field trials, however, treatments showed significant field efficacy. Fluxapyroxad showed the highest efficacy in both years by decreasing the AUDPC by 76.2 and 63.1% in 2020 and 2021, respectively. The field efficacy of azoxystrobin was the lowest, yielding 42.0 and 38.7% in 2020 and 2021, respectively.

All treatments resulted in increased grain yield, improving it within the ranges of 0.1-5.1% and 2.2-14.2% in 2020 and 2021, respectively, in comparison with untreated control (Table 6). In both years, the highest significant grain yield increase was obtained from treatment with fluxapyroxad; the increase reflected the level of disease control. The lowest yield increase was determined by applying azoxystrobin and pyraclostrobin in 2020 and 2021, respectively.

TABLE 3 Frequency of mutations conferring resistance to QoI and SDHI fungicides in Lithuania in 2021.

Mutation	Wild type	Mutated	Frequency (%)
G143A	10	32	76.2
N86S	42	0	0
T79N	42	0	0

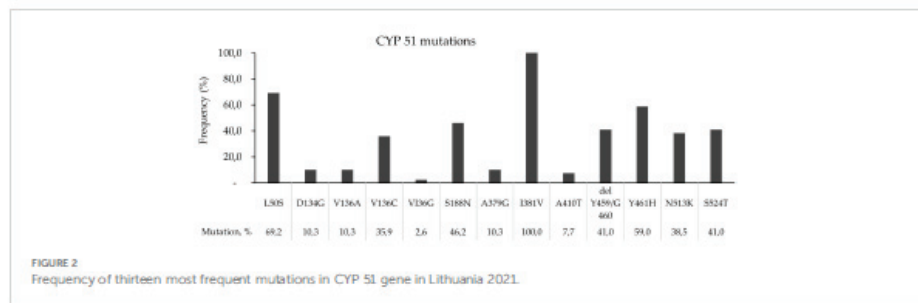
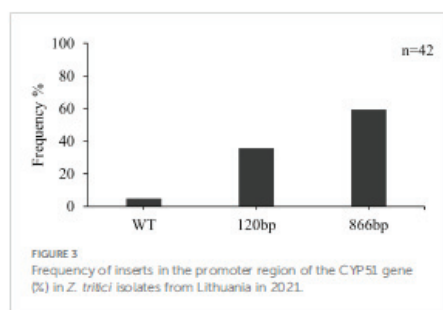


TABLE 4 The frequency of CYP51 haplotypes of *Z. tritici* found in the isolates from Lithuania and positions of target site mutations they contain.

Haplotypes	Position of target site mutation												Frequency (%)
	L50	D134	V136	S188	A379	I381	A410	Y459	G460	Y461	N513	S524	
C8	S	-	-	-	-	V	-	-	-	H	-	-	10.3
D13	-	-	C	-	-	V	-	-	-	H	-	T	30.8
E4	S	G	A	-	-	V	-	-	-	H	-	-	7.7
E7	S	-	C	-	-	V	-	-	-	H	-	T	2.6
F2	S	-	-	N	-	V	-	del	del	-	K	-	28.2
F4	S	-	C	N	-	V	-	-	-	H	-	T	5.1
F8	S	G	A	-	-	V	-	-	-	H	-	T	2.6
G1	S	-	-	N	G	V	-	del	del	-	K	-	2.6
H5	S	-	-	N	G	V	T	del	del	-	K	-	5.1

- means no mutation at this position.



4 Discussion

The first research project, aiming to evaluate the sensitivity levels of *Z. tritici* to DMI fungicides in Lithuania was by Ronis et al., 2014. Subsequently, studies performed by researchers from Denmark (Wieczorek et al., 2015; Heick et al., 2017) and Estonia (Mäe et al., 2020) included few samples from Lithuania in their studies. The latter screened not only the sensitivity to DMI fungicides, but also QoI and SDHI fungicides and mechanisms related to resistance occurrence (Mäe et al., 2020). Therefore, the present study was carried out to identify any possible changes and determine the current status of fungicide resistance in the Lithuanian *Z. tritici* population.

TABLE 5 The area under disease progress curve (AUDPC) of winter wheat infected by *Z. tritici* in 2020 and 2021.

Treatment	g ha ⁻¹	2020		2021	
		AUDPC	% Control	AUDPC	% Control
Untreated	–	184.53 c	–	133.26 d	–
Azoxystrobin	250	106.95 b	42.0	81.75 c	38.7
Pyraclostrobin	250	88.32 b	52.1	60.45 ab	54.6
Fluxapyroxad	125	43.65 a	76.2	49.19 a	63.1
Benavindiflupyr	75	46.74 a	74.7	65.50 abc	50.9
Prothioconazole	200	99.91 b	45.9	76.81 bc	42.4

Different letters represent significant differences (p<0.05).

TABLE 6 Effect of fungicides on the grain yield of winter wheat in 2020 and 2021.

Treatment	g ha ⁻¹	2020		2021	
		Yield t ha ⁻¹	Yield increase, %	Yield t ha ⁻¹	Yield increase, %
Untreated	–	8.89 a	–	6.93 a	–
Azoxystrobin	250	8.90 a	0.1	7.45 cd	7.5
Pyraclostrobin	250	9.05 abc	1.8	7.08 ab	2.2
Fluxapyroxad	125	9.34 c	5.1	7.92 f	14.2
Benavindiflupyr	75	9.17 abc	3.2	7.31 bc	5.4
Prothioconazole	200	9.15 abc	2.9	7.74 def	11.6

Different letters represent significant difference (P<0.05).

DMI fungicides have been used for almost 40 years in Lithuania, where they are essential fungicides for STB control, as in the rest of Europe. Ronis et al. (2014) reported a decline in sensitivity of the Lithuanian *Z. tritici* population to DMI fungicides epoxiconazole and cyproconazole between 2009 and 2011. A fungicide sensitivity test was carried out with two DMI fungicides: prothioconazole-desthio and mefentrifluconazole. Moreover, the frequencies of *CYP51* mutations, which are related to sensitivity decrease, were investigated. Furthermore, in this study, the isolates were classified by the number of alterations in the *CYP51* gene.

Prothioconazole has been used since 2006 in mixtures with other active ingredients. However, as a solo product it was registered only in 2018 (VATZUM, 2018). Although the EC₅₀ values in this study for prothioconazole-desthio varied, the mean value remained similar to the one reported in 2020 (Mäe et al., 2020); therefore, no visible shift was observed. In the field experiment, prothioconazole had a similar control of STB as was showcased in 2014 by Ronis et al., thus reflecting an observed stabilization of DMIs in 2019 (Heick et al., 2020).

One isolate stood out due to its high EC₅₀ value for prothioconazole-desthio (1.37 mg/l). This isolate contained a

combination of mutations D134G, V136A, and S524T. This combination was confirmed to be related to reduced sensitivity for prothioconazole (Cools and Fraaije, 2013; Kildea et al., 2019). The isolates from this study, possessing a combination of D134G and V136A, had low EC₅₀ values for prothioconazole-desthio, as opposed to the findings of Huf et al. (2018). Overall, this study showed an increase in the frequency of mutation S524T, which significantly influences DMI sensitivity (Cools et al., 2011). As seen over the past decade, there is a tendency of increasing mutation S524T and V136C frequencies in the Lithuanian *Z. tritici* population (Wieczorek et al., 2015; Heick et al., 2017; Mäe et al., 2020). The mutation I381V was found in all investigated isolates, thus continuing to be the dominant mutation in Lithuania (Heick et al., 2017; Mäe et al., 2020).

Mefentrifluconazole was introduced in the European and Lithuanian markets in 2020. It is a new DMI group fungicide with superior efficacy against *Z. tritici* amongst other fungicides in the group (Bryson et al., 2018; Jørgensen et al., 2020). The sensitivity test with mefentrifluconazole revealed high diversity in EC₅₀ values. The reason for this variation could be linked to the previous findings showing the cross-resistance pattern. Other studies revealed a strong correlation between the

sensitivity of mefenftruconazole and tebuconazole (Mäe et al., 2020), as well as trifluconazole and difenoconazole (Cools and Fraaije, 2013). Although it is unknown if mefenftruconazole selects for specific alterations, the isolates carrying the mutation A410T (7.7%) had higher EC₅₀ values for mefenftruconazole.

The overexpression of the target gene, which is likewise associated with reduced sensitivity towards fungicides, was screened in this study. The 866 bp insertion at higher frequencies was already found in the Lithuanian *Z. tritici* population back in 2017 (Heick et al., 2017). However, the 120 bp insertions were discovered for the first time by Mäe et al., 2020. Our findings showed an increase in the frequency of the latter type of insertion. The 120 bp insertion was primarily found in isolates with *CYP51* haplotype F2 (L50S, S188N, I318V, Del459/460, N513K), in accordance with studies carried out in other countries (Cools et al., 2012; Huf et al., 2018).

Enhanced active fungicide efflux, also known as multi-drug resistance (MDR), has also been reported as a resistance mechanism. MDR is explained as the overexpression of the “major facilitator gene” (*MFS1*). So far, 3 types of inserts (type I, II, and III) in the promoter region were identified concerning *MFS1* overexpression (Leroux and Walker, 2011; Omrane et al., 2017). In the present study, none of these were detected; however, we found one insertion that had not been reported previously. Initial studies do not implicate that this novel insert is associated with enhanced efflux activity (data not shown).

As mentioned previously, alteration of *Cytb* at location G143 is responsible for the resistance to QoI group fungicides. Our results showed that the frequency of this mutation in the Lithuanian *Z. tritici* population increased slightly in comparison to the results obtained in 2020 by A. Mäe et al. Moreover, it quadrupled over the past eight years (Heick et al., 2017), thus, explaining the relatively low efficacy of azoxystrobin and pyraclostrobin in the field trial. Fenpicoxamid is a relatively new active ingredient in fungicides, demonstrating a novel mode of action (QII), and is currently not registered in Lithuania. Fouché et al. (2021) linked the alteration G37V in *Cytb* to reduced sensitivity in *Z. tritici* strains, therefore, future monitoring for fenpicoxamid is essential. In this study, the sensitivity test with fenpicoxamid was performed; these results can serve as baseline sensitivity data in future investigations.

Although the SDH subunit C has numerous mutations, the alterations T79N and N86S are the most frequent and had been linked to reduced sensitivity to SDHI fungicides (Rehfus et al., 2018; Hellin et al., 2021). In the present study, these mutations were not detected in *Z. tritici* single isolates. Similarly, none of these mutations were identified in Estonia, Latvia, or Poland in 2019 (Hellin et al., 2021). The field experiment further confirms these findings, as fluxapyroxad had the highest efficacy against the disease. No single isolates were found to harbour C-T79N or

C-N86S, which had been associated with reduced field efficacy when present in high frequencies. However, when assessing the frequency of these mutations in bulk samples, the mutation N86S was found in 3 samples, which suggests that these mutations are starting to occur in our region.

The more frequent development of resistance to fungicides is induced by the chosen control measures (Heick et al., 2017; Jørgensen et al., 2021a). Several measures had already been investigated to delay the emergence and spread of fungicide resistance in pathogen populations, and to ensure effective disease control. Researchers suggest strategies that include choosing resistant varieties, using fungicide mixtures and dose rate changing (Hobbelen et al., 2014), minimizing the number of fungicide applications by selecting appropriate application timings (Verikaite et al., 2022), and other integrated pest management (IPM) measures (Ponomarenko et al., 2011).

5 Conclusions

The current fungicide resistance status in *Z. tritici* in Lithuania follows the tendencies observed in other European countries. While the field efficacy of QoI group fungicides has been significantly comprised by the advent and spread of the target site mutation G143A, a more gradually shifting field efficacy of DMI fungicides is observed. This has been associated with the complexity of *CYP51* alteration combinations and a more distinct cross-resistance pattern. Presently, no reduction in field efficacy of SDHI fungicides in Lithuania is reported, however, the first occurrences of mutations are being recorded. Resistance to the newly released DMI mefenftruconazole and the QII fenpicoxamid fungicides was observed at sufficiently low levels. Nevertheless, to prolong the longevity of both old and new active ingredients, the integration of anti-resistance measures embedded in an IPM approach should be imperative.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Author contributions

KL: investigation, writing—original draft, writing—review and editing, visualization. TH: conceptualization, methodology, writing—review and editing. JR: supervision, writing—review and editing. RA: writing—review and editing. AR: writing—review and editing. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated

organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2022.1075038/full#supplementary-material>

