



EESTI MAAÜLIKOOL
Põllumajandus- ja keskkonnainstituut

Kusti Aavik

**TATRA TAIMES JA SEEMNETES ESINEVATE
MÜKOTOKSIINE PRODUTSEERIVATE SEENTE ARVUKUS
EESTIS JA MÜKOTOKSIINIDEGA SAASTUMISE RISK**

THE ABUNDANCE OF MYCOTOXIN-PRODUCING FUNGI IN
BUCKWHEAT SEEDS AND THE RISK OF MYCOTOXIN
CONTAMINATION

Magistritöö
Põllumajandussaaduste tootmine ja turustamine

Juhendajad: Kaire Loit, *PhD*

Britt Puidet, *MSc*

Tartu 2022

Eesti Maaülikool Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		Magistritöö lühikokkuvõte	
Autor: Kusti Aavik		Õppekava: Põllumajandussaaduste tootmine ja turustamine	
Pealkiri: Tatra taimes ja seemnetes esinevate mükotoksiine produtseerivate seente arvukus Eestis ja mükotoksiinidega saastumise risk.			
Lehekülgi: 30	Jooniseid: 7	Tabeleid: 2	Lisasid: 1
Osakond: Taimetervise õppetool Uurimisvaldkond: : B390 Taimekasvatus, aiandus, taimekaitsevahendid, taimehaigused Juhendaja(d): Kaire Loit <i>PhD</i> , Britt Puidet <i>MSc</i> Kaitsmiskoht ja aasta: Tartu 2022			
<p>Tatra kasvupind Eestis on viimase 10 aasta jooksul kasvanud 13 korda. 2017. aasta seisuga on kogu tatra pinnast 72% mahetootmises, kus ei tohi kasutada sünteetilisi taimekaitsevahendeid tõrjumaks võimalikke patogeene. Paraku puudub tatral täna lävend tooraine turule saatmisel inimorganismile ohtlike mükotoksiinide sisalduse suhtes. Töö eesmärgiks oli koguda erinevad tatra seemnepartiid ning määrata neis esinevad mükotoksiine tootvad seened ning nende arvukus. Töös uuriti 8 erinevat partiid 7 erinevalt tootjalt. Nendest kasvatati välja puhaskultuurid, eraldati DNA ning seente universaalpraimerite abil teostati PCR analüüs. Saadud produktid sekveneeriti ning järjestuse võrdluses andmebaasidega tuvastati seente taksonoomiline kuuluvus. <i>Fusarium</i> spp. tuvastamiseks teostati perekonnaspetsiifilise praimeriga PCR analüüs. Töö tulemusena tuvastati partiidest 29 erinevat seeneliiki või perekonda, nendest potentsiaalselt mükotoksiine tootvaid oli 14, ehk 48%, kuulusid need <i>Alternaria</i>, <i>Fusarium</i>, <i>Cladosporium</i>, <i>Aspergillus</i> ja <i>Penicillium</i> perekondadesse. <i>Fusarium</i> spp. proov oli positiivne kõigil Eesti päritolu partiidel, ainsana oli <i>Fusariumi</i> suhtes negatiivne Leedust pärit Rimi seemnepartii. Tulemused näitavad, et Eestis turustatavatel tatra partiidel</p>			

esineb potentsiaalselt mükotoksiine tootvaid seeneliike. Edasi tuleks laiendada analüüsitavate partiide hulka, et saada ette laiem pilt olukorrast.

Märksõnad: tatar, mükotoksiinid, seened, saastumine

Estonian University of Life Sciences Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		Abstract of Master's Thesis	
Author: Kusti Aavik		Specialty: Production and Marketing of Agricultural Products	
Title: The abundance of mycotoxin-producing fungi in buckwheat seeds and the risk of mycotoxin contamination.			
Pages: 30	Figures: 7	Tables: 2	Appendices: 1
Department: Chair of Plant Health Field of research: B390 Phytotechny, horticulture, crop protection, phytopathology Supervisors: Kaire Loit <i>PhD</i> , Britt Puidet <i>MSc</i>			
Place and date: Tartu, 2022			
<p>The population of buckwheat has grown over 13 times in last 10 years. By the year 2017 72% of its growth area was organic, where using synthetic fungicides is prohibited. Unfortunately there are no limits for mycotoxin contain, that are toxicous for human. The aim of this study was to collect different batches of buckwheat to determine abundance of mycotoxin-producing fungi. Reasearch covered 8 different batches from 7 producers. Purecultures were grown out, DNA was isolated and PCR analysis was performed using universal primers. The resulting product was sequenced and the taxonomic affiliation of the fungi was determined by comparison with databases. For detection of <i>Fusarium</i> spp. PCR analysis with family-specific primers was carried out. As a result of this research 29 different fungal species or families were identified, 14 (48%) of which were potentially mycotoxin-producing, belonging to <i>Alternaria</i>, <i>Fusarium</i>, <i>Cladosporium</i>, <i>Aspergillus</i> and <i>Penicillium</i> families. All of Estonian originated batches were <i>Fusarium</i> positive, only negative was from Lithuania, sold by Rimi. The results show that buckwheat on the Estonian market is contaminated with potentially mycotoxin-producing fungi. Further wider analysis is needed to carry out to get wider picture of fungi potentially contaminating seeds.</p>			
Keywords: buckwheat, mycotoxin, fungi, contamination			

