

**RMK TEADUSPROJEKTI LÕPPARUANNE**  
(Eesti Maaülikooli osa)

**1. PROJEKTI NIMETUS:** Biotõrje efektiivsus ja antagonistlike seente kasutamine juurepessu tõrjes hariliku kuuse puistutes ning erinevate taimetüüpide nakatumine viljakates kasvukohatüüpides

<b>2. PROJEKTI KESTUS</b>	<b>Algus:</b> 01/2019	<b>Lõpp:</b> 12/2021
---------------------------	--------------------------	-------------------------

**3. PROJEKTI TAOTLEJA** (teadusasutus): **Eesti Maaülikool**

**Telefon:** 7313 795

**Address:** Kreutzwaldi 1, 51014 Tartu

**Registrikood:** 74001086

**Panga rekviisidid:** 10102000308001 SEB Pank

**4. PROJEKTI JUHT:**

Tiia Drenkhan

Teadur, PhD

**5. PROJEKTI PÕHITÄITJAD**

**Projekti põhitäitjad:**

Ees- ja perekonnanimi	Teaduskraad	Ametikoht
1. Rein Drenkhan	PhD	Professor, EMÜ
2. Kalev Adamson	PhD	Teadur, EMÜ
3. Tiit Maaten	MsC	Peaspetsialist, EMÜ
4. Kadri Põldmaa	PhD	Vanemteadur, TÜ
5. Leho Tedersoo	PhD	Professor, TÜ

**Projektiga seotud abitööjõud:**

1. Merit Fjodorov	MsC	Doktorant, EMÜ
2. Katrin Jürimaa	MsC	Laborant, EMÜ
3. Viljar Veeväli	MsC	Magister, EMÜ
4. Mirjam Veeroja	BsC	Üliõpilane, EMÜ
5. Kätlin Piiskop	MsC	Magister, EMÜ
6. Vahur Siimon	BsC	Spetsialist, EMÜ
7. Kati Kungas	MsC	Doktorant, TÜ
8. Ahto Agan	MsC	Doktorant, TÜ, EMÜ
9. Elisabeth Rähn	MsC	Doktorant, EMÜ
10. Marili Laas	MsC	Doktorant, EMÜ

**6. PROJEKTI KULUD KOKKU 144 824,5 eurot**

Kulurida	Kokku
Töötasud (põhitäitjad + abitööjõud)	<b>74000</b>
Sotsiaalmaks	<b>24420</b>
Töötuskindlustusmaks	<b>592</b>
Ostetud teenused	<b>3607</b>

Lähetuskulud	2700
Materjalid, tarvikud, masinad, seadmed	19189,5
Muud kulud	7150
Üldkululõiv	13166
<b>Kokku</b>	<b>144824,5</b>

## 7. PROJEKTI TULEMUSED (maksimaalselt 10 lehekülge)

Käesolev uurimustöö on Eesti Maaülikooli ja Tartu Ülikooli lepinguline koostööprojekt. Mõlemad ülikoolid esitavad lõpparuande ja finantsaruande eraldi, mille lahutamatuks osaks on lõpparuande pikem versioon (Aruanne\_2019\_2021\_LISAD\_Drenkhan jt.). Koostööprojekti täitjad ja aruande koostajad: Tiia Drenkhan, Kadri Põldmaa, Rein Drenkhan, Tiit Maaten, Kalev Adamson, Leho Tedersoo, Merit Fjodorov, Kati Küngas, Vahur Siimon, Viljar Veeväli, Mirjam Veeroja, Katrin Jürimaa, Kätlin Piiskop, Ahto Agan, Elisabeth Rähn, Marili Laas. Projekti iga eesmärgi täitnud autorid on nimetatud tulemuste peatükis, vt. LISAD.

Töö eesmärgid:

1. Välja selgitada juurepessu tõrjel kasutatava biopreparaadi Rotstop efektiivsus ning selle sessoonsed (kevad-suvi ja sügis-talv) erinevused
2. Võrrelda seeneelustikku preparaadiga Rotstop töödeldud ja töötlemata kändudes
3. Testida hariliku kuuse puidust ja juurepessu viljakadelt puhaskultuuri eraldatud seenetüvede antagonistlikke omadusi ja pakkuda nende hulgast välja kandidaate edaspidisteks katseteks juurepessu biotõrjel
4. Analüüsida hariliku kuuse, hariliku männi ja arukase erinevat tüüpi istikute nakatumist juuremädaniku tekitajatega viljakates kasvukohatüüpides

### Välitööd

**Proovide kogumine Rotstop preparaadiga käsitsi pritsitud, harvesteriraie, seeneelustiku mitmekesisuse aladelt ja erinevate taimetüüpide katsealade kändudelt**

**Rotstop preparaadiga käsitsi pritsitud aladelt** koguti proovid harvendusraiete järgselt kuuse enamusega puistutes hariliku kuuse kändudelt, et kontrollida hiidkooriku (*Phlebiopsis gigantea* Jülich.) ning juurepessu (*Heterobasidion* spp.) esinemist. Proovid koguti raie järgselt keskmiselt 1-60 päeva jooksul. Kokku koguti proove 38-lt alalt (vt. LISAD lisa 1) ning ühe ala kohta kokku 40 kännult kahel järjestikusel aastal ehk 12-kuulise intervalliga. Esmalt hinnati ja tähistati kännud ning võeti proovid enne preparaadiga Rotstop töötlemist, seejärel koguti proovid samadest kändudest 12 kuud peale preparaadiga töötlemist. Igale harvendusraie langile rajati paralleelsed katsetransekid: 20 Rotstopiga töödeldud kändu ja 20 töötlemata (kontroll) kändu. Iga proovikänd tähistati metallist lipikuga ning bambusest vaiaga. Töötlemist teostati järgmistel aegadel: kevad-suvi perioodil toimus kändude töötlemine aprillist kuni septembrini (kaasaarvatud) ning sügis-talv perioodil oktoobrist kuni märtsini (kaasaarvatud). Tulemusi analüüsiti eraldi ka kevad, sügis ja talve perioodide kaupa lähtudes konkreetse aasta õhutemperatuuridest.

**Harvesteriraie alade proovid** koguti harvendusraie lankidelt (>1,0 ha) hariliku kuuse kändudelt (vt. LISAD lisa 2). Kokku analüüsiti 400 puiduproovi 20 erinevalt alalt (iga ala kohta 20 proovi), millest 10 alal 200 kändu oli töödeldud biopreparaadiga Rotstop ja 10 alal 200 kändu jäid töötlemata (kontroll). Kännud pritsiti Rotstop preparaadiga harvesteriraie teostamise ajal, raied toimusid 2017. aasta oktoobris ja novembris, proovid koguti üks aasta pärast kändude töötlemist (2018. aasta oktoobris ja novembris). Harvesteriraie järel on proovid kogutud ühes korduses pärast preparaadiga Rotstop töötlemist ehk kändude eelseisu enne raie ei ole tuvastatud ega kände tähistatud.

**Proovid seeneelustiku mitmekesisuse analüüsimiseks Rotstop preparaadiga töödeldud ja töötlemata kändudest** koguti harvendusraie aladelt (vt. LISAD lisa 2) ning samadest kändudest nagu harvesteriraie alade proovid (200 proovi Rotstop preparaadiga töödeldud, 200 proovi töötlemata, kokku 400 puiduproovi, vt. eelmist lõiku). Igast kännust kogutud saepurust kaaluti laboris 0,1 g x2 HTS (*high*

throughput sequencing) sekveneerimiseks.