References

- Birr, T., Hasler, M., Verreut, J.-A., and Klink, H. (2021). Temporal changes in sensitivity of *Zymoseptoria tritici* field populations to different fungicide modes of action. *Agriculture* 11, 269. doi: 10.3390/agriculture11030269
- Brunner, P. C., Stefanato, F. I., and McDonald, B. A. (2008). Evolution of the CYP51 gene in *Mycosphaerella graminicola*: evidence for intragenic recombination and selective replacement. *Mol. Plant Pathol.* 9, 305–316. doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00464.x
- Bryson, R. J., Stummler, G., Hu, A., Strobel, D., Meyer, L., and Maronval, M. H. (2018). *Mefenflucanazole – the first Isopropanol-azole fungicide for the control of Zymoseptoria tritici including field isolates with known complex CYP51 haplotypes. In 12^e Conférence Int. sur les Mal. des Plantes, 11-12 décembre 2018, Tours (France)*. Vegephyt, 222–231.
- Cheval, P., Siah, A., Bomble, M., Popper, A. D., Reignault, P., and Halama, P. (2017). Evolution of Qol resistance of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* in northern France. *Crop Prot.* 92, 131–133. doi: 10.1016/j.cropro.2016.10.017
- Cools, H. J., Bayon, C., Atkins, S., Lucas, J. A., and Fraaije, B. A. (2012). Overexpression of the sterol 14 α -demethylase gene (MgCYP51) in *Mycosphaerella graminicola* isolates confers a novel azole fungicide sensitivity phenotype. *Pest Manage. Sci.* 68, 1034–1040. doi: 10.1002/ps.3263
- Cools, H. J., and Fraaije, B. A. (2013). Update on mechanisms of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola* and implications for future control. *Pest Manage. Sci.* 69 (2), 150–155. doi: 10.1002/ps.3348
- Cools, H. J., Mullins, J. G., Fraaije, B. A., Parker, J. E., Kelly, D. E., Lucas, J. A., et al. (2011). Impact of recently emerged sterol 14 α -demethylase (CYP51) variants of *Mycosphaerella graminicola* on azole fungicide sensitivity. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3830–3837. doi: 10.1128/aem.00027-11
- FRAC (Working Group of the Fungicide Resistance Action Committee) (2022). Minutes of the Succinate Dehydrogenase Inhibitor (SDHI) meeting. Available at https://www.frac.info/docs/default-source/working-groups/sdhi-fungicides/sdhi-meeting-minutes/minutesof-the-2022-sdhi-meeting-with-recommendations-for-2022-from-18th-jan-2022.pdf?sfvrsn=0034e9a_2 (Accessed 01 August 2022).
- Fouché, G., Michel, T., Lalève, A., Wang, N., Young, D., Meunier, B., et al. (2021). Directed evolution predicts cytochrome b G37V target site modification as probable adaptive mechanism towards the Qol fungicide fenpicoxamid in *Zymoseptoria tritici*. *Environ. Microbiol.* 24, 1117–1132. doi: 10.1111/1462-2920.15760
- Grasso, V., Palermo, S., Sierotki, H., Garibaldi, A., and Gisi, U. (2006). Cytochrome b gene structure and consequences for resistance to quin inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pest Manage. Science* 62, (6) 465–472. doi: 10.1002/ps.1236
- Heick, T. M., Justesen, A. F., and Jørgensen, L. N. (2017). Resistance of wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* to DMI and QoI fungicides in the Nordic-Baltic region – a status. *Eur. J. Plant Pathology* 149, 669–682. doi: 10.1007/s10658-017-1216-7
- Heick, T. M., Matzen, N., and Jørgensen, L. N. (2020). Reduced field efficacy and sensitivity of demethylase inhibitors in the Danish and Swedish *Zymoseptoria tritici* populations. *Eur. J. Plant Pathol.* 157, 625–636. doi: 10.1007/s10658-020-02029-2
- Hellin, P., Duvveter, M., Heick, T. M., Fraaije, B. A., Bataille, C., Clindemalle, A., et al. (2021). Spatio-temporal distribution of DMI and SDHI fungicide resistance of *Zymoseptoria tritici* throughout Europe based on frequencies of key target-site alterations. *Pest Manage. Science* 77 (12), 5576–5588. doi: 10.1002/ps.6601
- Hobden, P. H. F., Paveley, N. D., and van den Bosch, F. (2011). Delaying selection for fungicide insensitivity by mixing fungicides at a low and high risk of resistance development: A modeling analysis. *Phytopathology* 101, 1224–1233. doi: 10.1094/PHYTO-10.10.0290
- Hobden, P. H. F., Paveley, N. D., and van den Bosch, F. (2014). The emergence of resistance to fungicides. *PLoS One* 9, e91910. doi: 10.1371/journal.pone.0091910
- Huf, A., Rehfus, A., Lorenz, K. H., Bryson, R., Voegelé, R. T., and Stummler, G. (2018). Proposal for a new nomenclature for CYP51 haplotypes in *Zymoseptoria tritici* and analysis of their distribution in Europe. *Plant Pathol.* 67, 1706–1712. doi: 10.1111/ppa.12891
- Jørgensen, L. N., and Heick, T. M. (2021b). Azole use in agriculture, horticulture, and wood preservation – is it indispensable? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11. doi: 10.3389/fcimb.2021.730297
- Jørgensen, L. N., Matzen, N., Hansen, J. G., Semakieni, R., Korbus, M., Danilewicz, J., et al. (2018b). Four azoles' profile in the control of septoria, yellow rust and brown rust in wheat across Europe. *Crop Protection* 105, 16–27. doi: 10.1016/j.cropro.2017.10.018
- Jørgensen, L. N., Matzen, N., Havis, N., Holdgate, S., Clark, B., Blake, J., et al. (2020). "Efficacy of common azoles and mefenflucanazole against septoria, brown rust and yellow rust in wheat across Europe," in *Modern fungicides and antifungal compounds IX*. Eds. H. B. Deising, B. Fraaije, A. Mehl, E. C. Oerke, H. Sierotki and G. Stummler (Braunschweig: DPG Verlag), 27–34.
- Jørgensen, L. N., Matzen, N., Heick, T. M., Havis, N., Holdgate, S., Clark, B., et al. (2021a). Decreasing azole sensitivity of *Z. tritici* in Europe contributes to reduced and varying field efficacy. *J. Plant Dis. Prot.* 128, 287–301. doi: 10.1007/s41348-020-00372-4
- Jørgensen, L. N., Oliver, R. P., and Heick, T. M. (2018a). Occurrence and avoidance of fungicide resistance in cereal diseases. *Integrated Dis. Manage. wheat barley*, 255–280.
- Jørgensen, L. N., Oliver, R. P., and Heick, T. M. (2018b). "Occurrence and avoidance of fungicide resistance in cereal diseases," in *Integrated Disease Management of Wheat and Barley*, ed. R. Oliver, (Cambridge: Burleigh Dodds Science Publishing Limited), 69–93.
- Jélicat, G. R. (1978). "Measurement of substrate and inhibitor binding to microsomal cytochrome p-450 by optical-difference spectroscopy," in *Biochemistry, part c, methods in enzymology*, vol. 52, Eds. S. Fleischer and L. Packer (New York, NY: Elsevier), 258–279. doi: 10.1016/S0076-6899(78)52029-6
- Kiiker, R., Juurik, M., Heick, T. M., and Mäe, A. (2021). Changes in DMI, SDHI, and QoI fungicide sensitivity in the Estonian *Zymoseptoria tritici* population between 2019 and 2020. *Microorganisms* 9, 814. doi: 10.3390/micro908814
- Kildea, S., Heick, T. M., Grant, J., Mehenni-Ciz, J., and Dooley, H. (2019). A combination of target-site alterations, overexpression and enhanced efflux activity contribute to reduced azole sensitivity present in the Irish *Zymoseptoria tritici* population. *Bur. J. Plant Pathology* 154, 529–540. doi: 10.1007/s10658-019-01676-4
- Kildea, S., Mehenni-Ciz, J., Spink, J., and O'Sullivan, E. (2014). "Changes in the frequency of Irish *mycosphaerella graminicola* CYP51 variants 2006–2011," in *17th international reinhardtbrunn symposium*. Eds. H. W. Dehne, H. B. Deising, B. Fraaije, U. Gisi, D. Hermann and A. Mehl (Braunschweig, Germany: DPG Spectrum Phyto-medizin), 143–144.
- Klink, H., Verreut, J.-A., Hasler, M., and Birr, T. (2021). Will triazoles still be of importance in disease control of *Zymoseptoria tritici* in the future? *Agronomy* 11, 933. doi: 10.3390/agronomy11050933
- Leroux, P., Albertini, C., Gautier, A., Gredi, M., and Walker, A. S. (2007). Mutations in the CYP51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 α -demethylase inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Manage. Sci.* 63 (7), 688–698. doi: 10.1002/ps.1390

- Leroux, P., and Walker, A. S. (2011). Multiple mechanisms account for resistance to sterol 14 α -demethylase inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Manage. Science*, 67, 44–59. doi: 10.1002/ps.2028
- Lynch, J. P., Glynn, E., Kildea, S., and Spink, J. (2017). Yield and optimum fungicide dose rates for winter wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties with contrasting ratings for resistance to septoria tritici blotch. *Field Crops Res.* 204, 89–100. doi: 10.1016/j.fcr.2017.01.012
- Mäe, A., Pillingar, S., Sooväli, P., and Heik, T. M. (2020). Fungicide sensitivity shifting of *Zymoseptoria tritici* in the Finnish-Baltic region and a novel insertion in the MFS1 promoter. *Front. Plant Sci.* 11. doi: 10.3389/fpls.2020.00385
- Omrane, S., Audcon, C., Ignace, A., Duplais, C., Aouini, L., Kema, G., et al. (2017). Plasticity of the MFS1 promoter leads to multi drug resistance in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *mSphere* 2, e00393–e00317. doi: 10.1128/mSphere.00393-17
- Omrane, S., Sghyer, H., Audcon, C., Janen, C., Duplais, C., Walker, A. S., et al. (2015). Fungicide efflux and the MgMFS1 transporter contribute to the multidrug resistance phenotype in *Zymoseptoria tritici* field isolates. *Environ. Microbiol.* 17 (8), 2805–2823. doi: 10.1111/1462-2920.12781
- Owen, W. J., Yao, C., Myung, K., Kemmitt, G., Leuder, A., Meyer, K. G., et al. (2017). Biological characterization of impicosamid, a new fungicide with utility in cereals and other crops. *Pest Manage. Science*, 73 (10), 2005–2016. doi: 10.1002/ps.4588
- Ponomarenko, A., Goodwin, S. B., and Kema, G. H. J. (2011). Septoria tritici blotch (STB) of wheat. *Plant Health Instructor*. doi: 10.1094/PHI-I-2011-0407-01
- Raudonis, S. (2017). Application of statistics in plant and crop research: important issues. *Zemdirbyste-Agriculture*, 104 (4), 377–382. doi: 10.13080/z-a.2017.104.048
- Rehfuß, A., Strobel, D., Bryson, R., and Stammler, G. (2018). Mutations in *sdh* genes in field isolates of *Zymoseptoria tritici* and impact on the sensitivity to various succinate dehydrogenase inhibitors. *Plant Pathol.* 67, 175–180. doi: 10.1111/ppa.12715
- Ronis, A., Jørgensen, L. N., Semaškienė, R., Gaunčiūnienė, I., and Ramanauskienė, J. (2014). Sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* isolates to demethylase-inhibiting (DMI) fungicides. *Zemdirbyste-Agriculture*, 101 (2), 177–184. doi: 10.13080/z-a.2014.101.023
- Russell, P. E. (2005). A century of fungicide evolution. *J. Agric. Sci.* 143, 11–25. doi: 10.1017/S0021859605004971
- Savary, S., Wilcoquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N., and Nelson, A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nat. Rev. Evolution*, 3, 430–439. doi: 10.1038/s41559-018-0793-y
- Sierotki, H., and Salliet, G. (2013). A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. *Phytopathology*, 103, 880–887. doi: 10.1094/PHYTO-01-13-0009-RVW
- Simko, I., and Piepho, H. P. (2012). The area under the disease progress stairs: calculation, advantage, and application. *Phytopathology*, 102, 381–389. doi: 10.1094/PHYTO-07-11-0216
- Sykes, E. M., Sackett, K. E., Severns, P. M., Mundt, C. C., et al. (2018). Sensitivity variation and cross-resistance of zymoseptoria tritici to azole fungicides in north America. *Eur. J. Plant Pathology*, 151, 269–274. doi: 10.1007/s10658-017-1370-y
- Torriani, S. F., Brunner, P. C., McDonald, B. A., and Sierotki, H. (2009). Qol resistance emerged independently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Manage. Sci.* 65, 155–162. doi: 10.1002/ps.1662
- Torriani, S. F., Melichar, J. P., Mills, C., Pain, N., Sierotki, H., and Courbot, M. (2015). *Zymoseptoria tritici*: A major threat to wheat production, integrated approaches to control. *Fungal Genet. Biol.* 79, 8–12. doi: 10.1016/j.fgb.2015.04.010
- VATZUM (2018) The state plant service under the ministry of agriculture page: [sakymas dėl fungicidų Proline įregistravimo profesionaliajam naudojimui. Available at: http://www.vatzum.lt/uploads/documents/a151_proline.pdf (Accessed 01 August 2022).
- Verikaitė, K., Ramanauskienė, J., Armonienė, R., and Ronis, A. (2022). Evaluation of fungicide application programmes for septoria tritici blotch control in winter wheat. *Zemdirbyste-Agriculture*, 109 (2), 149–156. doi: 10.13080/z-a.2022.109.019
- Wiczarok, T. M., Berg, G., Semaškienė, R., Mehl, A., Sierotki, H., Stammler, G., et al. (2015). Impact of DMI and SDHI fungicides on disease control and CYP51 mutations in populations of *Zymoseptoria tritici* from northern Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* 143, 861–871. doi: 10.1007/s10658-015-0737-1
- Zadoks, J. C., Chang, T. T., and Konzak, C. F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *World Res.* 14, 415–421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x>
- Ziogas, B. N., and Malandrakis, A. A. (2015). "Sterol biosynthesis inhibitors: C14 demethylation (DMIs)," in *Fungicide resistance in plant pathogens*. Eds. H. Ishii and D. Hollomon (Tokyo: Springer). doi: 10.1007/978-4-431-55642-8_13

ISSN 1392-3196 / e-ISSN 2335-8947

Zemdirbyste-Agriculture, vol. 109, No. 2 (2022), p. 149–156

DOI 10.13080/z-a.2022.109.019

Evaluation of fungicide application programmes for *Septoria tritici* blotch control in winter wheat

Karolina VERIKAITĖ, Jūratė RAMANAUSKIENĖ, Rita ARMONIENĖ, Antanas RONIS

Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry

Instituto al. 1, Akademija, Lithuania

E-mail: karolina.verikaite@lammc.lt

Abstract

Zymoseptoria tritici is the causal agent of *Septoria tritici* blotch (STB) in wheat, and its spread is reported to depend on environmental conditions. Since the spread of disease is usually controlled by using fungicides, selecting timings of their application is crucial. The aim of the present study was to estimate the effect of two fungicide application programmes for STB control in winter wheat and to evaluate the relationship between the severity of disease and quantified DNA of *Z. tritici* in leaves. Two field experiments (in monoculture field and in the field after non-host crops) with winter wheat were designed, and six fungicide application treatments were chosen. For the disease control, fungicide Adexar (a.i. fluxapyroxad 62.5 g l⁻¹ + epoxiconazole 62.5 g l⁻¹) in dosages 1.0 and 2.0 l ha⁻¹ was used. In 2019, due to unfavourable meteorological conditions, plant infestation with the pathogen was low. Nevertheless, comparing the experiments from both crop rotations, there were marked trends of higher severity of STB in winter wheat monoculture. Meanwhile, in 2020 and 2021, the values of the area under the disease progress curve (AUDPC) were higher in winter wheat grown after non-host crops. Differences between tested application programmes were more precise at higher disease pressure in 2020 and 2021. According to the results of a three-year field experiment, higher effectiveness of controlling STB showed fungicide application programmes based on weather conditions and two applications per season. A more important influence of fungicide application programmes on grain yield increase was found in winter wheat monoculture. Application of fungicides had a higher impact in the 2020 cropping season, when a higher level (AUDPC 358.6) of STB disease infection was observed. In both crop rotations, the highest grain yield increase was obtained by applying fungicide twice: 8–10 days after rain and two weeks after the first application. In both crop rotations, Pearson's correlation test showed a strong relationship between visual assessments of disease severity and DNA quantity of *Z. tritici* in leaves of winter wheat.