SISUKORD

SISUKORD.....	5
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1 Tatra (<i>Fagopyrum esculentum</i>) tähtsus.....	8
1.2 Mükotoksiinide esinemine tatra seemnetes	10
1.3 Mükotoksiine produtseerivad seened.....	11
1.3.1 <i>Alternaria</i> spp.	11
1.3.2 <i>Fusarium</i> spp.	11
1.3.3 <i>Cladosporium</i> spp.....	12
1.3.4 <i>Penicillium</i> spp.....	12
1.3.5 <i>Botrytis</i> spp.	12
1.4 Muud tatraal esinevad seened	13
2. MATERJAL JA METOODIKA	14
2.1 Katsematerjali kogumine	14
2.2 Seenorganismide määramine kultuuripõhiselt	14
2.2.1 Seemnes säilivate seenorganismide puhaskultuuri viimine	14
2.2.2 Seente puhaskultuuridest DNA eraldamine	15
2.3 <i>Fusarium</i> spp. tuvastamine seemneproovidest	16
3. TULEMUSED	18
3.1 Tatra seemneproovidest leitud seente puhaskultuuride ja nendest potentsiaalselt mükotoksiine produtseerivate seente arvukus	18
3.2 Tatra seemneproovidest tuvastatud seeneliigid	19
3.3 Perekonnaspetsiifiliste praimeritega tuvastatud <i>Fusarium</i> spp.....	21
4. ARUTELU	23

KOKKUVÕTE	24
KASUTATUD KIRJANDUS	25
LISAD.....	29
Lisa 1. Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	30
ning juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta	30

SISSEJUHATUS

Taasiseseisvunud Eestis alustati tatrakasvatusega 1996. aastal. Sel ajal oli kultuuri kasvupinnaks 100 ha. Suurt muutust pindalas ei esinenud 2000. aastate lõpuni, näiteks 2010. aastal oli kasvupinnaks vaid 300 ha (Statistikaamet 2022). Tänu toidu tarbimise teadlikkuse tõusule on tekkinud turg toortatrale. Tulenevalt selle tootmist soodustavatele mahetoetustele kasvatati 2021. aastal tatart juba 5900 hektaril, millest 5400 ha oli mahetootmine (Põllumajandus- ja Toiduamet 2022). Tatrast on saanud osa tervisliku toidu programmist, kuna tegu on vähenõudliku taimega, millel puudub tagasihoidliku kasvupinna tõttu tugev kahjurite populatsioon, keda peaks sünteetiliste pestitsiididega tõrjuma. Seetõttu on tatrakasvatus võimalik mahetootmises, mis loob eeldused keskkonnasõbralikuks tootmiseks.

Selline tootmine ei taga tingimata patogeenide vaba saaki. Paraku puudub täna selge ülevaade, kas ja millises mahus sisaldavad turustatavad toortatra seemned seeni, mis on võimelised tootma inimorganismile kahjulikke mükotoksiine (Keriene 2018). Mükotoksiine tootvaid seeneliike on uuringute tulemusena seostatud näiteks vähkkasvajate ja seedehäirete soodustajatena (Soriano et al. 2004).

Töö eesmärgiks on tatra seemnetes esinevate potentsiaalselt mükotoksiine produtseerivate seeneliikide arvukuse määramine. Hüpootees: tatra seemetes esineb mükotoksiine produtseerivaid seeni.

Uurimistööd on toetatud Eesti Maaülikooli Taimeterwise õppetooli omafinantseeringu allikast.