**Erinevat tüüpi istikute nakatumise uurimiseks juuremädaniku tekitajatega viljakates kasvukohatüüpides** uurimiseks rajati 2019. aasta kevadel neli katseala (JK ja SL KKT), mille eesmärgiks on uurida Eesti peamiste puuliikide (harilik mänd, harilik kuusk ja arukask) paljasjuursete ja suletud juurekavaga (poti-) taimede nakatumist juuremädanikesse. Katsealade asukohad: Külitse ala Tartumaa metskonnas (TT092\_9); Paunküla ala Ida-Harjumaa metskonnas (PY109\_17), Roosna-Alliku ala Järvamaa metskonnas (PD076\_17), Järvelja Öppe- ja Katsemetskonna ala (JS284\_15). Kõik kändud katsealadel märgistati numbritega ning määrati visuaalselt kändul esinev mädanik (perifeerne, tsentraalne või mõlemad) kõikidel kändudel olenemata puuliigist. Kändud ja katsetaimed kaardistati täppis GPS-i abil ning info kanti Mapinfo kaardile, et visualiseerida kändude asend katsetaimede suhtes ning lihtsustada hilisemat taimede kogumist juurte analüüsimiseks, kui on teada nakatunud kändude asukohad katsealadel ning nende asend katsetaimede suhtes (vt. LISAD lisa 4 ja 5). Juurepessu ja külmaseene osakaalu määramiseks kändudest koguti puiduproovid 2019. aasta novembris ja 2020. aasta jaanuaris ja märtsis.

**Kõikidelt eelnevatelt aladelt** koguti puiduproovid sarnase metoodika alusel: eemaldati kändu pinnalt ca 5 mm paksune puidukiht, et likvideerida kändupinnale langenud saaste. Seejärel puuriti 5 mm steriilse puuriga kuni 50 mm sügavusele ning puurimiselt saadud saepuru raputati otse puurilt steriilsesse proovikotti, et vältida kändupinnalt kaasa tulevat juhuslikku saastet. Igalt kändult koguti saepuru koondproov neljast erinevast puuraugust, võttes kaks proovi küpspuidust ja kaks maltspuidust. Mädanikuta kändudel koguti kaks maltspuiduproovi kändu vastas külgedelt ning proov kändu tsentrist ja küps- ja maltspuidu piirilt. Mädanikuga kändudel koguti kaks maltspuiduproovi kändu vastas külgedelt ning proov tsentrist ja mädaniku ning terve puidu piirilt. Kui känd oli seest õõnes, siis asendati tsentriproov mädaniku ja terve puidu piirilt kogutud prooviga. Peale igat proovivõttu steriliseeriti tööriistad piiritusega ning kuumutati gaasilambi leegis, et vältida ristsaastet erinevate proovide vahel. Laboris kaaluti igast kändust kogutud proovist DNA eraldamiseks 0,1g x2 tuubi saepuru ja pandi 2,0 ml Eppendorf (MCT) tuubidesse, proove säilitati -20 °C juures kuni edasiste analüüsideni.

**Juurepessu biotörjel analüüsitavaite võimalike uute seenetüvede** isoleerimiseks koguti proovid kaheksalt harvendusraie- ja kolmelt lageraie alade hariliku kuuse kändudest (so. samad harvendusraie alad ja kändud millelt koguti proovid harvesteriraie ja seeneelustiku mitmekesisuse analüüsimiseks, vt. LISAD lisa 2). Puiduproovid (1,0x1,0cm puidutükk) koguti kändudest, mis olid Rotstop preparaadiga töötlemata (so kontroll kändudest), et oleks võimalik isoleerida looduslikult esinevaid juurepessu antagoniste. Aladelt CO059, CO067, HU023, HU037, KP299, PD063 ja VS118 koguti ja isoleeriti puhaskultuuri iga ala kohta 20 puiduproovi, KJ091 121 proovi, RA079 101 proovi, PD076 214 proovi ja TT092 271 proovi (vt. LISAD lisa 2). Kokku isoleeriti puhaskultuuri 847 puiduproovi. TT092-9, RA079-8 ja PD076-17 on lageraie alad, ülejäänud harvendusraie alad.

Puidutükk koguti kas kändu pinnalt või kändu küljelt vähemalt 0,5cm sügavuselt, et vältida pindmist saastet. Selleks eemaldati esmalt pealmine puidukiht (steriilse peitliga ja/või kirvega) proovivõtu kohalt. Igalt kändult koguti kaks puidutükki. Ühe ala piires, iga kändu järel tööriistad steriliseeriti 96% piirituses ja gaasilambi leegis. Puidutükid paigutati steriilsesse kilekotti ja nummerdati metsatüki ja kändu infoga. Laboris teostati isoleerimine mädaniku piirilt või tervest puidust. Puhaskultuuri isoleerimiseks vajalikud puiduproovid säilitati +4°C juures ja isoleeriti võimalikult kiiresti peale proovide kogumist.

Edaspidiseks katsetööks valiti molekulaarselt määratud liikide hulgast eelkõige perekond *Phlebiopsis* ja *Peniophora* liigid ning lisaks teised potentsiaalsed antagonistlikud liigid (nt. *Cylindrobasidium evolvens*, *Sistotrema brinkmannii*, *Bjerkandera adusta*). Kokku testiti 42 erinevat potentsiaalset seenetüve ning võrdluseks testiti Rotstop preparaadi alusorganismi hiidkooriku tüve. Teostati kasvukiiruse analüüsid monokultuurides ning jälgiti seente kasvu koos juurepessuga dualkultuurides.

**Juurepessu parasiitide analüüsimisel** koguti juurepessu viljakehi Eesti erinevatest piirkondadest kuuselt, männilt ja kadakalt. Osadel neist tuvastati kasvamas teiste seente mütseel, viljakehad asetati nädalaks niiskuskambrisse, kus enamikel arenesisid välja erinevate seente kolooniad. Ühtekokku vastandati ühe või kahe juurepessu tüvega 50 seenetüve, millest enamik kuulus helekottseenelaadsete seltsi (*Hypocreales*) ning mõningad seltsidesse *Eurotiales*, *Mortierellales*, *Mucorales* jt.

**Erinevat tüüpi istikute nakatumise uurimiseks juuremädaniku tekitajatega viljakates kasvukohatüüpides** istutatud taimede juuri analüüsiti kaks aastat hiljem (kevadel 2021). Selleks koguti iga katseala (N=4) samalt taimetüübilt (N=6) kokku vähemalt N=5 proovi. Kokku ühe ala kohta analüüsiti

vähemalt 30 taime, nelja ala peale kokku N=127 pindsteriliseeritud taime. Taimed juurte analüüsimiseks koguti vastavalt Mapinfo kaartidele kantud nakatunud kändudele ja taimetüübile. Taimed kaevati, puhastati mullast ning transporditi laborisse ning hoiustati kuni edasise töötlemiseni -10°C juures. Seejärel mõõdeti taime kõrgused, puhastati juured mullast, pesti juured voolava kraanivee all ja lõigati juhuslikult kahest vastassuunast igalt taimelt peen- ja jämejuured. Juureproovid desinfitseeriti laminaarkapis vastavalt protokollile (vt. LISAD juureproovide pindsteriliseerimise protokoll) ning tükeldati juured eraldi Eppendorf (MCT) tuubidesse. Enne tuubi panekut juured kaaluti, iga taime kohta 0,1g x2, st peenjuured ja jämejuured eraldi. Analüüsiti eraldi pindsteriliseeritud (N=127) ja pindsteriliseerimata (N=27) juuri.