Keywords: application programmes, AUDPC, real-time-PCR, *Septoria tritici* blotch, *Zymoseptoria tritici*.

Introduction

Septoria tritici blotch (*Zymoseptoria tritici*) is a widespread and economically important disease of winter wheat, which has a significant negative impact on grain yield. If left without control, yield losses caused by the fungus *Z. tritici* range from 30% to 50% (AHDB, 2012; Jørgensen et al., 2014). The primary source of inoculum is sexual ascospores, which disperse from previous wheat stubbles and infect young plants in autumn (Suffert et al., 2011). These ascospores infect leaves to produce chlorotic and necrotic lesions and fruiting bodies (pycnidia). In spring, asexual spores (conidia) are formed in pycnidia, which are rain splashed up the plant causing the secondary inoculum (Duvivier et al., 2013).

Meteorological conditions are very important in the development of fungal diseases in winter wheat. The incidence and severity of *Septoria tritici* blotch (STB) may greatly vary depending on the environmental conditions. Spore transfer and germination are the most important steps in the life cycle of *Z. tritici*, which depends upon the availability of water; therefore, rain in

May and June is closely related to disease intensity (Wiik, Ewaldz, 2009; Beyer et al., 2012). At stem extension period, high rainfall promotes rapid spore movement from lower to upper leaves. The time of epidemic onset is very important, because early epidemics cause more severe damage of the disease than those occurring later in the growing period. Meteorological conditions are the main factor in the decision to forecast disease and to determine the time for the effective fungicide application (El Jarroudi et al., 2017).

Another essential trait of *Z. tritici* is the latent phase, which is a period from spore contact with the leaf to visual symptoms. Under field conditions, the latent phase of STB lasts from 14 days in the summer period to 28 days in colder weather conditions (AHDB, 2012). The timing of application is complicated, because it is difficult to predict the progression of the disease. Plant protection against STB is focused on the application of foliar fungicide sprays, for optimum, to protect the upper three leaves, which provide most of the grain-

Please use the following format when citing the article:

Verikaitė K., Ramanauskienė J., Armonienė R., Ronis A. 2022. Evaluation of fungicide application programmes for *Septoria tritici* blotch control in winter wheat. *Zemdirbyste-Agriculture*, 109 (2): 149–156. DOI 10.13080/z-a.2022.109.019

filling capacity (Fraaije et al., 1999) and contribute to approximately 75% of the final grain yield (Paveley et al., 2000). A typical programme for STB control includes two to four fungicide sprays from early pre-stem extension to a final application at full flowering stage (AHDB, 2012; Fones, Gurr, 2015; Creissen et al., 2018). Application timing determined by the plant growth stage takes no account of pathogen epidemiology. Therefore, this control strategy should be limited, and a decision should be based on inoculum development, rainfall distribution, cultivar susceptibility, and fungicide activity (Burke, Dunne, 2008). Furthermore, fungicides are hazardous for the environment, as they take up to 30% of all plant protection products used in winter wheat (Holka, Bienkowski, 2020).

In recent years, the development of *Z. tritici* resistance to fungicides (Jørgensen et al., 2018) and legislative constraints regarding the reduction of fungicide product usage (Jess et al., 2014) increased the demand for new plant protection programmes.

The aim of the present study was to estimate the effect of fungicide application programmes for STB control in winter wheat and to evaluate the relationship between severity of disease and DNA quantity of *Z. tritici* in wheat leaves.

Materials and methods

Field experiment and design. The experiment was carried out at the Department of Plant Pathology and Protection of the Institute of Agriculture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, in 2019–2021. Two field experiments with different crop rotations were designed with winter wheat cultivars 'Arkadia' in 2020 and 'Skagen' in 2019 and 2021 with natural infection

each year. According to disease assessments performed in the previous years, both cultivars had similar resistance levels to *Septoria tritici* blotch (STB). One experiment was sited in winter wheat monoculture (since 2005), the other in winter wheat grown after non-host crops: peas, oilseed rape, and peas in 2019, 2020, and 2021, respectively. Winter wheat was sown at a seed rate of 430 viable seeds m⁻². The experimental plots were 2.5 m in width and 10 m in length. All plots were arranged in randomised blocks in four replicates. For disease control, the Lithuania-registered (during experimental period) fungicide Adexar (a.i. fluxapyroxad 62.5 g l⁻¹ + epoxiconazole 62.5 g l⁻¹) with protective and curative effects was used and spray-applied with a high pressure plot sprayer (Strøby MaskinVærksted, Denmark). During the experiment, common plant growing practices were used.

The experimental design consisted of untreated control and six treatments with two standard fungicide application (A) programmes (Table 1). At treatment No. 2, applications in dosages 1.0 l ha⁻¹ were done according to the recommendations of the product manufacturer: applications from plant growth stages (GS) 31 to 69 – at winter wheat stem elongation (the first application (A1) at GS 32) and at heading (the second application (A2) at GS 51–55) stages according to Zadoks growth scale. Treatment No. 3 was applied according to the Agricultural and Horticulture Development Board (AHDB, 2019) at the stages of stem elongation beginning (A1 at GS 32) and flag leaf (A2 at GS 37–39). In treatments Nos. 4–7, applications were done according to the weather conditions: observing weather conditions from plant GS 31 (1st node) stage, 5–7 and 8–10 days after the rain. One application in full dosage (2.0 l ha⁻¹) was done in treatments No. 5 and No. 7, 5–7 and 8–10 days after the rain, respectively.

Table 1. Experimental design and description of fungicide application

No.	Application programme	Fungicide l ha ⁻¹	Application timing*			
			2019		2021	
			date	GS	date	GS
1.	Untreated (control)	–	–	–	–	–
2.	A1 GS 32;	1.0	05 23	32–37	05 04	31
	A2 GS 51–55	1.0	06 18	51–55	06 08	55–59
3.	A1 GS 32;	1.0	05 23	32–37	05 04	31
	A2 GS 37–39	1.0	06 06	39–43	05 19	33–37
4.	A1 5–7 days after rain;	1.0	05 23	32–37	05 08	32
	A2 two weeks after A1	1.0	06 06	39–43	05 25	41–43
5.	A1 5–7 days after rain	2.0	05 23	32–37	05 08	32
6.	A1 8–10 days after rain;	1.0	05 30	37–41	05 11	33
	A2 two weeks after A1	1.0	06 18	51–55	05 28	43–47
7.	A1 8–10 days after rain	2.0	05 30	37–41	05 11	33

* – observing from plant growth stage (GS) 31; application: A1 – first, A2 – second

At hard maturity, the plots (2 × 10 m) were harvested with a small plot harvester Haldrup C-85 (Germany). Grain weight and moisture content were measured by weighing and moisture systems of the harvester. Grain yield in t ha⁻¹ was adjusted to 14% moisture content. A thousand grain weight (TGW) was calculated with a grain counter Contador (Hoffman Manufacturing, Germany).

Assessments. During the experimental period, three assessments at GS 31, 65, and 75 were done. A total of ten plants randomly selected from each plot were inspected visually, and STB severity was assessed on two or three upper leaves following the plant senescence. The severity of the disease per season was expressed by the area under the disease progress curve (AUDPC) value (Simko, Piepho, 2012):

$$\text{AUDPC} = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{y_i + y_{i+1}}{2} \times (t_{i+1} - t_i),$$

where n is the total number of assessments; y_i – disease severity (%) at the i^{th} assessment; t_i – days at the i^{th} assessment.

Leaf sampling. During 2019, 2020, and 2021 cropping seasons, leaf samples were collected from winter wheat monoculture, when winter wheat were grown after peas (2019), oilseed rape (2020), and peas (2021). Starting from 1 May to 30 June, samples of the three upper leaves (separately 25 leaves for each layer) were randomly collected every week; each sample contained 25 leaves from separate leaf layers. To determine the start of STB spread and its development at different plant growth stages, the leaves were assessed

for disease symptoms (Figure 3). Until real-time-PCR (qPCR) analysis, samples were labelled and stored in plastic bags in a refrigerator (at -20°C).

DNA extraction and qPCR. Samples composed of ten randomly selected winter wheat leaves (from leaves collected as described in the leaf sampling section) for *Zymoseptoria tritici* DNA extraction had been collected in 2019 and 2020. A total of 112 samples were collected, 58 of which were without STB symptoms. The homogenisation of the samples was done using liquid nitrogen. DNA was extracted from 0.1 g of the homogenised sample using a commercial plant DNA kit E.Z.N.A. (Omega Bio-Tek Inc., USA). Assays for *Z. tritici* were carried out in 15 μl of reaction mixture containing 7.5 μl Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lithuania), 2.5 μl tested DNA, 3.5 μl nuclease-free water, 0.5 μl BSA (bovine serum albumin) and 0.5 μl (10 pM μl^{-1}) of each forward and reverse primer. Two specific primer pairs were used: forward 5'-ATTGGCGAGAGGGATGAAGG-

3' and reverse 5'-TTCGTGTCCCAGTGCCTGTA-3' (Duvivier et al., 2013). For the detection of plant DNA and normalisation of the reactions, the EF1 α primers Hor1F (5'-TCTCTGGGTTTGAGGGTGAC) and Hor2R (5'-GGCCCTTGTACCAGTCAAGGT) were employed. For individual standard curves, five-fold dilution series with *Z. tritici* DNA isolated from pure culture were used. The amplification reactions were performed in two replications on 7900HT Fast Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA) using the following cycling protocol: initial duration at 95°C for 10 min and 40 cycles at 95°C for 15 s each, 60°C for 20 s, and 72°C for 40 s (Duvivier et al., 2013). Values of reactions were calculated as pg of fungal DNA per μg of plant DNA (Nicolaisen et al., 2009).

Weather conditions. Data were collected at the meteorological station located in Akademija, Kėdainiai district. The weather conditions varied over the three experimental seasons (Table 2).

Table 2. Monthly rainfall and average temperatures in autumn from October and November and in spring–summer from March to June for the cropping seasons

Cropping season	October	November	March	April	May	June
Sum of precipitation mm						
2018–2019	32.8 (13)*	12.9 (8)	37.8 (19)	0.0	55.4 (12)	16.1 (5)
2019–2020	34.9 (14)	29.5 (14)	31.7 (12)	9.5 (5)	50.1 (11)	165.9 (14)
2020–2021	49.4 (18)	35.6 (21)	16.3 (13)	26.3 (16)	100.9 (20)	30.1 (9)
Long-time average (1924–2020)	49.6	44.8	36.9	51.4	62.3	76.5
Air temperature, mean $^{\circ}\text{C}$						
2018–2019	7.9	2.9	3.3	8.9	12.9	20.6
2019–2020	9.3	4.9	3.5	6.8	10.6	18.9
2020–2021	10.2	5.3	2.0	6.4	11.4	19.6
Long-time average (1924–2020)	6.9	2.0	-0.5	6.0	12.4	15.8

* – number of rainy days

In all three experimental years (2019–2021), the average monthly air temperature was higher compared to the long-time mean. Overall, 2019 was a warm and dry year. The amount of precipitation in October–November and March–June 2019 (155.0 mm) was lower compared to the amount (321.5 mm) of long-time average (1924–2020). In April 2019, it was drastically low (0 mm), whereas in 2020, in the same months, the sum of precipitation was the same as the long-time average (1924–2020), although in April, the amount of precipitation was five times lower than the long-time average. The autumn of 2020 was warm with higher amount of precipitation compared with other years. In summary, 2021 had more rainy days and similar temperatures as the other years.

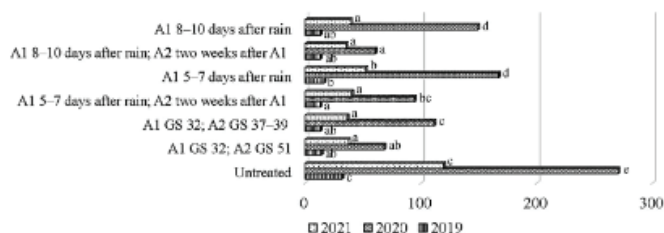
Statistical analysis of the experimental data was made using the analysis of variance (ANOVA) by procedure PROC GLM of software SAS, version 9.4 (SAS Institute, USA). To determine the differences between treatments, Duncan's multiple range test was used ($P < 0.05$) (Raudonius, 2017). To conduct Pearson's correlation between disease infection, TGW, and grain yield from the different crop rotations, procedure PROC CORR was used. Standard error (SE) of the mean grain yield and TGW were calculated.