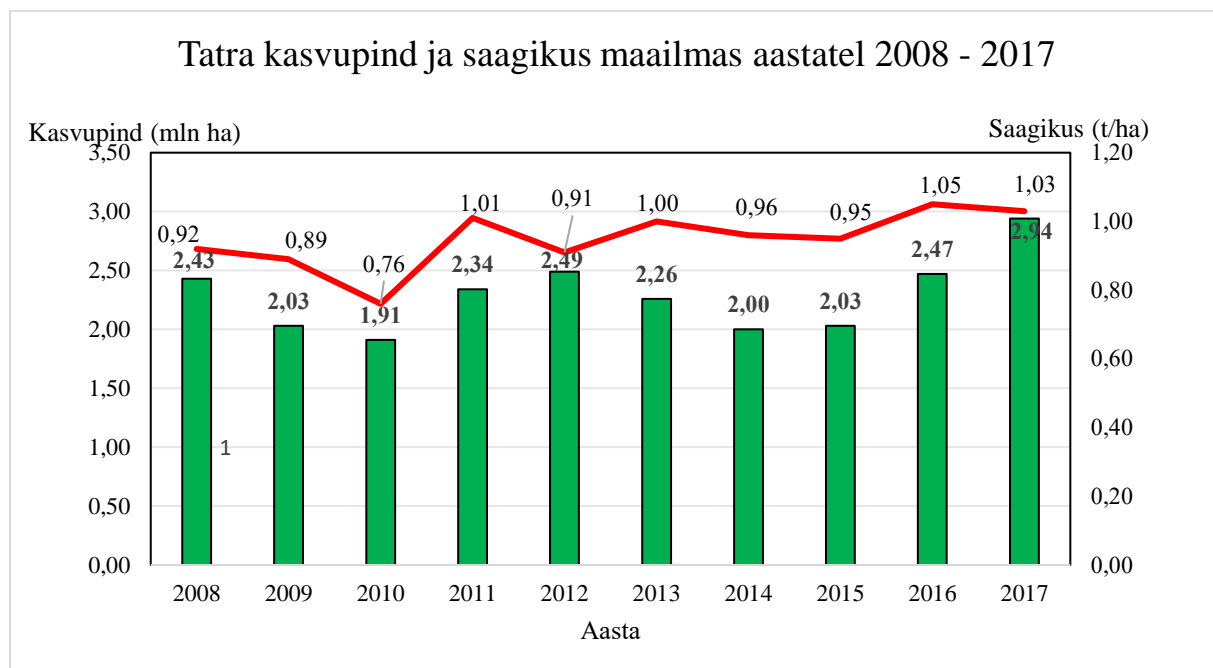
Käesoleva töö autor tänab seemnepartiide tootjaid: Rehekivi OÜ, FIE Karmo Jürgeson, Tõrvaugu Mahe talu OÜ, FIE Virgo Mihkelsoo Viira talu, FIE Hainer Kaine Mäe talu. Lõputöö juhendajaid Dr. Kaire Loit ja Britt Puidet Eesti Maaülikooli taimeterwise õppetoolist.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Tatra (*Fagopyrum esculentum*) tähtsus

Tatar (*Fagopyrum esculentum*) on üha enam tõusmas esile kui suure rasv- ja aminohapete ning vitamiinide ja mineraalide allikana (Arendt et al. 2013). Kuna tegu on gluteenivaba toiduainega, on ta sobilik ka gluteenitalumatusega inimestele (Skerritt 1986). Lisaks on katsed näidanud tatra probiootlisi omadusi. Näiteks on rottidel läbi viidud uuringus suurenenud tatra söömisel mikrobioloogiline aktiivsus kehas ning soolestikule kasulikke piimhappebakterite osakaal (Prestamo et al. 2003).

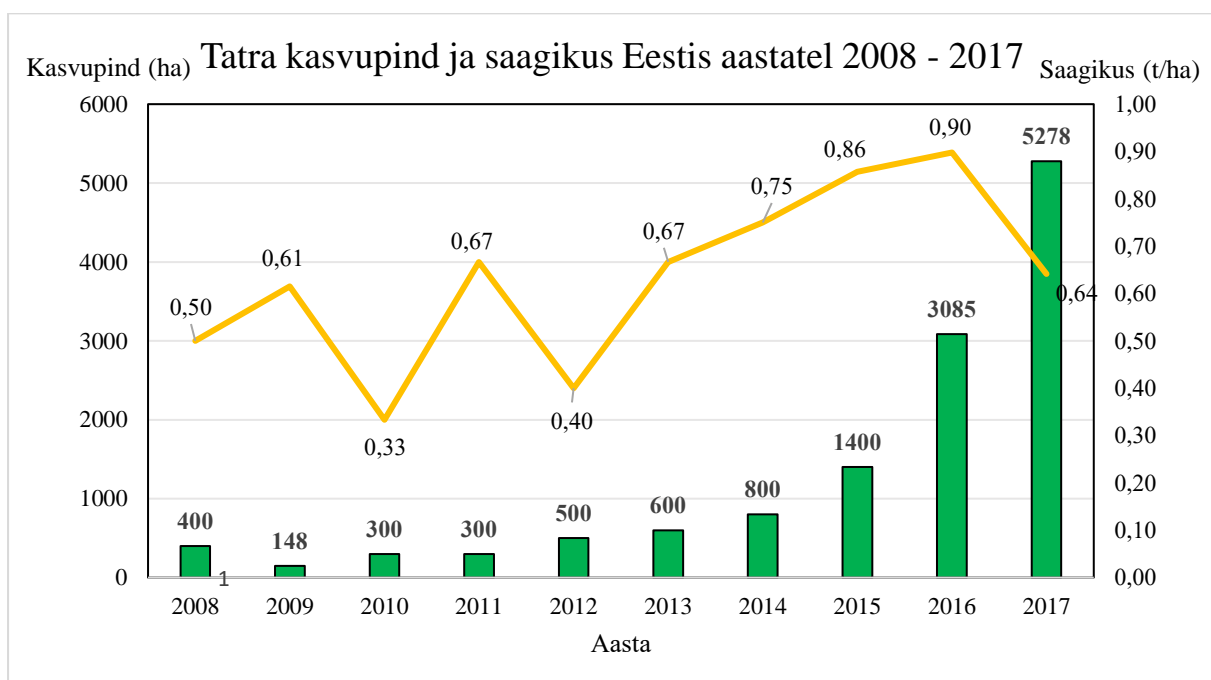
Viimaste aastate statistika põhjal on näha, et tatra kasvupind maailmas on kasvanud 10 aastaga 21% võrra 2,94 mln hektarini (joonis 1). Poole vähem on suurenenud keskmine saagikus, olles 12% võrra suurem aastal 2008 olnud 0,92 tonnise hektarisaagikusega.