## **Molekulaarsed analüüsid**

DNA eraldamiseks kasutati Thermo Scientific GeneJet Genomic DNA Purification kit (Thermo Fisher Scientific, Leedu) vastavalt tootja protokollile, va seeneelustiku mitmekesisuse analüüsid milles kasutati QIAGEN DNeasy PowerSoil HTP 96 kiti (QIAGEN GmbH, Hilden, Saksamaa).

**Rotstop preparaadiga käsitsi ja harvesteriraiel pritsitud** proovid analüüsiti qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*) meetodil kasutades juurepessu perekonnapõhiseid ja hiidkooriku liigispetsiifilisi praimereid. Juurepessu tuvastamise praimer: qHET-F (5'-TTTCTTGTAAGCGCGT-3') ja qHET-R (5'-AAGGTCTCGCTAATGCA-3'). Hiidkooriku tuvastamise praimer Phegi-F (5'-TGCTTTCATCCACTCTTCAAC-3'), Phegi-R (5'-GCCAAGAGATCCGTTGCT-3') ja Phegi-P (5'-FAM-CTATGCGACCCTTACCAGCCTAC – BHQ – 1 - 3'). Nimetatud juurepessu ja hiidkooriku praimerid disainiti käesoleva uurimistöo tarbeks.

**Seeneelustiku mitmekesisuse analüüsimiseks** kasutati praimerite paari gITS7ngs, ITS3mix ja ITS4ngsUni/ITS4ngs. PCRi produktid puhastati kitiga FavorPrep PCR Purification MiniKit (Biotech Corp., Macomb, MI, USA). Kokku segatud valmis raamatukogud sekveneeriti Eesti Biokeskuses (Tartu) Illumina HiSeq 2x250 platvormil. OTU (*Operational Taxonomic Unit*) tabelites kontrolliti e-väärtused vahemikus e-20 – e-50 käsitsi kasutades GenBank andmebaasi ning vajadusel korrigeeriti OTUde taksonoomilist kuuluvust perekonna, sugukonna, seltsi ja klassi tasemel vastavalt 90, 85, 80 ja 75% sarnasuse alusel. Ebakvaliteetsed ja seente riigi välised OTUd eemaldati enne statistilisi analüüse, mis tehti kasutades vabavarilist tarkvara R.

**Juurepessu biotörjel analüüsitavate võimalike uute seenetüvede** puhaskultuuri isoleerimise järel puidutükidelt välja kasvanud seeneliigid määrati molekulaarselt, kasutades seente universaal praimereid ITS1F ja ITS4. Reaktsiooni aluseks oli Solis BioDyne 5x HOT FIREPol Master Mix with 7,5mM MgCl<sub>2</sub>. Seeneliigi tuvastamiseks sekveneeriti ITS regioon. Sekveneerimiseks kasutati ITS5 praimerit ning sekveneerimine viidi läbi Eesti Biokeskuses (Tartu).

**Erinevat tüüpi istikute ja kändude nakatumine juuremädaniku tekitajatega viljakates kasvukohatüüpides** analüüsimisel kasutati järgmiseid praimereid: juurepessu perekonnapõhine praimer: Het-ITS-F/Het-ITS-R (5'-AGAATGGTATCAATGCTATAAAACG-3' ja 5'-AGGGTCTCGCTAATGCAT-3') juurepessu üldise fooni tuvastamiseks; külmaseene perekonnapõhine praimer ArmiR ja ArmiF; kuuse-juurepessu liigispetsiifiline praimer KJ-F/KJ-R (5'-CCATTAACGGAACCGACGTG-3' ja 5'-GTGCGGCTCATTCTACGCTATC-3'); (Hantula ja Vainio 2003); männi-juurepessu praimeried He.an-ITS-F/He.an-ITS-R (5'-GGGTTCTTTTGACCCCTT-3' ja 5'-CAATCGTGGCGTACCA-3') ning HetAn-F/HetAn-R (5'-TCGGTTCGGTTCTTTTGAC-3' ja 5'-CACAATCGTGGCGTACCA-3'). HetAnF/HetAnR praimerite paari kasutati ainult kändude analüüsis. Täiendavad detailid katsealade, proovide kogumise ja molekulaarsete analüüside kohta on leitavad käesoleva aruande LISAD failist.

## **Tulemused**

### **Rotstop preparaadiga käsitsi pritsitud alad**

#### **Hiidkooriku esinemine töödeldud- ja kontrollaladel**

Kändude töötlemise ajal oli keskmine õhutemperatuur kevadel +3,9°C ning hiidkooriku esinemine töödeldud aladel enne töötlemist 2,1% ning kontrollaladel 0,3%, mis näitab seene looduslikku esinemist. Sügisel pritsimise ajal oli keskmine õhutemperatuur +9,4°C ning hiidkooriku looduslik esinemine

töödeldud aladel 6,5% ning kontrollaladel 9,5%. Talvel oli pritsimise ajal keskmine õhutemperatuur +4,6°C ning hiidkooriku looduslik esinemine töödeldud aladel 9,5% ning kontrollaladel 8,2% .

Aasta hiljem tuvastati kevadisel ajal statistiliselt oluliselt enam ( $p < 0,05$ ) töödeldud aladelt hiidkoorikut: 26,4% ning kontrollaladel 15%. Sügisel pritsitud kändudest esines hiidkoorikut töödeldud aladel 18,2% ning kontrollaladel 11,4%, tulemused erinesid statistiliselt oluliselt ( $p < 0,05$ ). Talvel esines hiidkoorikut 15,5% töödeldud alade ning 6% kontrollalade kändudel ( $p < 0,05$ ). Seega, olenemata keskmisest õhutemperatuurist ja aastaajast tuvastati hiidkoorikut pritsitud kändudel oluliselt enam võrreldes kontroll kändudega.

Analüüsisime hiidkooriku esinemist ka perioodide kaupa: kevad-suvi ja sügis-talv. Looduslik hiidkooriku esinemine kontrollaladel kevad-suvisel perioodil oli 3,8% ning sügis-talvel 6%. Töödeldud alade kändudes oli enne töötlemist looduslik hiidkooriku esinemine kevad-suvel 4,4% ning sügis-talvel 6,2%.

Aasta hiljem tuvastati looduslik hiidkooriku esinemine kevad-suvel kontrollaladel 11,8% ning sügis-talvel 11,4%. Töödeldud aladel tuvastati hiidkoorikut kevad-suvel 20% ning sügis-talvel 22,1%. Töödeldud ja kontroll aladel esines hiidkoorikut statistiliselt oluliselt enam ( $p < 0,01$ ) võrreldes algseisuga. Samas, kontroll- ja töödeldud alade algseis ehk esimese aasta kändudes hiidkooriku looduslik esinemine (4-6%) statistiliselt oluliselt ei erinenud ( $p = 0,596$ ). Aasta hiljem kogutud proovidest tuvastati hiidkoorikut ca kaks korda enam (21%) võrreldes kontrollalade kändudega (11,4%,  $p < 0,01$ ).

### **Juurepessu esinemine töödeldud- ja kontrollaladel**

Enne kändude töötlemist ja keskmiste õhutemperatuuride põhjal: kevadel kogutud töödeldud alade proovides esines juurepessu 16,9% ning kontroll aladel 15,6%. Sügisel kogutud proovidest tuvastati juurepessu 6% ning kontrollaladelt 5,5%. Talvel kogutud proovidest tuvastati juurepessu 3,2% ning kontrollaladel 4,1%. Juurepessu esinemise algseis töödeldud ja kontrollkändudes ei erinenud oluliselt erinevatel perioodidel (kevad, sügis, talv,  $p > 0,05$ ) kogutud proovides.