Results and discussion

The severity of STB and the effect of fungicide application programmes. The data collected from years 2019–2021 shows that disease severity greatly varied

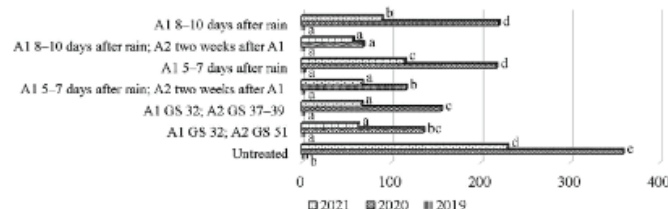
between the experimental years and crop rotations, which frequently occurs in the Lithuanian climate (Ronis et al., 2014). In 2019, dry weather conditions might have been the reason for the low infestation of plants, as the spread of STB infection is reliant on rainfall during the growing period (Pietravalle et al., 2003). In untreated (control) winter wheat crop, AUDPC values were 32.1 and 5.9 in monoculture and winter wheat grown after non-host crops, respectively (Figures 1 and 2). In 2020, the average of AUDPC values was 270.3 in monoculture and 358.6 in winter wheat grown after non-host crop (oilseed rape). In 2021, the average of AUDPC values was 119.7 in monoculture and 229.9 in winter wheat grown after non-host crop (peas). Favourable weather conditions for the development of STB infection are temperate temperatures in winter and high rainfall during the growing period, especially in May and June (Pietravalle et al., 2003; O'Driscoll et al., 2014; El Jaroudi et al., 2017). In 2020, rainy June might have been the reason for higher infestation of plants.

Despite low severity of disease in 2019, both in monoculture and after non-host crops, all application programmes significantly reduced STB severity in comparison with untreated crops. There were no significant differences detected between application programmes in the winter wheat grown after non-host crops. In monoculture, the only significant difference established between fungicide application programmes was where fungicide applications were conducted 5–7 days after rain, once and twice.



Note. Means followed by the same letter do not significantly differ ($P = 0.05$, Duncan's multiple range test).

Figure 1. Effect of fungicide application programmes (A1 and A2) on the area under disease progress curve (AUDPC) values of *Septoria tritici* blotch in winter wheat monoculture, 2019–2021



Note. Means followed by the same letter do not significantly differ ($P = 0.05$, Duncan's multiple range test).

Figure 2. Effect of fungicide application programmes (A1 and A2) on the area under disease progress curve (AUDPC) values of *Septoria tritici* blotch in winter wheat grown after non-host crops, 2019–2021

In experimental years 2020 and 2021, all fungicide application programmes significantly reduced disease severity in both experiments. The results of 2020 show that the most effective application timing in both rotations was where fungicide was applied twice: A1 8–10 days after rain and A2 two weeks after A1. Single fungicide applications (5–7 days and 8–10 days after rain) were least effective compared to other programmes, with hardly any difference between the two. According to the results of current experiment, heavy and frequent rains (165.9 mm) in June influenced the longer period of infection of STB, therefore, single fungicide applications were less effective. In 2021, significant differences between fungicide application programmes were detected. Lower efficiency (50–61%) of fungicide was found in winter wheat grown after peas crop in plots, where single application was done, regardless of the number of days after the rain, and in winter wheat monoculture, where fungicide spray was conducted 5–7 days after rain.

The effectiveness of fungicide application programmes was more pronounced in experimental years 2020 and 2021, when disease severity was higher. The results of these two years showed that the programmes, when fungicide was used twice were more effective. Results of current experiment indicate that single application has a lesser effect on disease severity, because higher STB pressure was observed after the emergence of flag leaf (Figure 3).

Previous studies suggest that disease control on the upper three leaf layers of the crop canopy is very important, because those are critical to grain yield formation (Paveley et al., 2012; van den Berg et al., 2013). Researchers from the United Kingdom (Paveley et al., 2000; 2012) as the main fungicide application programme recommend two sprays (A1 and A2): A1 is done at the full emergence of the third leaf (GS 32),

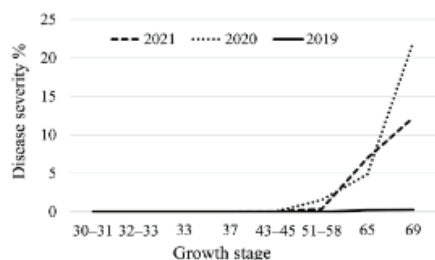


Figure 3. Development of *Septoria tritici* blotch at different plant growth stages on the upper three leaves of winter wheat, 2019–2021

and A2 is done at the full emergence of the flag leaf (GS 39). In the present study, in application programmes with two fungicide sprays, the second application (A2) was done at full emergence of the flag leaf, which maximised fungicide life. These fungicide application programmes resulted in lower severity of STB.

Effect of crop rotations on the severity of STB.

In the comparison of two crop rotations, AUDPC values differed in 2019–2021. In 2019, higher disease severity was recorded in monoculture, meanwhile in 2020 and 2021, AUDPC values were higher in winter wheat grown after non-host crops. Results of the studies show that winter wheat as pre-crop might increase disease intensity (Wenda-Piesik et al., 2016), whereas the data from 2020 and 2021 of current experiment coincides with the conclusions made by Latvian researchers. The STB infection level is influenced more by meteorological conditions than crop rotation (Bankina et al., 2018). O'Driscoll et al. (2014) noted that STB flourishes, when

temperatures in winter are temperate and rainfall during the growing period is high. Thus, weather conditions in the cropping seasons of 2020 and 2021 were perfect for intensive development of STB infection. Other researchers suggest that aerial canopy architecture and plant architectural features such as the number of tillers, leaf dimensions, and vertical distance between leaves influence splash-dispersed pathogens and are important factors in disease management (Tivoli et al., 2012). Canopy density has an effect on disease spread by reducing the distance of spore dispersal (Schoeny et al., 2008).

In the present study, winter wheat as monoculture was grown for more than ten successive years. After 15 years, in winter wheat monoculture, a reduction in disease severity was even more pronounced compared to non-host crops. Also, in spring of 2020 and 2021, very dry weather conditions with a lower average temperature influenced plant development (Table 2). Winter wheat grown as monoculture had sparser canopy compared to wheat grown after oilseed rape (2020) and peas (2021). These factors had an impact on spore dispersal and disease reduction and explain higher STB severity in 2020 and 2021 in winter wheat grown after non-host crops.

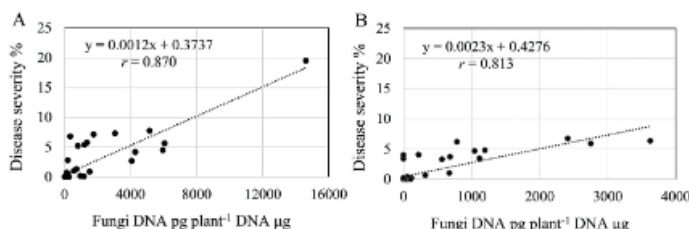


Figure 4. Relationship between severity of Septoria tritici blotch and DNA quantity of *Zymoseptoria tritici* in winter wheat monoculture (A) (n = 58) and in winter wheat grown after non-host crops (B) (n = 54) in 2019 and 2020

in disease control, an essential role may play early diagnosis of disease by qPCR (Fones, Gurr, 2015; Tonfi et al., 2019). The best effect of fungicides against STB is approximately the seventh day of the latent period, when the symptoms of the disease are not visible yet. Good plant protection practice requires the use of fungicides prophylactically, before the disease emerges, to protect the newly formed leaves (Fones, Gurr, 2015).

Effect of fungicide application programmes on winter wheat grain yield. The findings of the three-year experiment indicated that grain yield differed between years and rotations. The highest grain yield of wheat monoculture was recorded in 2020, meanwhile of winter wheat grown after non-host crops in 2019. It is known that wheat grown after wheat as monoculture result in grain yield losses (Darguza, Gaile, 2019). Diversification of crop rotation has a considerable impact on winter wheat grain yield and its quality. In all experimental years, the grain yield of winter wheat grown after non-host crops was higher than that of monoculture: 68.5% in 2019, 32.6% in 2020, and 52.6% in 2022 (Table 3).

However, more important influence of fungicide application programmes on grain yield increase was found in winter wheat monoculture. Grain yield increase due to fungicide applying is highly dependable on weather conditions, especially rainfall (Byamukama et al., 2019). In the experiment, it was possible to observe such tendency in winter wheat monoculture grain yield: in 2019, increases per hectare varied from 0.04 to 0.36 t ha⁻¹, in 2020 from 0.07 to 0.70 t ha⁻¹, and in 2021 from 0.08 to 0.35 t ha⁻¹. However, these tendencies did not establish themselves in winter wheat grown after non-host crops.

Quantification of Zymoseptoria tritici in winter wheat leaves. To increase the efficiency of a minimum number of sprays, carrying out applications during the early stage of infection is most important. Early application can be ineffective, as the pathogen is not yet present, whilst late application can be inefficient, because the infection has already occurred (Beyer et al., 2012). To assess disease spread and quantify *Z. tritici* in winter wheat leaves, leaf samples were collected in 2019 and 2020 (Figure 3). Higher concentrations of the pathogen were identified in leaves from winter wheat monoculture. Both in winter wheat monoculture and winter wheat grown after non-host crops statistical analysis of data highlighted a strong correlation ($r = 0.870$ and $r = 0.813$, respectively) between visual assessment of disease severity and DNA quantity of *Z. tritici* (Figure 4). Hence, the higher quantity of *Z. tritici*, the higher STB severity. *Z. tritici* DNA was detected in 96.5% of the tested leaf samples (n = 58) without visible symptoms of the disease.

These results show that visual diagnosis leads to partial success in fungicide use as the latent period of *Z. tritici* is long enough, from 14 to 28 days. Therefore,

Grain yield increase due to different fungicide application programmes in 2019 from 0.34 to 0.90 t ha⁻¹, in 2020 from 0.37 to 0.96 t ha⁻¹, and in 2021 from 0.02 to 0.28 t ha⁻¹ was observed.

As shown by the results of the present study, the best benefits of using fungicides were in the 2020 cropping season, when a higher level of STB disease infection occurred. The averaged grain yield results showed the highest yield increase from the application programme, in which fungicide was applied twice (A1 8–10 days after rain and A2 two weeks after A1) in both crop rotations.

Effect of fungicide application programmes on TGW. All application programmes in 2019 affected TGW positively; however, in winter wheat grown after non-host crops, the increase in TGW was insignificant (Table 4).

In winter wheat monoculture, all fungicide application programmes significantly increased TGW compared with the untreated (control) crop. It should be noted that there were no significant differences between application programmes. Hence, double fungicide applying could be not profitable due to low disease severity, as reported by El Jarroudi et al. (2015). In 2020, all application programmes increased TGW: the highest increase was in the crops, where fungicide using was chosen according to weather conditions, and double fungicide sprayings were made. Comparing all experimental years, TGW increase was the lowest in 2021.

Relationships between STB severity, grain yield, and TGW. Pearson's correlation test showed that disease severity had a higher impact on TGW than on grain yield (Table 5).

Table 3. Effect of fungicide application on winter wheat grain yield (\pm SE), 2019–2021

Application programme		2019			
		monoculture	after non-host		
1.	Untreated (control)	4.35 a	± 0.27	7.03 a	± 0.17
2.	A1 GS 32; A2 GS 51–55	4.38 abc	± 0.08	7.37 abc	± 0.10
3.	A1 GS 32; A2 GS 37–39	4.46 abc	± 0.17	7.30 abc	± 0.08
4.	A1 5–7 days after rain; A2 two weeks after A1	4.68 bc	± 0.19	7.91 bc	± 0.31
5.	A1 5–7 days after rain	4.71 c	± 0.29	7.93 c	± 0.38
6.	A1 8–10 days after rain; A2 two weeks after A1	4.40 abc	± 0.13	7.81 bc	± 0.34
7.	A1 8–10 days after rain	4.45 abc	± 0.11	7.39 abc	± 0.14
		2020			
		monoculture		after non-host	
1.	Untreated (control)	4.91 a	± 0.21	6.41 a	± 0.21
2.	A1 GS 32; A2 GS 51–55	4.99 a	± 0.41	7.05 bcd	± 0.19
3.	A1 GS 32; A2 GS 37–39	5.27 bcd	± 0.27	7.14 bcd	± 0.29
4.	A1 5–7 days after rain; A2 two weeks after A1	5.37 abc	± 0.37	7.02 bcd	± 0.18
5.	A1 5–7 days after rain	4.98 a	± 0.26	6.95 b	± 0.10
6.	A1 8–10 days after rain; A2 two weeks after A1	5.62 bc	± 0.26	7.37 d	± 0.17
7.	A1 8–10 days after rain	5.62 c	± 0.23	6.78 ab	± 0.21
		2021			
		monoculture		after non-host	
1.	Untreated (control)	4.30 a	± 0.17	7.08 ab	± 0.13
2.	A1 GS 32; A2 GS 51–55	4.85 cde	± 0.17	7.21 ab	± 0.09
3.	A1 GS 32; A2 GS 37–39	4.58 ab	± 0.18	7.35 b	± 0.11
4.	A1 5–7 days after rain; A2 two weeks after A1	5.09 e	± 0.14	7.31 ab	± 0.13
5.	A1 5–7 days after rain	4.64 abc	± 0.15	7.23 ab	± 0.14
6.	A1 8–10 days after rain; A2 two weeks after A1	4.85 bcde	± 0.16	7.28 ab	± 0.15
7.	A1 8–10 days after rain	4.63 abc	± 0.17	7.09 ab	± 0.13

Note. The difference between the values with the same letter was not significant between different application programmes according to Duncan's multiple range test.