Joonis 1. Tatra kasvupind ja saagikus maailmas aastatel 2008-2017 (Faostat 2022).

Aastatel 2009–2010 toimunud langust nii saagikuses kui ka kasvupinnas saab seletada 2008. aastal alanud ülemaailmse majanduskriisiga. Neil aastatel vähenes tatra kasvupind 22,4% ehk ligikaudu poole miljoni hektari võrra. Samuti langes saagikus 17,4% võrra 0,76 tonnini hektari kohta.

Eestis on viimastel aastatel tatra kasvatus hüppeliselt kasvanud. Majanduskriisile järgnenud 67% langus 2009 aastal on aastaks 2017 asendunud 13-kordse tõusuga (joonis 2). Vastavalt Põllumajandus- ja Toiduameti andmetele (2017) on kasvupind sel perioodil kasvanud 400 hektarilt 5278 hektarini. Kui aastatel 2009 kuni 2014 oli kasv keskmiselt 100% aastas, siis aastatel 2015 kuni 2017 neljakordne. Selline muutus on seletatav Euroopa liidu uue toetusperioodi alusega aastal 2014, mil alustati enam mahetootmise toetamist. Kuna valdavas osas pärineb Eestis tatra tootmine mahepõllumajandusest, kasvas seeläbi ka tatrakasvatuse populaarsus. Näiteks kasvatati 2017 aastal 5278 hektarilisest tatra kogupinnast 72% ehk 3812 ha mahetootmises.



Joonis 2. Tatra kasvupind ja saagikus Eestis aastatel 2008-2017 (FaoStat 2022).

Saagikus on olnud pärast 2008. aasta kriisi küllaltki hüppeline. Kui aastal 2009 kasvupind vähenes, siis vastupidiselt, kasvas saagikus samal aastal 22%. Pärast seda on tulnud samas ligi 50% langus, kuid ajapikku on see taastunud. 2017. aastaks on saagikus võrrelduna 2008. aastaga suurenenud 28%, ehk 0,5 tonnilt hektari kohta 0,64 tonnise hektarisaagikuseni. Eesti keskmine saagikus on maailma omast ligi 0,4 t/ha võrra madalam.

1.2 Mükotoksiinide esinemine tatra seemnetes

Üha suurenev rahvastikuarv tähendab ka suuremat nõudlust toidu ja toitainete järele, mistõttu peab intentsiivistuma ka tooraine tootmine. Intensiivsem tootmine tähendab aga suuremat sõltuvust keskkonnatingimustest ja soodsamat kasvulava erinevate seente levikuks (Kozjek et al. 2021). Katmaks vajadusi ja vähendamaks külviiga seotud riske kasutatakse üha enam sünteetilisi fungitsiide, mis võivad omada keskkonnale kahjuliku mõju.

Vähendamaks keemilise töötlemise osakaalu, on katsetatud ka erinevate termiliste seemnetöötlusviisidega, mis aga harva annavad 100% toksiinide tekkimise vastase mõju (Karlovsky et al. 2016). Üks neist on tatra seemnete töötlemine külma plasmaga, mis ei sobi külvieelseks töötluks, kuna katsed näitasid olulist langust idanevuses ja vähest mõju *Alternaria* spp. neutraliseerimisele (Mravile et al. 2021). Samas on selline töötlusviis sobilik tooraine töötlemiseks peale koristust. Veel on kasutatud kiiritamist (Lorenz et al. 1975), osoneerimist (Allen et al. 2003), mikrolainetega (Vadivambal et al. 2007) ja ultraviolettkiirgusega töötlemist (Maftei et al. 2013). Siiski on saagi saastumine erinevate mikroorganismide, sealhulgas saastumine erinevate seeneostega suur oht teraviljade tootmisele alates kasvatamisest kuni saagi hilisema töötlemiseni tehastes, kuna ükski eelnimetatud viisidest pole praktikas suurte mahtude puhul veel kasutatav.