Üks aasta peale töötlemist ja keskmiste õhutemperatuuride põhjal: kevadel kogutud proovidest tuvastati juurepessu töödeldud alade kändudel (46%) oluliselt enam ( $p < 0,05$ ) kui kontrollalade kändudel (31%). Sügisel kogutud proovidest tuvastati juurepessu töödeldud alade kändudel (16,8%) oluliselt vähem ( $p < 0,05$ ) võrreldes kontrollalade kändudega (20,5%). Talvel kogutud proovidest tuvastati töödeldud aladel juurepessu (9%) enam ( $p < 0,05$ ) võrreldes kontrollaladega (7,5%). Kevadel pritsitud aladel esines juurepessu võrreldes sügisel ja talvel töödeldud aladega 2-4 korda enam, seda selgitab ka aasta hiljem suurem juurepessu osakaal kändudes. Olemasolevate tulemuste põhjal selgus, et aasta peale pritsimist mõjutas hiidkoorik juurepessu arengut negatiivselt sügisel töödeldud kändudes. Kevadel ja talvel kogutud proovidest hiidkooriku mõju juurepessule ei tuvastatud.

Analüüsisime juurepessu esinemist samuti perioodide kaupa (kevad-suvi ja sügis-talv). Juurepessu esinemine kontrollaladel esimese aasta kevad-suvisel perioodil oli 7,1% ning üks aasta hiljem kogutud proovides oluliselt enam (25%,  $p < 0,01$ ). Sügis-talvisel perioodil kogutud proovidest tuvastati juurepessu 11,7%, aasta hiljem 18,5%. Algseis enne pritsimist näitab, et sügis-talvisel perioodil (12,6%) analüüsitud kändudel oli juurepessu statistiliselt oluliselt ( $p < 0,01$ ) enam võrreldes kevad-suvise perioodiga (6,3%). Seega, algseisud võrreldavatel perioodidel ei olnud sarnased.

Juurepessu esines töödeldud aladel enne töötlemist kevad-suvisel perioodil 6,3% ning üks aasta hiljem oluliselt enam (25,3%,  $p < 0,01$ ). Sügis-talvisel perioodil tuvastati juurepessu enne töötlemist 12,6% ning üks aasta hiljem 27,9% ( $p < 0,01$ )

Juurepessu esinemine kevad-suvisel perioodil ja kontroll ning pritsitud aladel aasta hiljem oli sama, mõlemal ca 25% ( $p = 0,8$ ), kuid sügis-talvisel perioodil oli kontrollaladel oluliselt vähem ( $p < 0,01$ ) juurepessu võrreldes pritsitud aladega. Viimane näitab seda, et üks aasta ei ole piisav ajavahemik biopreparaadi mõju hindamiseks. Samas, kevad-suvisel perioodil analüüsitud kändudel oli algselt peaaegu kaks korda vähem juurepessu kui sügis-talvisel perioodil analüüsitud kändudel, mis mõjutab biopreparaadi efektiivsust

## Harvesteriraie alad

Hiidkoorikut tuvastati üks aasta pärast raiet 11% kändudest, mis näitab seene looduslikku esinemist. Töödeldud aladel tuvastati hiidkoorikut aasta peale töötlemist 29,5% kändudest, ehk hiidkoorikut leidis töödeldud aladel statistiliselt oluliselt ( $p < 0,01$ ) enam kui kontrollaladel.

Töödeldud aladel suureneb hiidkooriku esinemine sõltuvalt raieaja õhutemperatuurist, mida soojem oli õhutemperatuur, seda rohkem esineb aladel hiidkoorikut. Kuid saadud tulemused näitasid, et töötlemata aladel raieaja õhutemperatuuri kasvades langes hiidkooriku looduslik esinemine puistus, sest kõrgematel temperatuuridel kännu pinnad kuivavad üsna kiirelt ning samuti võib hiidkooriku eoseid soojemal perioodil õhus olla vähem. Kuid, mõlema andmerea tulemused on statistiliselt olulised ( $p < 0,01$ ), kuid kontrollalade korrelatsioon on tagasihoidlik.

Juurepessu osakaal suurenes sõltuvalt raieaja temperatuurist töödeldud ning töötlemata kändudes ( $p < 0,01$ ). Kõige kõrgem on juurepessu esinemine (30%) alal, kus kännud on töötlemata ning keskmine õhutemperatuur raie ajal oli  $+3,5^{\circ}\text{C}$ . Kõige kõrgem õhutemperatuur raie ajal oli ca  $+12^{\circ}\text{C}$  ning antud alal leidis juurepessu 20% kändudel (töödeldud ala). Samal alal leidis hiidkoorikut üks aasta pärast töötlemist 55% kändudelt. Töötlemata aladel on juurepessu esinemise ja keskmise õhutemperatuuri vahel oluliselt tugevam seos ( $r=0,44$ ;  $p < 0,01$ ), kui töödeldud aladel ( $r=0,26$ ;  $p < 0,01$ ). Seega, kändude pritsimisel tuvastati pärssiv toime juurepessu levikule. Siiski, kontrollaladelt on proove soojemal ajal kogutud vähem võrreldes töödeldud aladega, mis võib mõjutada tulemusi. Sisulisemate järelduste tegemiseks tuleb koguda ja analüüsida kordusproovid samadelt aladelt ning võimalusel täiendavaid proove uutelt aladelt.

Võrreldes hiidkooriku esinemist käsitsi ning harvesteriga töödeldud aladel on näha, et harvesteriga töödeldud aladel on hiidkooriku esinemine suurem, kuna 10 alalt tuvastati hiidkoorikut keskmiselt 29,5% kändudest. Käsitsi töödeldud aladel tuvastati hiidkoorikut keskmiselt 20% kändudest. Erinevus võib olla tingitud asjaolust, et harvesteriga toimus töötlemine vahetult raie ajal, kuid käsitsi töötlemine 1-60 päeva peale raiet. Viivitus käsitsi töötlemisel raiealadel oli tingitud asjaolust, et kui info raie lõpetamisest jõudis meieni, siis reaalselt oli võimalik välitööd teostada mõne päevase viitega. Katsealadid, kus toimus kändude töötlemine 16-60 päeva pärast raiet, oli kokku 6 ning nende alade juurepessu ja hiidkooriku esinemise tulemused ei erinenud statistiliselt oluliselt ( $p < 0,05$ ) teistest. Seega on kõik 38 ala tulemused omavahel võrreldavad.

## Seente kooslused ja liigirikkus Rotstopiga töödeldud ja töötlemata kändudes

Harvendusraie aladelt kogutud proovidest määrati seened ribosomaalse DNA ITS2 regiooni alusel. Kõige sagedamini esindatud klassid olid *Agaricomycetes*, *Leotiomycetes*, *Microbotryomycetes* ja *Tremellomycetes*. Harvesteriraieal Rotstop preparaadiga töödeldud aladel domineerisid kandseened (78%) ja kottseened (22%), teiste hõimkondade osakaal jäi alla 3%. Kõikidel aladel domineerisid seente elustrateegia alusel eristatud rühmade seas saprotroofid (78%), seejärel taimepatogeeneid (10%), samas kui elustrateegia ei olnud tuvastatav 6% seentest. Selgus, et seente liigirikkus ei erine suurel määral töötlemata ja töödeldud alade vahel.