Table 4. Effect of fungicide application on winter wheat thousand grain weight (\pm SE), 2019–2021

Application programme		2019			
		monoculture	after non-host		
1.	Untreated (control)	34.93 a	± 0.40	45.85 ab	± 0.69
2.	A1 GS 32; A2 GS 51–55	37.49 c	± 0.61	47.10 ab	± 0.76
3.	A1 GS 32; A2 GS 37–39	37.02 bc	± 0.87	46.19 ab	± 0.66
4.	A1 5–7 days after rain; A2 two weeks after A1	36.87 bc	± 0.67	47.17 ab	± 0.63
5.	A1 5–7 days after rain	36.00 bc	± 0.69	47.29 b	± 0.60
6.	A1 8–10 days after rain; A2 two weeks after A1	37.03 bc	± 0.79	46.81 ab	± 0.84
7.	A1 8–10 days after rain	36.91 bc	± 0.88	46.45 ab	± 0.60
		2020			
		monoculture		after non-host	
1.	Untreated (control)	46.85 a	± 0.32	45.41 a	± 0.14
2.	A1 GS 32; A2 GS 51–55	50.11 bcd	± 0.41	49.37 cde	± 0.30
3.	A1 GS 32; A2 GS 37–39	49.92 bcd	± 0.37	48.67 c	± 0.27
4.	A1 5–7 days after rain; A2 two weeks after A1	50.47 d	± 0.30	49.78 de	± 0.32
5.	A1 5–7 days after rain	49.32 b	± 0.26	47.33 b	± 0.25
6.	A1 8–10 days after rain; A2 two weeks after A1	50.19 bcd	± 0.31	49.98 e	± 0.16
7.	A1 8–10 days after rain	48.31 e	± 0.07	47.34 b	± 0.03
		2021			
		monoculture		after non-host	
1.	Untreated (control)	40.62 a	± 0.06	38.97 a	± 0.39
2.	A1 GS 32; A2 GS 51–55	41.02 abc	± 0.20	39.90 bcd	± 0.06
3.	A1 GS 32; A2 GS 37–39	40.63 a	± 0.07	40.18 bcd	± 0.25
4.	A1 5–7 days after rain; A2 two weeks after A1	41.16 abc	± 0.26	40.25 cd	± 0.27
5.	A1 5–7 days after rain	40.63 a	± 0.09	39.47 ab	± 0.28
6.	A1 8–10 days after rain; A2 two weeks after A1	41.23 c	± 0.34	40.52 d	± 0.20
7.	A1 8–10 days after rain	40.67 abc	± 0.39	40.21 cd	± 0.30

Note. The difference between the values with the same letter was not significant between different application programmes according to Duncan's multiple range test.

Table 5. Pearson's correlation coefficient (r) for relationships between *Septoria tritici* blotch AUDPC values, winter wheat thousand grain weight (TGW), and grain yield

Year	TGW		Grain yield	
	r	p -value	r	p -value
Monoculture				
2019	-0.952***	0.0011	ns	0.4480
2020	-0.914**	0.0040	ns	0.2593
2021	ns	0.3200	ns	0.2215
After non-host				
2019	ns	0.1631	ns	0.1187
2020	-0.9843****	<0.0001	-0.9533****	0.0009
2021	-0.9015**	0.0055	ns	0.0933

* – significant at **** <0.0001, *** <0.001 and ** <0.01; ns – not significant

In winter wheat monoculture, a strong significant correlation between AUDPC values and TGW was established in 2019 and 2021; meanwhile, in winter wheat grown after non-host crops it established itself in 2020 and 2021. In most cases, the correlation between AUDPC and grain yield was not significant; statistical analysis demonstrated a strong significant correlation only in winter wheat grown after non-host crops in 2020.

Conclusions

1. In the experiment, the severity of Septoria tritici blotch (STB) varied between experimental years and crop rotations. Different weather conditions during the experimental period were responsible for the differences of STB severity in winter wheat. The highest disease severity (AUDPC values) was recorded in 2020, when the weather was warm and humid. Between the crop rotations, higher disease severity in winter wheat growing as monoculture was in 2019. Meanwhile, in 2020 and 2021, AUDPC values were higher in winter wheat grown after non-host crops.

2. The effectiveness of fungicide application programmes was more pronounced in experimental years 2020 and 2021 with higher disease severity. The average data showed that more effective control of STB was, when fungicide applying was chosen based on weather conditions and fungicide was used twice.

3. A more important influence of fungicide application programmes on grain yield increase was found in winter wheat monoculture. In all three experimental years, the grain yield of winter wheat grown after non-host crops was higher than that of monoculture: 68.5% in 2019, 32.6% in 2020, and 52.6% in 2022.

4. Pearson's correlation test showed a strong relationship between visual assessment of disease severity and DNA quantity of *Zymoseptoria tritici* in wheat leaves in both crop rotations. *Z. tritici* DNA was detected in 96.5% of the tested leaf samples without visible symptoms of the disease.

These results show that early diagnosis of disease may play an important role in disease control.

Acknowledgements

This study was funded by the long-term research programme "Harmful organisms in agro and forest ecosystems" (KOMAS) implemented by the Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry.

Received 01 02 2022

Accepted 04 04 2022

References

- AHDB. 2012. Septoria tritici in winter wheat. Topic Sheet 113/ Spring 2012. <https://ahdb.org.uk/septoriatritici>
- AHDB. 2019. Fungicide programmes for wheat. <https://ahdb.org.uk/knowledge-library/fungicide-programmes-for-wheat>
- Bankina B., Bimšteine G., Arhipova I., Kaņeps J., Stanka T. 2018. Importance of agronomic practice on the control of wheat leaf diseases. *Agriculture*, 8 (4): 56. <https://doi.org/10.3390/agriculture8040056>
- Beyer M., Jarroudi M. E., Junk J., Pogoda F., Dubos T., Gørgen K., Hoffmann L. 2012. Spring air temperature accounts for the bimodal temporal distribution of Septoria tritici epidemics in the winter wheat stands of Luxembourg. *Crop Protection*, 42: 250–255. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.07.015>
- Byamukama E., Ali S., Kleinjan J., Yabwalo D. N., Graham C., Caffè-Tremil M., Mueller N. D., Rickertsen J., Berzonsky W. A. 2019. Winter wheat grain yield response to fungicide application is influenced by cultivar and rainfall. *The Plant Pathology Journal*, 35 (1): 63–70. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.04.2018.0056>
- Burke J., Dunne B. 2008. Investigating the effectiveness of the Thies Clima "Septoria Timer" to schedule fungicide applications to control *Mycosphaerella graminicola* on winter wheat in Ireland. *Crop Protection*, 27 (3–5): 710–718. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2007.10.007>
- Creissen H. E., Glynn E., Spink J. H., Kildea S. 2018. The effect of fungicides applied pre-stem extension on Septoria tritici blotch and yield of winter wheat Ireland. *Crop Protection*, 104: 7–10. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.10.003>
- Darguza M., Gaile Z. 2019. Yield and quality of winter wheat, depending on crop rotation and soil tillage. Proceedings of 25th International Scientific Conference 'Research for Rural Development-2019'. Jelgava, Latvia, vol. 2, p. 29–35. https://lurp.liu.lv/conference/Research-for-Rural-Development/2019/LatviaResRuralDev_25th_2019_vol2-29-35.pdf
- Duvivier M., Dedeurwaerder G., De Proft M., Moreau J. M., Legreve A. 2013. Real-time PCR quantification and spatio-temporal distribution of airborne inoculum of *Mycosphaerella graminicola* in Belgium. *European Journal of Plant Pathology*, 137: 325–341. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0245-0>
- El Jarroudi M., Kouadio L., Junk J., Beyer M., Pasquali M., Bock C. H., Delfosse P. 2015. Do single, double or triple fungicide sprays differentially affect the grain quality in winter wheat? *Field Crops Research*, 183: 257–266. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2015.08.012>
- El Jarroudi M., Kouadio L., El Jarroudi M., Junk J., Bock C., Diouf A. A., Delfosse P. 2017. Improving fungal disease forecasts in winter wheat: A critical role of intraday variations of meteorological conditions in the development of Septoria leaf blotch. *Field Crop Research*, 213: 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2017.07.012>
- Fones H., Gurr S. 2015. The impact of Septoria tritici blotch disease on wheat: an EU perspective. *Fungal Genetics and Biology*, 79: 3–7. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.004>
- Fraaije B. A., Lovell D. J., Rohel E. A., Hollomon D. W. 1999. Rapid detection and diagnosis of Septoria tritici epidemics in wheat using a polymerase chain reaction/PicoGreen assay. *Journal of Applied Microbiology*, 86 (4): 701–708. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00716.x>
- Holka M., Bienkowski J. 2020. Assessment of toxicity impacts of chemical protection of winter wheat, sugar beet and winter rape on aquatic ecosystems and humans. *Zemdirbyste-Agriculture*, 107 (2): 131–138. <https://doi.org/10.13080/z-a.2020.107.017>
- Jess S., Kildea S., Moody A., Rennick G., Murchie A. K., Cooke L. R. 2014. European Union policy on pesticides: implications for agriculture in Ireland. *Pest Management Science*, 70 (11): 1646–1654. <https://doi.org/10.1002/ps.3801>
- 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. J., Cheyron P., Maumene C., De Pope C., Ban R., Cordsen Nielsen G., Berg G. 2014. IPM strategies and their dilemmas including an introduction to *www.eurowheat.org*. *Journal of Integrative Agriculture*, 13 (2): 265–281. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(13\)60646-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60646-2)
- 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*, 105: 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.10.018>
- Nicolaisen M., Supronienė S., Nielsen L. K., Lazzaro I., Spliid N. H., Justesen A. F. 2009. Real-time PCR for quantification of individual Fusarium species in cereals. *Journal of Microbiological Methods*, 76 (3): 234–240. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.10.016>

- O'Driscoll A., Kildea A., Doohan F., Spink J., Mullins E. 2014. The wheat-Septoria conflict: a new front opening up? Review. Trends in Plant Science, 19 (9): 602–610. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.04.011>
- Paveley N. D., Lockley D., Vaughan T. B., Thomas J., Schmidt K. 2000. Predicting effective fungicide doses through observation of leaf emergence. Plant Pathology, 49 (6): 748–766. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00518.x>
- Paveley N. D., Blake J., Gladders P., Cockerell V. 2012. HGCA Wheat disease management guide. HGCA Publications, 32 p.
- Pietravalle S., Shaw M. W., Parker S. R., van den Bosch F. 2003. Modelling of relationships between weather and Septoria tritici epidemics on winter wheat: a critical approach. Phytopathology, 93 (10): 1329–1339. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.10.1329>
- Raudonius S. 2017. Application of statistics in plant and crop research: important issues. Zemdirbyste-Agriculture, 104 (4): 377–382. <https://doi.org/10.13080/z-a.2017.104.048>
- Ronis A., Jørgensen L. N., Semaskienė R., Gaurilickienė I., Ramanauskienė J. 2014. Sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* isolates to demethylation-inhibiting (DMI) fungicides. Zemdirbyste-Agriculture, 101 (2): 177–184. <https://doi.org/10.13080/z-a.2014.101.023>
- Schoeny A., Menat J., Darsomval A., Rouault F., Jumel S., Tivoli B. 2008. Effect of pea canopy architecture on splash dispersal of *Mycosphaerella pinodes* conidia. Plant Pathology, 57 (6): 1073–1085. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01888.x>
- Simko I., Piepho H.-P. 2012. The area under the disease progress stairs: calculation, advantage, and application. Phytopathology, 102 (4): 381–389. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-11-0216>
- 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, 60 (2): 166–177. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02369.x>
- Tivoli B., Calonnet A., Richard B., Ney B., Andrivon D. 2012. Current knowledge on plant/canopy architectural traits that reduce the expression and development of epidemics. European Journal of Plant Pathology, 135: 471–478. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0066-6>
- Tonti S., Alvisi G., Pisi A., Nipoti P., Prodi A. 2019. DNA quantification to assess *Zymoseptoria tritici* on a susceptible cultivar of durum wheat to establish the best timing for fungicide application in an Italian environment. Cereal Research Communications, 47 (2): 304–313. <https://doi.org/10.1556/0806.47.2019.03>
- van den Berg F., van den Bosch F., Paveley N. D. 2013. Optimal fungicide application timings for disease control are also an effective anti-resistance strategy: a case study for *Zymoseptoria tritici* (*Mycosphaerella graminicola*) on wheat. Phytopathology, 103 (12): 1209–1219. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-13-0061-R>
- Wenda-Piesik A., Lemańczyk G., Pańka D., Piesik D. 2016. Risk assessment posed by diseases in context of integrated management of wheat. Journal of Plant Diseases and Protection, 123: 3–18. <https://doi.org/10.1007/s41348-016-0008-1>
- Wiik L., Ewaldt T. 2009. Impact of temperature and precipitation on yield and plant diseases of winter wheat in southern Sweden 1983–2007. Crop Protection, 28 (11): 952–962. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2009.05.002>

Fungicidų purškimo programų įtaka lapų septoriozės intensyvumui žieminiuose kviečiuose

K. Verikaitė, J. Ramanauskienė, R. Armonienė, A. Ronis

Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centras

Santrauka

Zymoseptoria tritici sukelia kviečių lapų septoriozę, kuriai plisti vienas svarbiausių veiksnių yra aplinkos sąlygos. Ligos plitimas kontroliuojamas naudojant fungicidus, todėl labai svarbu tinkamai pasirinkti jų panaudojimo laiką. Tyrimo tikslas – įvertinti dviejų fungicidų panaudojimo programų efektyvumą septoriozės kontrolei žieminiuose kviečiuose ir nustatyti ryšį tarp ligos intensyvumo bei *Z. tritici* DNR kiekio kviečių lapuose. Vykdyti du lauko eksperimentai su žieminiuose kviečiais, augintais kaip monokultūra ir lauke po augalo ne šeiminko, ir taikyti šeši purškimo fungicidais variantai. Ligos kontrolei naudotas fungicidas Adexar (v. m. fluksapiroksadas 62,5 g l⁻¹ + epoksikonazolais 62,5 g l⁻¹) 1,0 ir 2,0 l ha⁻¹. Dėl nepalankių meteorologinių sąlygų 2019 m. augalų užkrėstumas septorioze buvo mažas. Vis dėlto, lyginant abi sėjomainas, septoriozės didesnio intensyvumo tendencijos nustatytos žieminių kviečių monokultūroje. 2020 ir 2021 m. sezono metu ligos progreso AUDPC reikšmės buvo didesnės žieminiuose kviečiuose, augusiuose po augalo ne šeiminko. Skirtumai tarp purškimo fungicidais programų buvo ryškesni esant didesniam ligos intensyvumui 2020 ir 2021 m. Remiantis trejų metų lauko eksperimento rezultatais, septoriozės kontrolei efektyviausias buvo fungicidų purškimas du kartus atsižvelgiant į oro sąlygas. Didesnė fungicidų purškimo programų įtaka grūdų derliaus padidėjimui nustatyta žieminių kviečių monokultūroje. Fungicidų panaudojimas didesni poveikį turėjo 2020 m., kai septoriozės intensyvumas buvo didesnis (AUDPC 358.6). Abiejose sėjomainose didžiausias grūdų derliaus padidėjimas gautas fungicidą panaudojus du kartus: 8–10 dienų po lietaus ir dvi savaitės po pirmojo panaudojimo. Pirsono koreliacijos testas parodė stiprų ryšį tarp ligos intensyvumo ir *Z. tritici* DNR kiekio žieminių kviečių lapuose.