On täheldatud, et tattras võib esineda 36 erinevat liiki seeni, mis kuuluvad enam kui 22 perekonda (Milevoi 1989). Tattras esineb peamiselt kahte tüüpi seeni: taimede kasvu ajal ja laos seemneid koloniseerivad seeni. Enne koristust on aktiivsed *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Rhizopus* liigid, seevastu laos aga *Aspergillus* ja *Penicillium* liigid (Hocking 2003). Kahju ei piirne vaid toidu mükotoksilisusega, vaid mõjub ka tõsise majandusliku kahjuna, tooraine kvaliteedi kehvenemisena, mis omakorda võib vähendada lõpptoote toiteväärtust (Los et al. 2018). Mükotoksiinidega saastunud toit mõjub organismile toksiliselt ning võib viia tõsiste tüsistusteni või isegi surmani (Paterson et al. 2010).

1.3 Mükotoksiine produtseerivad seened

1.3.1 *Alternaria* spp.

Üheks võimalikuks mükotoksiinide allikaks on *Alternaria* spp, mis on laialdaselt levinud nii atmosfääris kui ka mullas. Tatra taimes on enamlevinuimaks seeneliigiks *Alternaria alternata* (Logrieco et al. 2003). Erinevad *Alternaria* liigid toodavad erinevaid sekundaarseid metaboliite. *A. alternata* suudab toota rohkem kui 70 sekundaarset metaboliiti, millest osa on keemiliselt määratletud kui mükotoksiinid (Logrieco ja Bottalico 1992). Need mükotoksiinid kuuluvad kolme struktuursesse klassi (Bottalico ja Logrieco 1998):

- 1) Tetramiinhappe derivaadid, näiteks tenuasoonhape
- 2) Diiensopürooni derivaadid, näiteks alternariool, alternariool mono-metüüleeter ja altenueen
- 3) Perüleeni derivaadid, näiteks alvertoksiin

Uuringud on näidanud, et neist tenuasoonhapet on seostatud inimese veresoonkonna talitlushäiretega. Alvertoksiini puhul võivad tekkida geneetikhäired, näiteks inimese topoisomeraasi kahjustumist. (Dall'Asta, et al. 2014). Lisaks on leitud võimalik soodumus söögitoru vähkkasvaja tekkeks (Soriano et al. 2004).

1.3.2 *Fusarium* spp.

Teiseks koristuseelseks potentsiaalseks mükotoksiinide allikaks on *Fusarium* spp, mis mõjutavad kasvuajal taime juurestikku, põhjustades seal potentsiaalselt mädanikku (Milevoi 1989). Enamasti on selle perekonna seentega nakatumise põhjuseks mehaaniline kahjustus taimel, mille tulemusena on taimestik nõrgenenud ja vastuvõtlikum erinevatele kahjustajatele. *Fusarium* seente levikut põllul soodustavad soojad ja niisked ilmastikuolud (Singh et al. 1989). Katsete tulemusena on selgunud, et ladustamisel säilivad *Fusariumi* eosed vaid lühiajaliselt (Neergaard 1977). Seemnete idanevus on *Fusarium* perekonda kuuluvate seentega saastunud seemnematerjali puhul olnud 94% (Kovacec et al. 2016). Antud perekonna enamlevinuimateks mükotoksiinideks on (D'Mello et al. 1999):

- 1) Trichothecenes, neist tuntuim deoxynivalenool (DON), mida on seostatud erinevate seedehäirete sagenemise ja üleüldiste toitumuslikke probleemide tekkega (Ganesan et al. 2022).

- 2) Zearalenone (ZEN) mõjub negatiivselt keha hormonaalsele tasakaalule, mis omakorda viib erinevate võimalike vähkkasvajate tekkeks näiteks rindkeres, eesnäärmes või emakakaelas (Rogowska et al. 2019)
- 3) Fumonisin on samuti üheks võimalikuks vähkkasvajate tekke soodustajaks organismis (Henry ja Wyatt 1993)

1.3.3 *Cladosporium* spp.

Cladosporium perekonna seeneliigid põhjustavad taimedele kasvuaegseid kahjustusi, näiteks antud seentega nakatunud pirnide puhul on täheldatud kaubandusliku välimuse kahjustumist (Park et al. 2008). Koristusjärgselt on märgatud ka kasvuajal nakatunud pirnide edasise kvaliteedi languse jätkumist (Wenneker et al. 2014). Tuvastatud on tatra seemne idanevuse langus tugeva nakkuse korral ning seeläbi saagikuse langus (Kovacec et al. 2016).

1.3.4 *Penicillium* spp.

Penicillium on sage tooraine riknemisega seotud seeneperekond toiduainetööstuses (Perrone ja Susca 2017). Lisaks välimuse muutusele on nende puhul iseloomulikuks tunnuseks ka tajutav organoleptiline muutus algproduktis. Samas otsest ohtu inimese tervisele nad ei kujuta, kuna nende organismide kasvuks ei sobi inimeste kehale iseloomulik 37 °C. Peamiselt on *Penicillium* spp. poolt produtseeritavateks mükotoksiinideks:

- 1) Ohratoksiin A omab nefrotoksilist, kantsero – ja teratogeenset mõju ja on seetõttu inimeste jaoks väga ohtlik (Park et al. 2018)
- 2) patuliin (PAT) põhjustab immuunsussüsteemi nõrgenemist, seedeelundkonna probleeme ja närvisüsteemi häireid (Pal et al. 2017)
- 3) tsüklopiasoonhape (CPA) avaldab negatiivset mõju erinevatele organitele, näiteks neerud ja maks (Antony et al. 2003)

1.3.5 *Botrytis* spp.