Rotstopiga pritsitud ja pritsimata aladel tuvastati 75% ühiseid perekondi, kuid pritsitud aladel oli mitmekesisus isegi suurem. ADONIS analüüsist selgus, et töötlus seletab ära ainult 2% ja ala 15% ( $p < 0,001$ ) ning nende kahe koosmõju selgitab 16% koosluste varieeruvusest ( $p < 0,001$ ). T-test näitas, et juurepessu osakaal seenekooslustes ei erine oluliselt töödeldud ja töötlemata alade proovide vahel. Juurepessu olemasolu tuvastati kõikidelt aladelt ning see puudus vaid ühes analüüsitud proovis, kuid 20 arvukama seene perekonna hulka juurepess ei kuulu.

Analüüsides tulemustest võib järeldada, et Rotstopiga töötlemine ei vähenda seente mitmekesisust, sest töödeldud aladel tuvastati 523 ja töötlemata aladel 485 erinevat seene perekonda, kuid töödeldud ja töötlemata alade kooslused siiski erinevad omavahel. Leiti, et perekond *Chalara* on domineeriv mõlemat tüüpi aladel, kuid *Resinicium* on peamiselt esindatud Rotstopiga töödeldud aladel, samas kui töötlemata aladel domineerib perekond *Amylostereum*.

## Juurepessu potentsiaalsete antagonistide katsed

Testiti 42 (so ca 5% isoleeritud tüvedest) potentsiaalse juurepessu kasvu pärssiva antagonistliku seenetüve toimet ning võrdluseks kasutati Rotstop preparaadi alusorganismi hiidkooriku tüve. Katsetes testitud antagonistlikud liigid kuuluvad kandseente (*Basidiomycota*) hõimkonda, *Agaricomycetes* klassi.

Potentsiaalsete antagonistide kasvu analüüsid selgus, et kõige kiiremini kasvasid monokultuuris *Phlebiopsis gigantea*, *Cylindrobasidiom evolvens*, *Bjerkandera adusta*, *Phlebia radiata*, *Phlebia* sp. erinevad tüved. *Peniophora incarnata* ja *Sistotrema brinkmannii* tüvede kasv oli aeglane ja jäi alla nii Rotstop alusorganismi kui ka *Heterobasidion* spp. tüvede kasvule. Kõige kiirema kasvuga oli *Bjerkandera adusta* tüvi 2 millele järgnes *P. gigantea* tüvi 1. Rotstop alusorganismi kasvust kiirema kasvuga olid *P. gigantea* tüved 1, 3, 17, *P. tremellosa* tüvi 2, *P. radiata*, *C. evolvens* tüved 1, 3, 4, *B. adusta* tüved 1, 2.

Potentsiaalsete antagonistide vastasmõju võrdlusel juurepessuga selgus, et kiireima kasvuga olid *P. gigantea* Eesti tüved 1 ja 4, mille kasv duaalkultuuris oli statistiliselt oluliselt kiirem nii kuuse- kui männi-juurepessu tüvede kasvust ( $p < 0.05$ ). Kuuse-juurepessu tüvede kasvust olid statistiliselt kiirema kasvuga *P. gigantea* Eesti tüved 3, 17, 18. *Peniophora incarnata* tüvedest ükski ei olnud juurepessude tüvede kasvukiirusest statistiliselt oluliselt erinev ( $p = 0,4$ ), kasv oli juurepessu tüvedega võrreldes sarnane. Teistest testitud seeneliikidest oli statistiliselt oluliselt kiirema kasvuga võrreldes juurepessuga ( $p = 0,03$ ) *Phlebia tremellosa* tüvi 2.

Juurepessu pärssiva toime hindamiseks võrreldi duaalkultuuris (so koos antagonistiga) kasvanud juurepessu liikide pindalad monokultuuris kasvanud juurepessu pindaladega. Efektivsemat pärssivat toimet omas *P. gigantea* Eesti tüvi 1, mis vähendas männi-juurepessu kasvu 7 korda ja kuuse-juurepessu kasvu 5 korda. Lisaks omasid antagonistlikku mõju veel *P. gigantea* Eesti tüved 2, 3, 4, 6, mis vähendasid juurepessu kasvu keskmiselt 3 korda. Teistest liikidest omas tugevat pärssivat mõju männi-juurepessu vastu *C. evolvens* tüvi 3, mis vähendas männi-juurepessu kasvu 4 korda ja kuuse-juurepessu kasvu 2 korda. Biopreparaat Rotstop pärssiv toime juurepessu suhtes võrreldes monokultuuris kasvanud tüvedega vähendas juurepessu liikide kasvu 2 korda.

Edasistes välikatsetes tuleb eelkõige testida head kasvu ja antagonistlikku mõju näidanud tüvesid: *P. gigantea* tüved 1, 2, 3, 4, 6, 17, 18, *P. tremellosa* tüvi 2, *C. evolvens* tüvi 3.

Üle Eesti erinevat tüüpi puistutest kogutud 25 männi- ja kuuse-juurepessu viljakehadest ligikaudu neljandik oli looduses nakatunud mõne teise seenega, enamasti juurepessudele spetsialiseerunud parasiidiga *Sphaerostilbella broomeana*. Ülejäänud viljakehadel arenes laboris niiskuskambris hoides nädalaga ühe kuni mitme seene koloonia, sh pea alati *S. broomeana* ja mõni perekonna *Trichoderma* esindaja. See näitab, et nimetatud seened on Eesti metsades vägagi levinud ja maailmas võrdlemisi harva ning vaid juurepessude viljakehadel tuvastatud parasiit võib kasvada varjatult viljakehadel ja võimalik, et ka koos juurepessu seeneniidistikuga nakatunud puidus.

Juurepessu viljakehadelt isoleeriti projekti käigus ühtekokku 52 seenetüve, millel järjendati DNA triipkood ja mis deponeeriti Tartu ülikooli seenekultuuride kollektiooni. Suur osa neist tüvedest kaasati vastandamiskatsetesse juurepessu tüvega TFC202256 (=157425=EPS10491=RA079-8), et uurida nende mõju juurepessu kasvukiirusele. Lisaks kaasati katsetesse 14 samas kollektioonis talletatud erinevate seente viljakehadelt eraldatud seenetüve. Kultuuritingimustes pärssisid juurepessu kasvu eelkõige mitmed helekottseenelaadsete seltsi esindajad. Neist tugevaimat mõju omasid perekonna *Trichoderma* tüved, mis aeglustasid juurepessu tüvede kasvu ning kasvasid kiirelt nendest üle, kattes täielikult juurepessu kolooniad. Pea kõik juurepessule spetsialiseerunud parasiidi *Sphaerostilbella broomeana* tüvedest aeglustasid juurepessu kolooniate kasvu, mis enamasti kolmandal päeval lakkas, jättes kahe vastandatud seene kolooniate vahele 0,5-5 cm eraldustsooni; ühe kuu möödudes oli enamik parasiidi erinevad tüvesid kasvanud üle kogu juurepessu koloonia. Juurepessu ja perekonna *Mariannaea* tüvede ühes tassis kasvatamisel tekkis nende kolooniate kokkupuutel tihe vastandumise tsoon, misjärel mõlemad seened kasvu lõpetasid. Tugevat pärssivat mõju juurepessu kasvule (seda iseäranis kuuse-juurepessu puhul) omasid ka erinevate seenerühmade viljakehadel parasiteerivate üleniidikute perekonna (*Hypomyces*) tüved. Perekondade pintselhallik (*Penicillium*) ja *Piptocephalis* tüvedel oli ilmne pärssiv mõju kuuse-juurepessu kolooniate kasvule. Samas ei ilmnenud ühegi katsesse kaasatud seenetüve vastandamisel juurepessu tüvega selle eoste moodustumise vähenemist.