Reikšminiai žodžiai: purškimo programos, AUDPC, realaus laiko PGR, septoriozė, *Zymoseptoria tritici*.

APIE AUTORIŲ

Vardas, pavardė

Karolina Lavrukaitė (Verikaitė)

Gimimo data

1992 m. sausio 22 d.

Išsilavinimas

2018–2022 Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro, Žemės ūkio mokslų srities agronomijos krypties doktorantūros studijos.

2015–2017 m. Aleksandro Stulginskio universitetas, įgytas agronomo kvalifikacinis magistro laipsnis.

2010–2014 m. Aleksandro Stulginskio universitetas, įgytas agronomo bakalauro kvalifikacinis laipsnis.

Profesinė patirtis

Nuo 2019 m. Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro Žemdirbystės instituto Augalų patologijos ir apsaugos skyriaus, jaunesnioji mokslo darbuotoja.

2015–2019 m. Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro Žemdirbystės instituto Augalų patologijos ir apsaugos skyriaus, vyresnioji žemės ūkio technikė.

SUMMARY

INTRODUCTION

Winter wheat foliar disease septoria tritici blotch (sexual stage *Mycosphaerella graminicola*, asexual stage *Zymoseptoria tritici*) is the most widespread disease in wheat growing regions (Dean et al., 2012). Field and laboratory studies on the disease damage, epidemiology and the search for effective preventive measures have been conducted for many years, but it is still one of the most economically damaging diseases. In affected crops, especially when the infection is severe on the upper leaves, around 30-40% of yield is lost (Lovell et al., 2002, 2004; Jørgensen et al., 2014; Rodrigo et al., 2015; Matzen et al., 2019).

Weather and environmental conditions are among the most crucial factors in the life cycle of fungal pathogens, and climate changes can also affect the incidence and disease intensity of various fungal diseases (Lucas, 2017). A study in Germany (1996-2021) found a substantial increase in the incidence of septoria tritici blotch over a 25-year period and concluded that climate change has an impact on the dynamics of this disease (Prahl et al., 2023). Meanwhile, in southern European countries, it has been found that climate change is expected to reduce the incidence of the fungus *Z. tritici* by an average of 3-6%, but the different local meteorological conditions, terrain, prevailing vegetation and other factors in a given region make it difficult to extrapolate the obtained results between different regions (Gouache et al., 2013). According to long-term climate change data, the amount of precipitation and the number of rainy days in Lithuania have been increasing (<http://www.meteo.lt/lt/klimato-kaita>), so it is likely that *Z. tritici* has become the predominant disease of wheat in Lithuania over the past decades due to the changing climate (Gaurilėkienė and Ramanauskienė, 2011). According to studies carried out in many countries, the initial infection with *Z. tritici* occurs in autumn, after the sexual dispersal of the causal spores (Suffert and Säche, 2011; Duvivier et al., 2013; Siah et al., 2018).). In Lithuania, no such studies have been carried out and there is no information on the influence of local climatic conditions on the formation of ascospores and their pathogenesis. Research showed that *Z. tritici* isolates differ in their pathogenicity (Ünal et al., 2017). This means that the length of the pathogen's incubation and latent period may vary depending on weather and environmental conditions. Taking all these factors into account, optimising the control of septoria tritici blotch remains one of the major research topics in *Z. tritici*. As the main control method for this disease is the frequent use of fungicides, there is a risk of the pathogen developing resistance to fungicides. A number of cases have already been identified worldwide where frequent fungicide use reduces fungicide efficacy (Cheval et al., 2017; Heick et al., 2017; Blake et al., 2018; Jørgensen et al., 2018; Hellin et al., 2020), as intensive fungicide

use increases the likelihood of the pathogen's genome harbouring mutations that confer fungicide resistance (Taylor and Cunniffe, 2023; Vestergård et al., 2023). However, in Lithuania, these studies are relatively rare and fragmented. Ronis et al. (2014) carried out fungicide resistance studies with the triazole fungicides epoxiconazole, cyproconazole and prothioconazole between 2009 and 2011. Later, isolates from Lithuania were investigated by researchers from Denmark (Wieczorek et al., 2015, Heick et. al., 2017) and Estonia (Mäe et. al., 2020). However, some of the previously tested active substances have lost their effectiveness or may no longer be used in Lithuania. Also, the rapid adaptation of the pathogen to fungicides (Bir et al., 2021) and the development of new fungicide active ingredients requires continuous monitoring of *Z. tritici* resistance to fungicides. In order to slow down the development of the resistance, it is important to choose appropriate agronomic measures, effective fungicides and the optimal timing of their application according to the prevailing climatic conditions (Corkley et al., 2022).

Research hypothesis

In Lithuania, the initial source of septoria tritici blotch infection is likely to be sexual spores (ascospores) forming on post-harvest crop residues in autumn or spring, and the extent of the disease's spread is likely to be influenced by the weather conditions, the plant's response to infection and the chosen control strategy, which may be influenced by the varying resistance of the fungus *Z. tritici* to the fungicides.

Research aim

To identify the *Z. tritici* ascospore dispersal peaks and assess their impact on the spread of septoria tritici blotch in wheat crops; to evaluate the pathogenicity and fungicide resistance of isolates collected in different regions of Lithuania and to optimize the timing of the application of fungicides in different infection conditions.

Research objectives

1. To record the onset and peak of *Z. tritici* ascospores dispersal and to assess the impact of the intensity of their dispersal on the infection in different rotations and to establish a correlation between *Z. tritici* DNA quantity and the intensity of septoria tritici blotch.
2. To optimise the control of septoria tritici blotch in wheat.
3. To carry out a pathogenicity test on fungal isolates collected in Lithuania.
4. Determine the sensitivity of *Z. tritici* isolates to different fungicide groups.

Statements to be defended

1. Airborne sexual ascospores of *Z. tritici* (*M. graminicola*) in Lithuania may not only be a primary source of infection in autumn, but also a potential secondary source of infection in the spring, when plant vegetation resumes.

2. More effective control of septoria tritici blotch is achieved when fungicides are applied on the basis of precipitation recording.

3. The pathogenicity of Lithuanian *Z. tritici* isolates varies depending on the variety of winter wheat infected and the location where the isolate was collected.

4. The Lithuanian population of *Z. tritici* has increased resistance to the active substances of fungicides of the strobilurin (QoI) and triazole (DMI) groups.

The relevance of the study

The spread of the causal agent of septoria tritici blotch is highly dependent on the climatic conditions of the region. Scientists suggest that climate change may make septoria tritici blotch an even more significant issue for wheat growers in the future (Prahl et al., 2023). It is therefore important to study the epidemiology of the pathogen *Zymoseptoria tritici* in the context of climate change. Another major problem is the intensive use of fungicides for the control of septoria tritici blotch, which leads to the pathogen becoming resistant to some fungicide active ingredients (Taylor and Cunniffe, 2023). Recent efforts have been made to reduce the use of pesticides, including fungicides. The European Commission is promoting a 50% reduction in the overall use of chemical pesticides by 2030 (European Commission, 2023). In order to reduce the use of fungicides, it is necessary not only to determine the optimal timing of fungicide applications, but also to study their effectiveness and the acceleration of the risk of increased resistance development in the region.

Novelty of the research project

These studies have shown that *Zymoseptoria tritici* ascospores are the source of primary infection of septoria tritici blotch in autumn and may act as a secondary source of infection in spring. It has been shown that for the effective control of the spread of infection by fungicides it is essential to choose the appropriate timing of application, with a complex assessment of risk factors, focusing on local meteorological conditions. Fungicide resistance studies have shown that the Lithuanian population of *Z. tritici* has increased resistance to fungicides of the strobilurin and triazole groups.

Practical relevance

The results of the studies on fungicide application timing and fungicide resistance of the pathogen *Z. tritici* will help farmers to control wheat septoria tritici blotch infection more efficiently, by selecting the most effective plant protection products and their application timing without compromising the principles of integrated pest management. For future research, these studies will provide a starting point for further monitoring of fungicide resistance in the pathogen.

Approval of the research results

Publications on the dissertation topic: 2 articles have been published in the journals indexed in the „Clarivate Analytics Web of Science“, 4 publications in the proceedings of conferences held in Lithuania. The research results of the dissertation work have been presented at 4 national or international conferences as oral presentations.

Contents and volume of the dissertation

The dissertation is written in Lithuanian language and includes total of 135 pages. It consists of introduction, literature review, description of research methods, experimental results and discussion, conclusions, list of references, list of publications and copies of publications. The dissertation includes 16 tables and 28 figures. A total of 199 literature references have been used.

EXPERIMENTAL METHODS

Research object – *Zymoseptoria tritici* (sexual stage *Mycosphaerella graminicola*), the causal agent of winter wheat foliar disease septoria tritici blotch (STB).

The experiments were carried out in 2019-2022 at the Institute of Agriculture of the Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry (LAMMC), Akademija, Kėdainiai district.

During the *Z. tritici* sexual spore dispersal surveys, the onset, and peaks of airborne *Z. tritici* ascospores were recorded in different crop rotations. Burkard spore traps were used for ascospore detection in a winter wheat monoculture (from 2005 onwards, with straw residues) and in a winter wheat grown after non-host crop (after peas, oilseed rape, and peas in 2019, 2020 and 2021, respectively). The number of spores was determined using an Eclipse E600 microscope (Nikon, Japan) magnified by forty times (Piliponyte-Dzikiene et al., 2014).

For the detection of early *Z. tritici* infection and the assessment of the relationship between *Z. tritici* content in leaves and disease severity, wheat leaf samples were collected in 2019 and 2020. Disease severity was visually assessed, DNA was extracted from the leaves and

the amount of *Z. tritici* DNA in the leaves was determined by real-time polymerase chain reaction (PCR).

To determine the **effect of the fungicide application timing on the intensity of STB**, in 2019-2021, field experiments were set up in a winter wheat monoculture and in a winter wheat crop grown after a non-host crop. The experimental design consisted of untreated control and six treatments (Table 1), fungicide Adexar (a.i. fluxapyroxad 62.5 g l⁻¹ + epoxiconazole 62.5 g l⁻¹) was used for disease control.

Disease severity was assessed using the EPP0 guideline 1/26(4) disease severity percentage scales (1, 5, 10, 25, 50 and 75 %). Disease severity was defined as an index of the area under disease progress curve (AUDPC) (Simko and Piepho, 2012). After harvesting, the grain yield and thousand-grain weight (TGW) were determined.

Table 1. The scheme of fungicide application timings experiment

Nr.	Adexar dose l ha ⁻¹	Application time					
		BBCH 32	BBCH 37-39	BBCH 51	According to precipitation*		
					5-7 days after first rainfall	8-10 days after first rainfall	2 weeks after the first application
1.	<i>Untreated</i>	-	-	-	-	-	-
2.	1,0	x	-	x	-	-	-
3.	1,0	x	x	-	-	-	-
4.	1,0	-	-	-	x	-	x
5.	2,0	-	-	-	x	-	-
6.	1,0	-	-	-	-	x	x
7.	2,0	-	-	-	-	x	-

* observing precipitation from plant growth stage (BBCH 31), applications are done after the first rainfall of 1 mm or more

The sampling of winter wheat leaves with STB symptoms for pathogenicity and fungicide resistance testing was carried out in 2019-2021 in different districts of Lithuania. Samples were collected from twenty-one sites in 2019, 24 in 2020 and 23 in 2021. Single pycnidium isolates were isolated from the leaves.

Pathogenicity test. A pathogenicity test was performed to determine the aggressiveness of *Z. tritici* isolates (Suffert et al., 2013; Ūnal et al., 2017). The studies assessed incubation and latent period length, infection intensity and sporulation.

Fungicide resistance analyses. Fungicide resistance *in vitro* test (Heick et al., 2020) was performed with the fungicides azoxystrobin (the concentrations set to 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0 mg active ingredient per litre (mg a.i. L⁻¹)), pyraclostrobin (10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0 (mg a.i. L⁻¹)), prothioconazole (30, 10, 3, 1.1, 0.37, 0 (mg a.i. L⁻¹)), fluxapyroxad, bixafen and benzovindiflupyr (3, 1, 0.33, 0.11, 0.037, 0 (mg a.i. L⁻¹)). In 2021 two new active ingredients

were also included in the assay mefentrifluconazole and fenpicoxamid both set to 6 / 2 / 1 / 0.2 / 0.1 / 0.02 / 0.01 / 0 mg l⁻¹. Sensitivity to fungicides was calculated by non-linear regression (curve-fit) as the concentration of fungicide, which inhibits fungal growth by 50% (EC50). The calculations were carried out using GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

The C-N86S and C-T79N mutations in the SDH gene were identified using real-time PCR according to Hellin et al. (2021). The mutation G143A in cytochrome b was identified using a genotyping method based on competitive allele specific PCR (KASP) (LGC Genomics, UK) according to the methodology of Kildea et al, (2014). PCR reactions were performed on an Applied Biosystems ViiATM 7 thermocycler (Thermo Fisher Scientific, Denmark) using the manufacturer's protocol.