Botrytis cinerea on laialt levinud erinevate põllukultuurite seemnetes säiliv patogeen, põhjustades ulatuslikku kahju (Kumar et al 2020). *Botrytis* on samuti tooraine riknemisega seotud seeneperekond, näiteks *Botrytis cinerea* on võimeline põhjustama hahkhallitust väga paljudele kultuuridele (Fillinger ja Elad 2016). See muudab toidu kasutuskõlbmatuks ja põhjustab suuri majanduslikke kahjusid.

1.4 Muud tatral esinevad seened

Lisaks potentsiaalselt mükotoksiine tootvatele seentele esineb tatral taimega sümbioosis olevaid seeni. Ühena neist on levinud tatra puhul *Epicoccum nigrum* (Kurowski et al. 2012). Peamiselt on see seen seotud taimejäänuste esmase langumisega mullas, kuid lisaks on taimele oluline partner kahjulike mikroorganismidega võitlusel (de Fafaro et al. 2012). Sealjuures on uuringud tõestanud seenel vähkkasvajavastast toimet inimestele (Rao et al. 2021).

Aureobasidium spp. on sarnaselt *Epicoccum* spp. laialt levinud seeneperekond (Kurowski et al. 2012). *Aureobasidium pullulans* puhul näitavad uuringud seene mõju taime lehtedel esinevate haiguste vastu (Grube et al. 2011).

2. MATERJAL JA METOODIKA

2.1 Katsematerjali kogumine

Katseks vajalikud tatrapartiid koguti nii otse tootjatelt kui soetati ka erinevatest kaubanduskettidest. Partiide valikul oli eesmärgiks erinevatest piirkondadest materjalide kogumine, saamaks võimalikult mitmekülgne teave potentsiaalselt mükotoksiine produtseerivate seente esinemistest tooraines. Järgnevas tabelis on välja toodud käesolevas töös analüüsitud tatrapartiid ja nende päritolu (tabel 1).

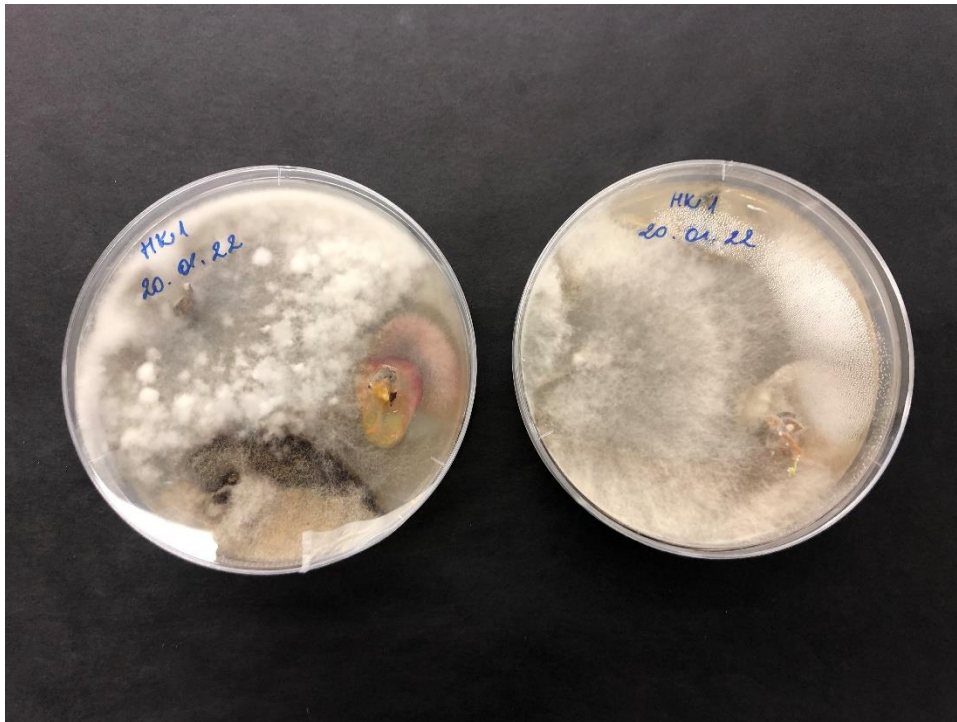
Tabel 1. Analüüsis kasutatud proovid, nende tähistus ja päritolu

Partii nimi (proovi tähis)	Tootja asukoht
Rehekivi OÜ (R)	Lääne - Virumaa
FIE Karmo Jürgenson (J)	Lääne - Virumaa
Tõrvaaugu talu (T)	Raplamaa
Viira talu (V)	Valgamaa
Remedyway kestaga (RW1)	Ida - Virumaa
Remedyway kestata (RW2)	Ida - Virumaa
Rimi (R)	Leedu
Mäe Talu FIE (HK1)	Põlvamaa
Mäe Talu FIE (HK2)	Põlvamaa

2.2 Seenorganismide määramine kultuuripõhiselt

2.2.1 Seemnes säilivate seenorganismide puhaskultuuri viimine

Igast partiist võeti juhuslikult 10 seemet. Need pindsteriliseeriti 2 minutit 5% naatriumhüpokloriti lahuses. Seejärel teostati kahekordne loputus destilleeritud vees 2 minuti vältel. Peale loputust seeme kuivatati filterpaberil ning valiti kolm juhuslikku tera, mis asetati tardsöötmege Petri tassile. Tassid märgistati ning suleti parafiinilmiga õhukindlalt (joonis 3).