## Istutatud taimed

Taimede ellujäämuse hindamiseks teostati 2019. aasta hilissügisel esimene inventuur kõikidel katsealadel, mille tulemustest selgus, et kõige parema ellujäämusega olid kuuse paljasjuursed taimed (99,4%) ja kõige tagasihoidlikuma ellujäämusega männi paljasjuursed taimed ja kuuse potitaimed (mõlemad 84,9%). Hukkunud taimed asendati 2020. aasta kevadel ja enne asendustöid viidi läbi uus inventuur. Selgus, et talve jooksul on hukkunud veel taimi, kevadise seisuga oli parim ellujäämus arukase potitaimedel (98,1%) ja kõige kehvem kuuse potitaimedel (69,4%). Kuuse potitaimedest oli omakorda kõige rohkem taimi hukkunud Kõlitsse katsealal - 113 tk, teistel aladel oli sama tüüpi taimi hukkunud kokku 85 tk. 2020. aasta kevadel asendati kõik hukkunud taimed. Siiski oli sama aasta sügiseks taaskord osa taimi hukkunud. 2020. aasta sügiseks (1,5 aastat peale istutamist) oli parim ellujäämus arukase potitaimedel (96,9%) ja kõige kehvem kuuse potitaimedel (79,0%). 2021. aasta sügise taimede inventuuri andmed on esitatud LISAD tabelis 3. Katsekultuuride metsakasvatustlikud aspektid on toodud järelduste peatükis.

## Kännud

Kokku analüüsiti 811 puidupuruproovi juuremädanike osakaalu määramiseks kändudest ning tuvastati 218 visuaalse mädanikuga kändu, millest okaspuu kände oli 182. Visuaalse mädanikuga okaspuu kände tuvastati kõige enam Paunküla katsealalt (77tk), kuid üllatavalt oli juurepessu ja külmaseene esinemine sellel alal kõige madalam. Tegemist sinilille kasvukohatüübiga, kuid eelmise metsapõlve koosseisus (58KS31KU11MA0LH) oli enamuses arukask ja hariliku kuuse osakaal madal, seega juuremädanike levik oluliselt pärsitud.

Analüüsitud proovides esines valdavalt kuuse-juurepess, männi-juurepessu ei tuvastatud katsealadelt mitte ühestki kännust. Kõlitsse katsealal oli nakatunud kuuse-juurepessu 12,2%, Roosna-Alliku alal 14,1%, Paunküla alal 1% ja Järveljas 6,9% kändudest. Ülejäänud võimalikud mädaniku tekitajad kändudel on teadmata, neid käesoleva uuringu raames ei analüüsitud. Proovid mis näitasid juurepessu perekonna esinemist (võib olla kuuse- või männi- juurepessu liik), kuid ei tuvastatud kuuse- ega männi-juurepessu olemasolu (N=7), siis need tulemused siin aruandes ei kajastu. Külmaseent tuvastati 15 kännus 226st, so 4 ala kohta vaid 6,6% analüüsitud kändudest. Juurepessu ega külmaseene tulemused kändudes ei näita patogeeni tegelikku levikut aladel, sest nagu nähtub juurte tulemustest, siis näiteks külmaseene osakaal on palju ulatuslikum (vt. järgnev peatükk). Kändude analüüs oli vajalik, et tuvastada juurepessu nakkusega kännud ning sellest lähtuvalt koguda ka taimejuured, so juurepessu nakatunud kändudest ca 2 m ulatuses.

## Juured

Juurepessu esinemine taimedel oli kõige ulatuslikum Järvelja katsealal, 25% kogutud taimede (kõik puuliigid kokku) juurtest olid nakatunud kuuse-juurepessu, külmaseent tuvastati võrreldes teiste aladega kõige vähem (6,3%). Külmaseene levik oli kõige ulatuslikum Kõlitsse alal (44,4% juurtest külmaseene nakkusega), kuuse-juurepessu tuvastati 9,5% juurteil. Paunküla ala taimede juurtest tuvastati külmaseent 40% ning kuuse-juurepessu 9,2% juurtest. Juurepessu esinemine taimedel oli kõige madalam Roosna-Alliku alal, kus tuvastati kuuse-juurepessu esinemist 4,8% juurtest. Külmaseene esinemine antud alal oli mõnevõrra suurem, 25,8%. Tulemused patogeeni leviku ja ala vahel olid statistiliselt olulised ( $p < 0,01$ ). Juurte tulemuste analüüsis ei tuvastatud männi-juurepessu esinemist ühelgi alalt ega juureproovist.

Arukase taimede juurtelt tuvastati külmaseent kõikide alade kohta keskmiselt 25,6% ning kuuse-juurepessu 12,2%. Hariliku kuuse juurtelt tuvastati külmaseent 31,7% ning kuuse-juurepessu 12,2%. Harilikul männil tuvastati külmaseent 30,5% ning kuuse-juurepessu 12,2% juurtelt. Tulemused kõikide puuliikide (arukask, kuusk, mänd) ja patogeeni (kuuse-juurepess ja külmaseent) leviku vahel olid statistiliselt olulised ( $p < 0,01$ ).

Eraldi analüüsiti peen- ja jämejuuri. Tulemused näitasid, et arukase peenjuurtel esines külmaseent 22,2% ning kuuse-juurepessu 4,4%, harilikul kuusel külmaseent 26,8% ning kuuse-juurepessu 7,3%, harilikul männil oli külmaseent 19,5% ning kuuse-juurepessu 7,3%. Tulemused puuliigi ja patogeeni esinemise vahel peenjuures olid statistiliselt olulised ( $p < 0,05$ ).

Analüüsides jämejuuri tuvastati arukasel külmaseent 28,9% ning kuuse-juurepessu 20%, harilikul



kuusel külmaseent 36,6% ning kuuse-juurepessu 17,1%, harilikul männil külmaseent 41,5% ning kuuse-juurepessu 17,1%. Tulemused puuliigi ja patogeeni esinemise vahel jämejuurtes olid statistiliselt olulised ( $p < 0,05$ ).

Analüüsi kokku  $N=27$  (11 arukase, 10 hariliku kuuse ja 6 hariliku männi) pindsteriliseerimata (juured pestud vaid jooksva kraanivee all) taimede peen- ja jämejuurt. Tulemustest selgus, et ühestki juureproovist ei tuvastatud kuuse-juurepessu esinemist, kuid külmaseene levik oli kõrge: peenjuurtes ( $N=26$ ) 31% ja jämejuurtes ( $N=21$ ) 67%. Enim tuvastati külmaseent pindsteriliseerimata arukase juurtel (73%), seejärel harilikul kuusel 50% ja harilikul männil 17% analüüsitud taimede juurtest. Arukase taimedel olid valdavalt nakatunud vaid jämejuured, kuid okaspuudel tuvastati külmaseent võrdselt samade taimede jäme- ja peenjuurtest. Jäme- ja peenjuurte analüüs võimaldab näha milline juuretüüp on juuremädanike nakkusele enam vastuvõtlik. Käesoleva uuringu tulemustest selgus, et jämejuured (pindsteriliseeritud ja pindsteriliseerimata) nakatuvad juuremädanikesse oluliselt enam kui peenjuured.

Pindsteriliseerimata juurte (kontroll)  $N=27$  analüüsimisel taimetüüpide kaupa tuvastati külmaseene esinemine 16 taimelt: kase paljasjuursetelt taimedelt ( $N=5$ ), kuuse potitaimedelt ( $N=4$ ), kase potitaimedelt ( $N=3$ ), männi- ja kuuse paljasjuursetelt taimedelt ( $N=2$ ). Vaid männi potitaimede juurtelt külmaseene nakkust ei tuvastatud. Kuuse-juurepessu esinemist ei tuvastatud pindsteriliseerimata taimedelt ühelgi alalt ega taimelt. Kui juured on pestud vaid jooksva kraanivee all (ehk pindsteriliseerimata), siis on võimalik tuvastada vaid juurte pinnal esinivad seeni.