Mutations in the CYP51 gene were identified by PCR and Sanger DNA sequencing according to Kildea et al. (2019). Sequence results were analysed with the CLC workbench (QIAGEN, Aarhus, Denmark) computer program, and mutations were identified in the DNA sequences of the isolates by comparison with the wild-type strain IPO 323 (a Dutch wild-type strain first isolated in 1984).

The detection of insertions responsible for CYP51 gene overexpression was performed for all isolates, following the methodology of Cools et al. (2012). The presence of increased membrane efflux pump activity, also known as cross-resistance, in the isolates was detected using PCR as described by Omrane et al. (2015).

Field trials were set up to determine the impact of different fungicides on the intensity of STB in 2020-2022. Eight fungicides with different mode of action (MOA) were selected (Table 2). The fungicides were sprayed at the end of winter wheat stem elongation (BBCH 39). Disease severity was assessed and AUDPC was calculated as described in the text earlier.

Table 2. *The experimental scheme*

Treatment	The amount of active ingredient (g ha ⁻¹)	MOA
Untreated	-	-
Azoxystrobin 250 g l ⁻¹	250	QoI
Pyraclostrobin 250 g l ⁻¹	250	QoI
Fluxapyroxad 62,5 g l ⁻¹	125	SDHI
Benzovindiflupyr 100 g l ⁻¹	75	SDHI
Prothioconazole 250 g l ⁻¹	200	DMI
Fluxapyroxad 75 g l ⁻¹ + Pyraclostrobin 150 g l ⁻¹	112.5 + 225	SDHI + QoI
Benzovindiflupyr 75 g l ⁻¹ + Prothioconazole 150 g l ⁻¹	75 + 150	SDHI + DMI
Bixafen 60 g l ⁻¹ + Prothioconazole 200 g l ⁻¹	60 + 200	SDHI + DMI

In all four years (2019-2022), the average monthly air temperature was higher than the long-term average (1924-2022). The high precipitation in May-June during the 2020-2022 survey years favoured the spread of STB infection.

The data were statistically analysed using the SAS 9.4 procedure PROC GLM (SAS Institute, USA). Duncan's test ($P \leq 0.05$) was used to detect differences in disease control (Raudonius, 2017). To determine the correlation between various variables Pearson correlation was calculated using the PROC CORR procedure. The standard error (SE) of the mean grain yield and TGW was calculated using MS Excel.

RESULTS AND DISCUSSION

During the assessment of *Z. tritici* ascospore dispersal rates in 2019-2021, the onset of spore dispersal was recorded in the first decade of October each year (Figure 1). When comparing the ascospore numbers in different rotations, the number of ascospores varied both in the winter wheat monoculture and in the winter wheat, grown after non-host crops.

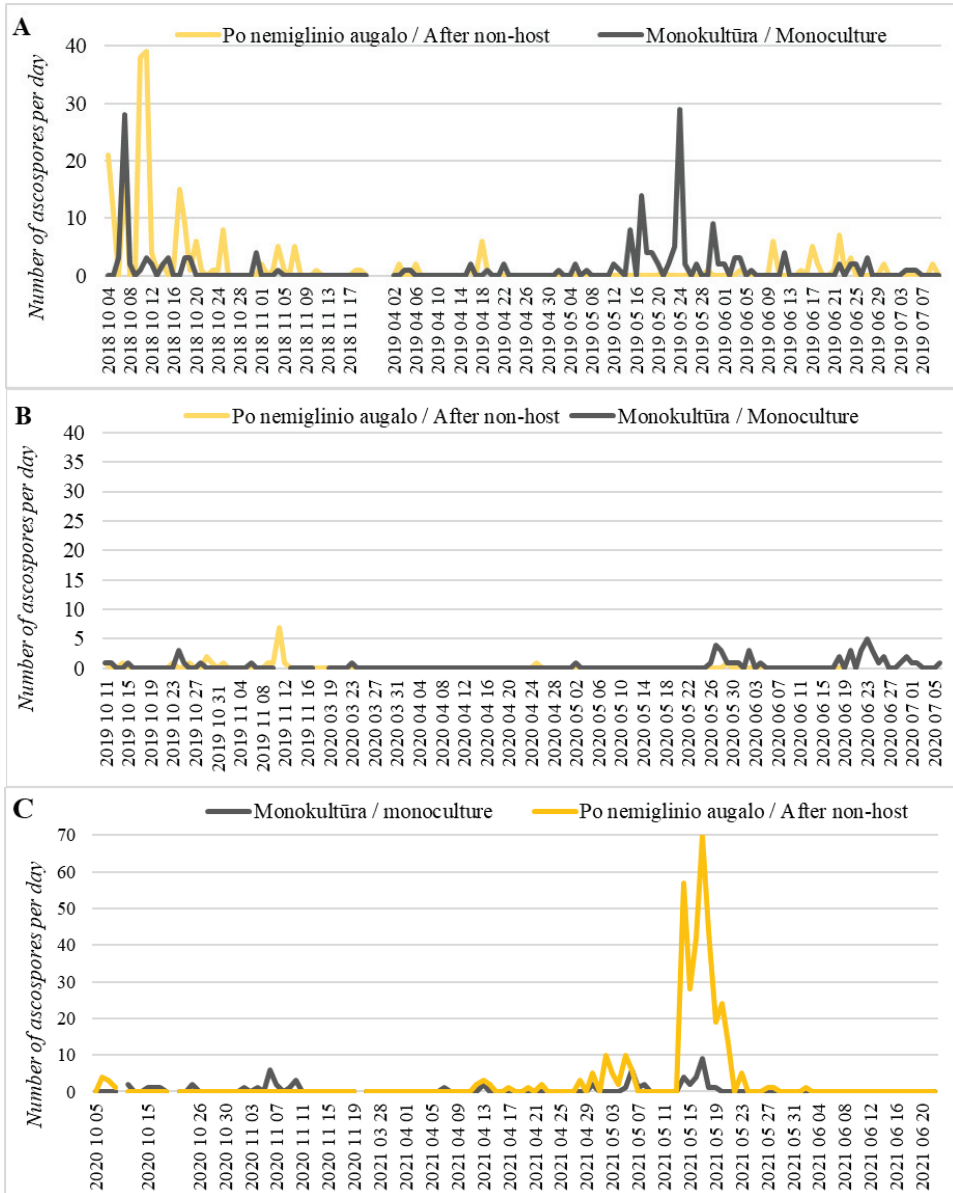


Figure 1. *Z. tritici* ascospore release amounts in winter wheat monoculture and in winter wheat grown after non-host in 2019 (A), 2020 (B) and 2021 (C)

During all three years two peaks of ascospore dispersal were recorded, the first in autumn at the beginning of October and the second in May. The data obtained suggest that *Z. tritici* ascospores in Lithuania may act not only as a primary infection source in autumn but also as a secondary infection source at the end of spring and the beginning of summer. As suggested by Duvivier et al. (2013), such airborne inoculum may increase the likelihood of colonisation of upper leaves in the absence of rainfall if the pycnidiospores are not lifted to higher leaf levels and may also increase the potential for damage from STB by providing a potential additional inoculum. The real-time PCR analysis for the assessment of early *Z. tritici* infection detected *Z. tritici* DNA in as many as 96.5% of samples without visual symptoms. A strong correlation was found between the amount of pathogen DNA present in the plant and the visual assessment of disease severity.

The efficacy of the fungicide application timing was evaluated in field experiments in winter wheat monoculture and winter wheat grown after non-host crops in 2019-2021. The evaluation showed that spray programmes with two applications of fungicide according to the meteorological conditions had the highest effect in reducing the disease intensity (Figures 2 and 3). The evaluation of the impact of different rotations on the severity of STB showed that in 2019 the severity of the disease was higher in the winter wheat monoculture, whereas, in 2020 and 2021, it was higher in winter wheat grown after non-host crops.

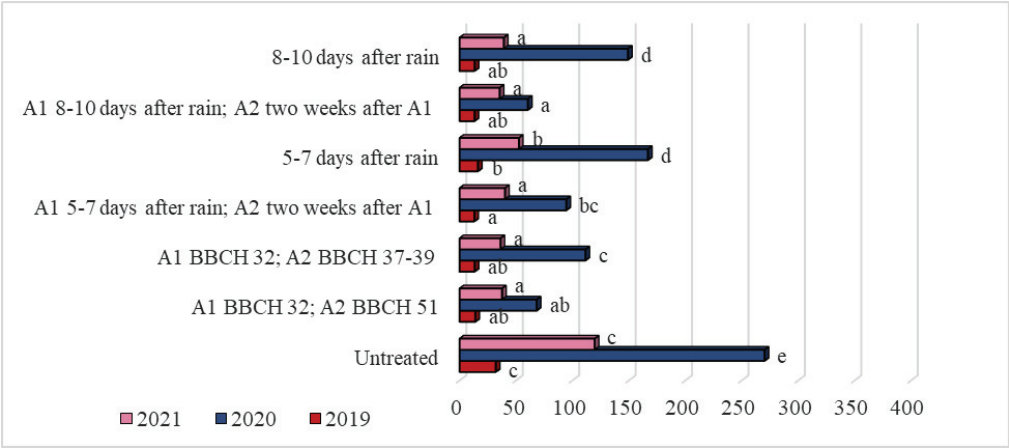


Figure 2. Effect of fungicide application programmes on the severity of STB in winter wheat monoculture 2019-2021; application: A1 – first, A2 – second, the differences between the values with the same letter were not significant at $P \leq 0.05$ according to Duncan’s multiple range test

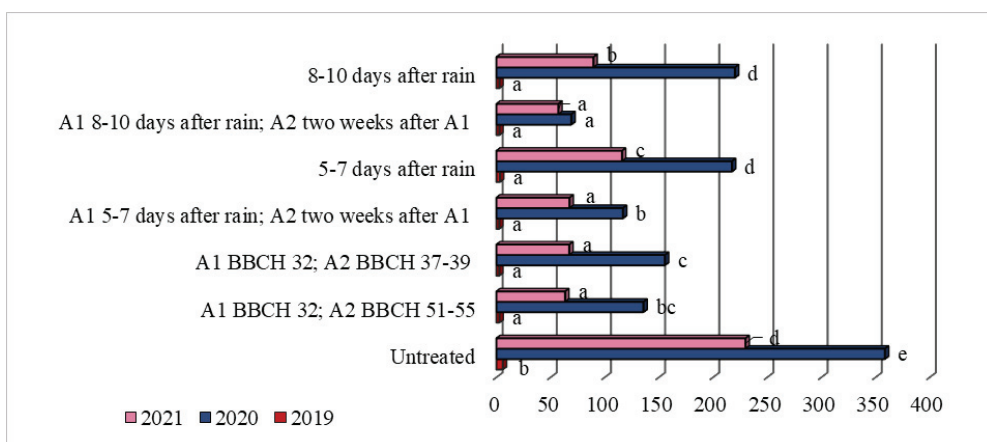


Figure 3. Effect of fungicide application programmes on the severity of STB in winter wheat grown after non-host crops, 2019–2021; application: A1 – first, A2 – second, the differences between the values with the same letter were not significant at $P \leq 0.05$ according to Duncan's multiple range test

In winter wheat, yield and TGW were mainly increased by fungicide spray programmes with two applications according to meteorological conditions, which reflects the disease severity control in the field. Pearson's correlation test showed that disease severity had a greater effect on TGW than on grain yield. A strong significant correlation between AUDPC values and TGW was found in the winter wheat monoculture in 2019 and 2021 and in the winter wheat, grown after non-host crops in 2020 and 2021. In contrast, a strong significant correlation between the AUDPC and grain yield was found only in 2020 in winter wheat grown after non-host crops.

The pathogenicity test evaluated several parameters indicating the aggressiveness of the *Z. tritici* population, such as incubation and latent periods, infection intensity and sporulation. Taken together, all the evaluations showed that the aggressiveness of *Z. tritici* isolates varied. As the isolates were collected from different regions, it can be assumed that the aggressiveness of *Z. tritici* may vary from region to region, which would be in agreement with the findings of other researchers (Ünal et al., 2017; Vagndorf et al., 2018). In 2019, the isolate from Pasvalys district (Pasvalys district II, north Lithuania) was characterised by a relatively long latent period, low disease intensity and sporulation. Meanwhile, in 2020, the isolate from the Trakai district (south-eastern Lithuania) could be considered the least aggressive of all isolates. This isolate on both varieties had a long latent period (24 dpi), a low disease intensity and the lowest number of pycnidia. Crop rotation, variety, and fungicide application intensity affect the pathogenicity of *Z. tritici* (McDonald and Mundt, 2016; Vagndorf et al. 2018). As it is not known which agronomic measures were used at the sampling sites, it is likely that it is the different cultivation

conditions that caused the different results from year to year. A correlation analysis showed that sporulation is influenced by the length of both the incubation and the latent period. Correlations between sporulation and incubation or latent periods showed a negative relationship between these parameters (i.e., the longer the incubation and latent periods, the lower the sporulation).

The *in vitro* fungicide resistance test in *Z. tritici* and the evaluation of the average effective concentrations that inhibited the growth of *Z. tritici* by 50 % in 2019-2021 showed that the Lithuanian population of *Z. tritici* has increased resistance to the QoI group fungicides pyraclostrobin and azoxystrobin and the DMI group fungicide prothioconazole (Table 3). No increase in resistance has been detected for the SDHI group fungicides (fluxapyroxad, bixafen and benzovindiflupyr) and the new active substances mefentrifluconazole (DMI group) and fenpicoxamid (Qil group). In contrast, a slight but consistent increase in the distribution of EC50 values among the isolates was observed. Over the three years of the study, the smallest change in the distribution of EC50 values was observed with the fungicide prothioconazole.