Joonis 3. Petri tassile külvatud proovid Mäe talust (foto: Kusti Aavik).

Peale nädalast kasvamist kontrolliti Petri tasse ja külvati erinevate morfoloogiliste tunnustega seenisolaadid steriilse külvinõelaga uuele steriilsele PDA tardsöötmele, mida hoiti toatemperatuuril. Protseduuri korrati kuni kõikide erinevate seente puhaskultuuride välja kasvamiseni. Seenisolaatide DNA eraldati puhaskultuuri viidud seente mütseelist, mis kraabiti steriilse skalpelliga söötmelt ja asetati mikrotsentrifuugituubi.

2.2.2 Seente puhaskultuuridest DNA eraldamine

DNA eraldati puhaskultuuridest nn lüüsilahuse meetodiga vastavalt Loit et al. (2019) protokollile, mida antud töö jaoks modifitseeriti. Mütseelile lisati 100 µl lüüsilahust (Solis Biodyne Buffer B, Tartu, Eesti) ja 2,5 µl laia toimespektriga proteaasi Proteinase K (Thermo Scientific, Waltham, MA, Ameerika Ühendriigid) ning inkubeeriti üleöö 56 °C juures. Edasi kuumutati proovi 15 minutit 98 °C juures, et inaktiveerida Proteinase K. Seejärel tsentrifuugiti proovid 2 minutit 11000 rpm juures. Peale tsentrifuugimist pipeteeriti vedelik vältides sadet uude steriilsesse Eppendorf tuubi ning saadud lahusest tehti 10x lahjendused, mida kasutati edasi PCR-reaktsioonides.

2.2.3 Seente universaalpraimeritega PCR analüüs Seente universaalprimereid (ITS) kasutades viidi läbi PCR-reaktsioon, mille tarbeks kasutati 1 µl eelnevalt eraldatud ja lahjendatud DNA lahust, millele juurde lisati 5 µl Hot FIREPol Blend Master Mix'i, 18 µl destilleeritud vett, 0,5 µl pärisuunalist praimerit ITS1- F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') (Gardes ja Bruns 1993) ja 0,5 µl vastassuunalist praimerit ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC -3') (White et al. 1990). PCR analüüs viidi läbi Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Saksamaa) masinaga. PCR reaktsioonitsükkel oli järgmine: DNA ahelate esmane denaturatsioon (15 minutit, 95°C), seejärel 40 korduvat tsükli, mis koosnes ahelate denaturatsioonist (15 sekundit, 95°C), praimerite seondumisest (30 sekundit, 55°C) ning DNA sünteesist (60 sekundit, 72°C). Programmi lõpetas DNA sünteesi lisaetapp lõppekstensioon (10 minutit, 72°C), kus DNA polümeraas sünteesib lõpuni üheaahelalised DNA lõigud. PCR reaktsiooni produkti kontrolliti geelelektroforeesil, milleks valmistati 1% agarosgeel 0,5x TBE puhvris. Amplifitseeritud DNA lõigu olemasolu geelis visualiseeriti Uvidoc (Cambridge, Suurbritannia) geelipildistamise masinal.

PCR produktid saadeti Tartu Ülikooli genoomika instituudi tuumiklaborisse Sanger täisteenuse tellimusena. Sekvenerimine teostati ITS 5 praimeriga (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG -3') (White et al. 1990). TÜ tuumiklabori poolt edastatud toored sekvensi failid analüüsiti BioEdit programmiga (versioon 7.2.5). Viimases etapis toimus järjestuste blast UNITE (Abarenkov et al. 2010) ja NCBI GenBank andmebaasides (Barrett et al. 2015), mille alusel tuvastati seente taksonoomiline kuuluvus.

2.3 *Fusarium* spp. tuvastamine seemneproovidest

Fusarium seente tuvastamiseks võeti igast partiist juhuslikult 13 tera ja purustati need uhmerdamise teel. Igast proovist kaaluti steriilsetesse 2 ml tsentrifuugtuubidesse kolm 0,03 g bioloogilist kordust. Igasse tuubli lisati kolm steriilset metallkuuli ning proovid homogeniseeriti Retsch MM 400 homogenisaatoris (Retsch GmbH, Haan, Saksamaa). DNA eraldati spetsiaalse eralduskomplektiga DNeasy Plant Mini Kit vastavalt tootjapoolsetele juhistele.