Pindsteriliseeritud juurte  $N=127$  analüüsimisel taimetüüpide kaupa kõikide alade kohta kokku on külmaseenega nakatunud 38% ja kuuse-juurepessuga 21% taimede juurtest. Juurte pindsteriliseerimine on oluline, et analüüsida nakkuse esinemist juurtes sees.

Käesoleva analüüsi tulemustest selgub, et taimetüüpide kaupa on kuuse-juurepessu enam nakatunud kuuse- ja kase paljasjuurset taimed (mõlemad 4,7%) ja külmaseenega männi- ja kase potitaimed (mõlemad 7,1%). Kuuse-juurepessu nakkuse osakaal on madalaim männi paljasjuursetel taimedel (1,6%) ja külmaseene nakkus kase paljasjuursetel (4,7%) taimedel. Lisaks on näha, et kõikide puuliikide potitaimed on vastuvõtlikumad külmaseene nakkusele võrreldes paljasjuursete taimedega. Kuuse- ja kase paljasjuurset taimed on jällegi vastuvõtlikumad kuuse-juurepessu nakkusele võrreldes potitaimedega. 2021. aasta sügisese seisuga taimede hukkumise % järgi olid kõige kehvema ellujäämusega kuuse potitaimed (77,5%) ja männi paljasjuurset taimed (82,9%), kuid juurte analüüs ei näidanud, võrreldes teiste taimetüüpidega, nende taimetüüpide suuremat nakatumist juuremädanikesse. Kuigi, kuuse-juurepessu oli kuuse potitaim vähem nakatunud võrreldes kuuse paljasjuursete taimedega, vastupidine seis oli männil: männi paljasjuursete taim oli vähem nakatunud kui potitaim. Muud taimede hukkumise põhjused on toodud LISAD failis (alapeatükis tulemused-juured).

### Järeldused ja soovitused

Juurepessu tõrjel kasutatava biopreparaadi Rotstop efektiivsuse ning sessoonsete (kevad-suvi ja sügis-talv) erinevuste analüüsimisel selgus, et looduslikult esines hiidkoorikut pritsimata kontrollaladel kevad-suvisel perioodil kogutud proovides 8% ning sügis-talvisel perioodil 5,4% enam (so. mõlemal juhul 12 kuud pärast katsealade Rotstop preparaadiga töötlemist) kui enne proovide esmakordset kogumist, st võrreldes algseisuga;

Hiidkoorikut esines Rotstopiga töödeldud aladel kevad-suvisel perioodil 15,6% ning sügis-talvisel perioodil 15,9% enam (so. mõlemal juhul 12 kuud pärast katsealade Rotstop preparaadiga töötlemist) kui enne proovide esmakordset kogumist, st võrreldes algseisuga;

Kusjuures, kontroll- ja töödeldud alade algseis ehk esimese aasta kändudes hiidkooriku looduslik esinemine oli sarnane (4-6%), kuid hiidkoorikut esines teise aasta **kontrollalade** kändudes rohkem võrreldes algseisuga;

Hiidkoorikut tuvastati olenemata aastaajast **pritsitud** kändudelt oluliselt enam võrreldes kontroll kändudega (so. 12 kuud pärast katsealade Rotstop preparaadiga töötlemist), seetõttu on kändude pritsimine endiselt otstarbekas võimalus juurepessu tõrjeks;

Üldistatult, hiidkooriku esinemine kändudes ühe aasta möödudes on kesine: harvesterraie järel esines hiidkoorikut ca 30% ning käsitsi töödeldud aladel ca 20%. See tähendab, et üks aasta on liiga lühike periood, et anda lõplikku hinnangut preparaadi toimele. Järeldusi on otstarbekas teha minimaalselt kolm, aga eelistatult viis aastat peale kändude töötlemist;

Juurepessu esines pritsimata kontrollaladel kevad-suvisel perioodil kogutud proovides 17,9% ning sügis-talvisel perioodil 6,8% enam (so. mõlemal juhul 12 kuud pärast katsealade Rotstop preparaadiga

töötlemist) kui enne proovide esmakordset kogumist, st võrreldes algseisuga;  
Juurepessu esines Rotstopiga töödeldud aladel kevad-suvisel perioodil kogutud proovides 19% ning sügis-talvisel perioodil 15,3% enam (so. mõlemal juhul 12 kuud pärast katsealade Rotstop preparaadiga töötlemist) kui enne proovide esmakordset kogumist, st võrreldes algseisuga;  
Analüüsid juurepessu esinemist sessoride kaupa (kevad-suvi, sügis-talv), siis ühe aastase pritsimise järel Rotstopi pärssivat mõju juurepessule kuuse kändudes veel ei tuvastatud;

Rotstopi pärssiv mõju juurepessule oli nähtav analüüsid keskmiste õhutemperatuuride andmeid: sügiskuudel (september, oktoober) töödeldud kändudel esines juurepessu vähem töödeldud aladel (16,8%) võrreldes kontrollaladega (20,5%). Sügiskuudel oli keskmine õhutemperatuur kändude pritsimise ajal oluliselt kõrgem (+9,4°C) võrreldes kevadel (+3,9°C) ja talvel (+4,6°C) kändude töötlemise ajal olnud keskmiste õhutemperatuuridega;

Seega, kändude töötlemise efektiivsus Rotstop preparaadiga kasvab temperatuuri tõustes ehk mida soojem on kändude töötlemise ajal, seda efektiivsem tulemus. Kuna juurepessu eosed levivad õhus alates 0°C, siis on vajalik teostada Rotstop tõrjet ka madalamatel keskmistel temperatuuridel kui varasemalt soovitatud >+5°C. Varasemadki tulemused näitavad, et isegi miinuskraadidel tehtud raie ei päästa juurepessu nakkuse levikust;

Seetõttu soovitage Rotstopi kasutamisel edaspidi lähtuda konkreetse aasta õhutemperatuuridest ning kände pritsida ka siis kui ööpäevane keskmine õhutemperatuur on püsivalt keskmiselt vahemikus >+1°C kuni +4°C ja soojem;

Miinuskraadidega tehtud raiete kännud (eelkõige viljakates puhtkuusikutes!) on soovitatav pritsida kevadel kui keskmine õhutemperatuur on püsivalt vahemikus >+1°C kuni +4°C ja soojem, sest viivitusega teostatud töötlemine on parem abinõu juurepessu nakkuse vähendamiseks kui kännud üldse töötlemata jätta;

Võrreldes seeneelustikku preparaadiga Rotstop töödeldud ja töötlemata kändudes selgus, et seente liigirikkus kändudes ei erinenud oluliselt;

Rotstopiga pritsitud ja pritsimata aladel tuvastati 75% ulatuses ühiseid seeneperekondi, kuid pritsitud aladel oli seente mitmekesisus suurem;

Rotstop preparaadi kasutamine ei mõjutanud negatiivselt seente mitmekesisust töödeldud kändudes ega muutnud looduslikku seente kooslust oluliselt ning on seega sobilik preparaati kasutamiseks juurepessu tõrjel meie metsades, sest paremat alternatiivi praegu pole;

Hariliku kuuse puidust isoleeritud võimalike uute seenetüvede analüüsimisel juurepessu biotõrjel selgus, et potentsiaalsete antagonistide vastasmõju võrdluses olid kiireima kasvuga hiidkooriku (*P. gigantea*) Eesti tüved 1 ja 4, mille kasv duaalkultuuris oli kiirem nii kuuse- kui männi-juurepessu kasvukiirusest, mis kinnitab looduslike tüvede välikatsetes testimise vajadust;