Table 3. Comparison of mean effective fungicide concentrations that inhibited *Zymoseptoria tritici* growth by 50 % (EC50 mg l⁻¹)

Active substance	2019	2020	2021
Benzovindiflupyr	0.194 (0.019-0.444)	0.598 (0.153-1.597)	0.352 (0.014-1.961)
Fluxapyroxad	0.260 (0.072-0.579)	0.564 (0.232-1.568)	0.277 (0.12-0.780)
Bixafen	0.379 (0.081-1.594)	0.681 (0.171-2.602)	0.541 (0.059-2.862)
Azoxystrobin	6.292 (0.136-20.250)	4.864 (0.616-22.540)	9.787 (0.009-29.140)
Pyraclostrobin	2.816 (0.038-11.980)	10.990 (0.250-21.280)	11.754 (0.066-31.970)
Prothioconazole	7.269 (0.636-39.520)	5.961 (1.404-18.570)	5.342 (1.341-12.160)
Mefentrifluconazole	-	-	0.280 (0.010-1.700)
Fenpicoxamide	-	-	0.240 (0.060-0.950)

Note. In the brackets the range of the values are shown.

Molecular studies of mutations underlying the development of fungicide resistance in *Z. tritici* have shown that by 2021, more than ¾ of the isolates had the G143A mutation, which can confer complete resistance to QoI fungicides (Table 4). In contrast, mutations C-T79N and C-N86S were not detected in any of the isolates, which explains the low EC50 values for SDHI group fungicides in *in vitro* studies.

Table 4. Frequency of mutations conferring resistance to QoI and SDHI fungicides in Lithuanian *Z. tritici* population 2019 and 2021

<i>Mutation</i>	<i>Wild type</i>	<i>With mutation</i>	<i>Frequency (%)</i>
2019			
G143A	46	67	59.3
N86S	113	0	0
T79N	113	0	0
2021			
G143A	10	32	76.2
N86S	42	0	0
T79N	42	0	0

Several mechanisms may underlie the resistance of *Z. tritici* to fungicides of the DMI group. The first of these are mutations. The assessment of the number of mutations in the isolates showed that each isolate had at least three mutations at the target site (Figure 4). As many as 41 % of the isolates carried the S524T mutation, which is associated with the development of resistance to many fungicides in this group.

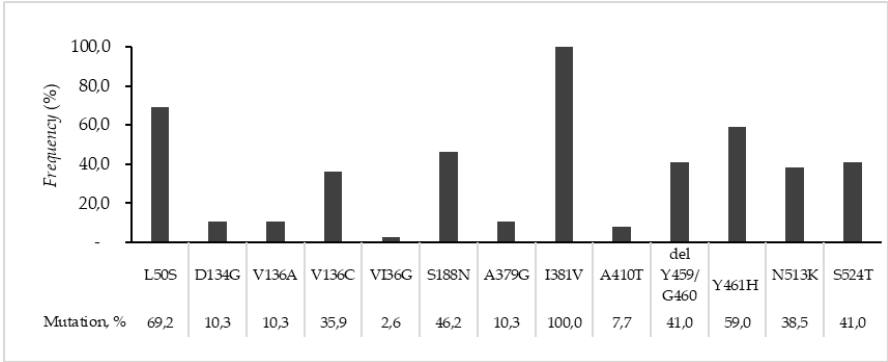


Figure 4. Frequency (%) of the mutations conferring resistance to DMI fungicides in *Z. tritici* isolates from Lithuania in 2021

The second mechanism is the overexpression of the CYP51 gene due to insertions in the MgCYP51 region of the gene promoter (Figure 5). Only two isolates were found to have no insertion. Although the vast majority of isolates (59.5%) had insertions of 866 bp, an insertion of 120 bp is most commonly associated with the development of resistance (Cools et al., 2012). In our study, slightly more than one-third of the isolates had this size insert.

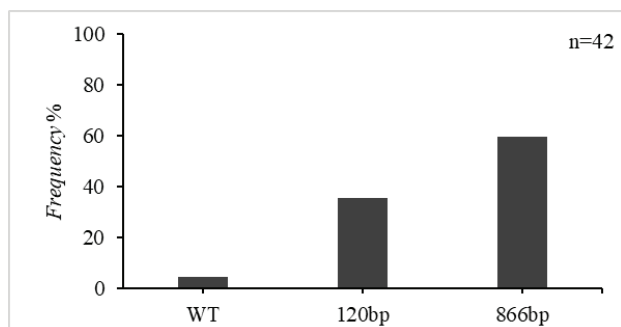


Figure 5. Frequency of inserts in the promoter region of the CYP51 gene (%) in *Z. tritici* isolates from Lithuania in 2021

A third mechanism is the overexpression of the MgMFS1 gene, also known as cross-resistance, caused by insertions in the MgMFS1 gene. Cross-resistance was not detected in *Z. tritici* isolates.

Although pathogen resistance to fungicides can be observed in the laboratory, it is necessary to perform field trials to assess the efficacy of a fungicide in the field before conclusions can be drawn about the resistance of a population in a given region (Brent and Hollomon, 2007). For this reason, the field efficacy of fungicides with different modes of action was determined by evaluating the AUDPC values of STB in 2020-2022 (Figure 6).

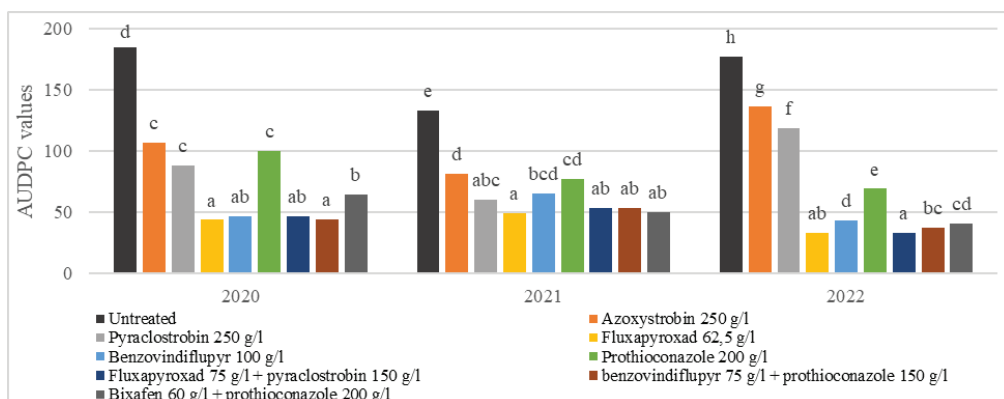


Figure 6. Effect of different fungicides on STB severity in 2020–2022; no significant differences between data marked with the same letter between one column ($P \leq 0.05$; Duncan test)

In three years of field experiments, the SDHI fungicides had the highest statistically reliable efficacy in controlling SBT and the highest increase in winter wheat yield. Azoxystrobin and pyraclostrobin had the lowest efficacy and yield impact (Table 5).

Table 5. Effect of different fungicides ($t\ ha^{-1}$) on the yield of winter wheat in 2020–2022

Treatment	Yield, $t\ ha^{-1}$		
	2020	2021	2022
Untreated	8,89 a	6,93 a	8,08 a
Azoxystrobin 250 $g\ l^{-1}$	8,90 abc	7,45 bcd	8,32 a
Pyraclostrobin 250 $g\ l^{-1}$	9,05 abc	7,08 ab	8,16 a
Fluxapyroxad 62,5 $g\ l^{-1}$	9,34 c	7,92 ef	8,89 bc
Benzovindiflupyr 100 $g\ l^{-1}$	9,17 abc	7,31 bc	9,05 cde
Prothioconazole 250 $g\ l^{-1}$	9,15 abc	7,74 def	8,69 b
Fluxapyroxad 75 $g\ l^{-1}$ + pyraclostrobin 150 $g\ l^{-1}$	9,31 abc	7,62 cdef	9,23 de
Benzovindiflupyr 75 $g\ l^{-1}$ + prothioconazole 150 $g\ l^{-1}$	9,24 abc	7,99 f	9,26 e
Bixafen 60 $g\ l^{-1}$ + prothioconazole 200 $g\ l^{-1}$	9,19 abc	7,72 def	9,10 cde

Note. no significant difference between data marked with the same letter between one column ($P \leq 0.05$; Duncan test)

The current status of fungicide resistance of *Z. tritici* in Lithuania is in line with trends observed in other European countries (Mäe et al., 2020; Jørgensen et al., 2022; Vestergård et al., 2023). While the field efficacy of QoI fungicides has been severely reduced by the appearance and spread of the G143A target site mutation, the field efficacy of DMI fungicides is gradually changing. This is attributed to the complexity of CYP51 mutation combinations and the more pronounced cross-resistance pattern. Taken together, the results of all the studies indicate that both *in vitro* fungicide resistance and mutation identification in the pathogen genome, as well as in field studies, show an increased resistance of the Lithuanian *Z. tritici* population to fungicides of the strobilurin group, as well as to fungicides of the triazoles group. In order to prolong the longevity of both old and new active substances, it is necessary to integrate the measures to combat the development of resistance included in the IPM (Integrated Pest Management) recommendations.

CONCLUSIONS

1. The evaluation of three years of data showed periods of higher ascospore abundance; autumn in October and May during the period of intense plant development. Thus, airborne sexual ascospores of *Z. tritici* in Lithuania act not only as a primary inoculum in autumn, but also as a potential secondary inoculum in the spring when plant vegetation resumes.
2. Pearson correlation analysis showed a strong relationship between the intensity of the disease on the leaves and the DNA content of *Zymoseptoria tritici* in wheat leaves, in both crop rotations.
3. During the experiment, different weather conditions led to differences in the intensity of leaf STB on winter wheat in different rotations. Higher disease severity was more frequently observed in winter wheat grown after non-host crops.
4. The study showed that STB control was more effective when the timing of the fungicide application was based on weather conditions (i.e., the number of days after rainfall) and the fungicide was applied twice.
5. *Z. tritici* pathogenicity tests showed that isolates from different districts differed in their aggressiveness. Correlations between sporulation and incubation or latent periods showed a negative correlation between these parameters (that is, the longer the incubation and latent periods, the lower the sporulation).
6. Resistance levels of *Zymoseptoria tritici* isolates collected in Lithuania to various fungicides and the number of mutations in the isolates were evaluated, and an increase in resistance to fungicides of the strobilurin and triazole groups was observed in the Lithuanian *Z. tritici* population.
7. Three years of field experiments have shown that fluxapyroxad, a fungicide of the carboxamide group, is the most effective in controlling the spread of STB infection and in increasing yield.

LIST OF PUBLICATIONS

Articles in peer-reviewed journals indexed in the „Clarivate Analytics Web of Science“

1. **Verikaitė K.**, Ramanauskienė J., Armonienė R., Ronis A. 2022. Evaluation of fungicide application programmes for *Septoria tritici* blotch control in winter wheat. *Zemdirbyste-Agriculture* 109, Nr. 2. 149-156. IF – 1,281
2. **Lavrukaitė K.**, Heick T. M., Ramanauskienė J., Armonienė R., Ronis A. 2023. Fungicide Sensitivity Levels in the Lithuanian *Zymoseptoria tritici* Population in 2021. *Front. Plant Sci.* 13:1075038. IF- 6,627

Abstracts in conference proceedings

1. **Verikaitė K.** 2019. Effects of fungicide application programs on *Septoria tritici* blotch severity and grain yield of winter wheat. Tarptautinės jaunųjų mokslininkų konferencijos „Young scientists for advance of agriculture“ santraukų leidinys.
2. **Verikaitė K.** 2020. *Zymoseptoria tritici* izoliatų patogeniškumas ir atsparumas fungicidams. Tarptautinėje jaunųjų mokslininkų konferencijoje „Jaunieji mokslininkai – Žemės ūkio pažangai“ – 2020 m. lapkričio 12 d., Vilnius.
3. **Verikaitė K.**, J. Ramanauskienė. 2021. Determining the effective period of fungicides against *Zymoseptoria tritici*. 17th International Conference Of Young Scientists On Energy And Natural Sciences Issues (CYSENI). Nuotolinė sesija.
4. **Verikaitė K.** 2022. Evaluation of *Zymoseptoria tritici* population aggressiveness in Lithuania. 18th International Conference Of Young Scientists On Energy And Natural Sciences Issues (CYSENI). Nuotolinė sesija.

Popular press articles

1. Ramanauskienė J., **Verikaitė K.** 2020. Lapų septoriozė – žalingiausia liga javų pasėliuose. *Mano ūkis*, 5:32-34.
2. Ramanauskienė J., **Verikaitė K.** 2022. Žieminių kviečių ligų plitimo rizikos. *Mano ūkis*, 4: 28-31.
3. **Lavrukaitė K.** 2023. Lapų septoriozės sukėlėjo atsparumo fungicidams vystymasis. *Mano ūkis*, 5: 24-27.

CURRICULUM VITAE

Name, surname

Karolina Lavrukaitė (Verikaitė)

Date of birth

22 January 1992

Education

2018–2022 PhD studies in Agronomy, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry.

2015–2017 master's degree in Agronomy, Faculty of Agronomy, Aleksandras Stulginskis University (since 2019 Vytautas Magnus University Agriculture Academy).

2010–2014 bachelor's degree in Agronomy, Faculty of Agronomy, Aleksandras Stulginskis University.

Professional experience

Since 2019 Junior Researcher, Plant Pathology and Protection Department, Institute of Agriculture, LAMMC.

2015–2019 Senior Technician, Department of Plant Pathology and Protection, Institute of Agriculture, LAMMC.

Karolina LAVRUKAITĖ

**LAPŲ SEPTORIOZĖS SUKĖLĖJO *ZYMOSEPTORIA TRITICI* PLITIMAS,
PATOGENIŠKUMAS IR KONTROLĖ ŽIEMINIUOSE KVIEČIUOSE**

Mokslo daktaro disertacija

Redakcija autorės

Spausdino – Vytauto Didžiojo universitetas
K. Donelaičio g. 58, LT-44248 Kaunas
Užsakymo Nr. 23-095. Tiražas 15 egz. 2023 06 14
Nemokamai