Juurepessu viljakehadelt puhaskultuuri eraldatud seenetüvedelt tuvastati juurepessule spetsialiseerunud parasiidi (*Sphaerostilbella broomeana*) ning perekonna *Trichoderma* esindajate sage esinemine koos männi- ja kuuse-juurepessuga erinevates Eesti puistutes. Ilmnes nende seente tugevalt pärssiv mõju kuuse-juurepessu tüvede kasvule *in vitro*;

Analüüsid hariliku kuuse, hariliku männi ja arukase erinevat tüüpi istikute nakatumist juuremädaniku tekitajatega tuvastati kuuse potitaime ebasobivus suurema suremuse tõttu viljakatesse kasvukohatüüpidesse (JK, SL) võrreldes teiste istutatud taimetüüpidega;

Katsealade kändudes tuvastati madal juurepessu ja külmaseene nakkuse foon, millel puudub uuringu tulemustest lähtuvalt otsene seos katsealadele istutatud taimejuurte nakatumisega juuremädanikesse;

Taimetüüpide analüüsis selgus, et kuuse-juurepessu on enam nakatunud paljasjuursed, kuid külmaseenega pigem potitaimed;

Kõige vähem juuremädanikke esines kase potitaimedel võrreldes teiste istutatud taimetüüpidega

### **Uurimisteema prioriteedid tulevikus**

Analüüsitud perioodi (12 kuud) jooksul ei ole Rotstop preparaati veel maksimaalset toimet saavutanud. Seepärast tuleb:

Rotstop preparaadi efektiivsuse hindamiseks teha pikemaajalisi analüüse ja samadelt harvendusraie aladelt koguda kordusproovid, et välja selgitada preparaadi pikemaajalisem toime. Samuti tuleks eraldi analüüsida preparaadi efektiivsust uuendusraiate järgselt. Seejärel saab hinnata preparaadi tegelikku efektiivsust;

Testida puhaskultuuris head kasvu ja antagonistlikku mõju näidanud hiidkooriku (1, 2, 3, 4, 6, 17, 18) ning *Phlebia tremellosa* 2 ja *C. evolvens* 3 tüvesid laboritingimustes erinevatel temperatuuridel (sh 0°C

juures) ning teostada välikatsed juurepessu tõrjel efektiivseks osutunud tüvedega; Teostada täiendavad uuringud *Sphaerostilbella broomeana*, *Trichoderma* jt kottseene perekondade esindajate võimekuse ja sobilikkuse kohta juurepessu kasvu ja leviku tõkestamisel looduslikes tingimustes;

Katsealadel võimalusel jätta alles katsetaimed, st neid mitte raiuda. Katsealadele istutatud taimi on edaspidi vajalik jälgida ja analüüsida, nt mis saab juurepessu nakatunud taimedest, millest huvipakkuvam võiks olla avajuursete kase taimede edasine olukord.

### 7.1 Projekti lühikokkuvõte (maksimaalselt 500 tähemärki)

Tulemustest selgus, et Soome päritolu Rotstop preparaadi toime 12 kuud peale kändude töötlemist ei andnud oodatud tulemust ning juurepessu nakkusega kändude osakaal oli endiselt kõrge. Siiski on kändude töötlemine Rotstopiga vajalik, sest töödeldud alade kändudes on hiidkoorikut oluliselt enam võrreldes kontrolliga, mis loob eeldused juurepessu leviku ja kahjustuse vähenemiseks tulevikus. Kändude töötlemise edukust biopreparaadiga Rotstop mõjutavad lisaks töötlemise efektiivsusele ka konkreetse aasta temperatuurid – mida soojem seda parem tulemus. Analüüsist selgus, et Rotstop ei mõjuta teiste seente mitmekesisust kändudes ning selle kasutamine on loodusele neutraalse mõjuga. Isoleeriti mitmeid juurepessule antagonistlikke ja parasitiseid looduslikke seenetüvesid, mis päršivad laboritingimustes juurepessu kasvu, kuid nende sobivus juurepessu tõrjeks vajab edaspidiseid katseid välitingimustes. Kõige kehvema ellujäämusega olid kuuse potitaimed (78%) ja parima ellujäämusega kase potitaimed (96%). Kuuse potitaimede ellujäämist mõjutavad erinevad faktorid. Taimejuurte analüüsimisel tuvastati, et juba kaks aastat peale istutamist on juuremädanike tekitajad levinud, mis võib viidata stressis taimedele, see omakorda suurendab vastuvõtlikkust erinevatele patogeenidele.

### 7.2 Abstract (maksimaalselt 300 tähemärki)

The project analyzed the efficacy of the biocontrol agent Rotstop in treating spruce stumps following thinning in Estonia. After one year of treatment with Rotstop neither the abundance of *Heterobasidion* nor the diversity of fungi in spruce stumps was negatively affected. However, established study plots would form the basis for long-term research including other promising *Heterobasidion* antagonists isolated during this study. Analyzing roots of different types of plants two years after planting revealed higher abundance of *Armillaria* compared to *Heterobasidion*. Further sampling from the study plots would enable to understand their infection dynamics in the long term.

## 8. PROJEKTIGA HAAKUVAD DOKTORI- JA MAGISTRITÖÖD:

**Merit Fjodorov** 3. aasta doktorant. Töö teema „Juuremädanike kahjude analüüs ja tõrjestrategia okaspuu enamusega puistutes“.

**Viljar Veeväli** magistritöö „POTENTSIAALSETE ANTAGONISTLIKE SEENTE TESTIMINE JUUREPESSU (HETEROBASIDION SPP.) TÕRJEL“ (kaitstud 2021. aasta kevadel)

**Mirjam Veeroja** „JUUREPESSU KAHJUSTUSTE ESINEMINE HARILIKU KUUSE ENAMUSEGA PUISTUTE KÄNDUDES NING ISTUTATUD TAIMEDE ELLUJÄÄMUS“ (kaitsmine planeeritud 2022. aasta kevadel)

## 9. PROJEKTI RAAMES AVALDATUD PUBLIKATSIOONID:

**Drenkhan, T., Sutela, S., Veeväli, V., Vainio, E. 2022.** *Phlebiopsis gigantea* strains from Estonia show potential as native biocontrol agents against *Heterobasidion* root rot and contain diverse dsRNA and ssRNA viruses. *Biological Control*, 167, 104837 (lisatud aruandele)

### Koostamisel käsikirjad:

How effective is harvester to spraying ROTSTOP to Norway spruce stamps in hemiboreal Estonia? Hariliku kuuse kändude töötlemine Rotstopi ja karbamiidiga ning mõju seente mitmekesisusele

### Plaanis olevad käsikirjad:

Preparaadi Rotstop toime hariliku kuuse kändudes käsitsi pritsimise järel  
Juuremädanike esinemine erinevate taimetüüpide juurtes ning metsakasvatustasandil

<b>10. Projekti juht</b> (nimi): Tiia Drenkhan	<b>Allkiri:</b>	<b>Kuupäev: 15.01.2022</b>
--	-----------------	----------------------------

<b>11. Taotleja esindaja kinnitus aruande õigsuse kohta</b> (nimi, amet): Marek Metslaid, direktor	<b>Allkiri:</b>	<b>Kuupäev: 15.01.2022</b>
---	-----------------	----------------------------

NB! Aruanne esitada elektrooniliselt e-posti aadressil: [teadus@rmk.ee](mailto:teadus@rmk.ee)