Eraldatud DNA järjestamiseks kasutati polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) meetodit. Järgiti *nested* PCR protokoll, et suurendada reaktsiooni tundlikkust. Kahe amplifikatsioonreaktsiooni jaoks kasutati kahte erinevat praimerite paari. Esimese reaktsiooni puhul olid kasutusel Fa+7

(5'-AACGTCGTCATCGGCCACGTCGACTCT-3') ning Ra+6 (5'-ACATACCAATGAGGTGACATAGTAGCG-3'), teise reaktsiooni jaoks kasutati praimereid Fa (5'-TCGTCATCGGCCACGTCGACTCT-3') ja Ra (5'-CAATGACGGTGACATAGTAGCG-3') (Karlsson et al. 2016).

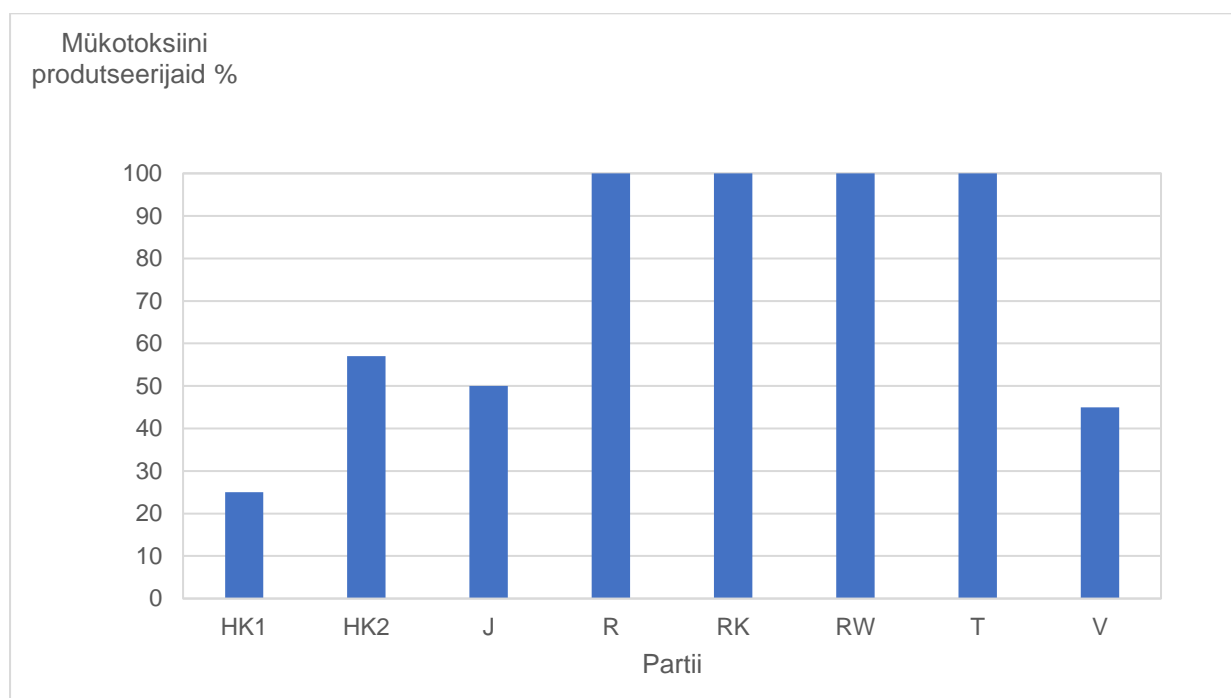
Esimene reaktsioonisegu sisaldas 5 µl Solis Biodyne PCR segu 5x HOT FIREPol Blend Master Mix (Tartu, Eesti), 1 µl DNA-d, 0,5 µl praimereid (20 mM) ja 18 µl PCR-i kvaliteediga vett. Teine reaktsioonisegu sisaldas samuti 5 µl PCR segu, kuid 0,25 µl praimereid (20 mM), 18,5 µl vett ning 1 µl esimese PCR reaktsiooni produkti.

PCR viidi läbi termotsükleriga Eppendorf Mastercycler nexus (Eppendorf AG, Hamburg, Saksamaa). PCR programm seadistati mõlema reaktsiooni puhul esmase denaturatsiooniga 95 °C 15 minutit, lõppekstensiooniga 72 °C 10 minutit ning 30 korduvaks tsükliks ahelate denaturatsiooniga 95 °C 15 sekundit ja DNA sünteesiga 72°C 60 sekundit. Praimerite seondumiseks seadistati 1 minut ning temperatuuriks sätestati 67 °C esimesel reaktsioonil ning 69 °C teisel reaktsioonil.

3. TULEMUSED

3.1 Tatra seemneproovidest leitud seente puhaskultuuride ja nendest potentsiaalselt mükotoksiine produtseerivate seente arvukus

Kaheksast seemnepartiist kasvas PDA söötmel välja 29 puhaskultuuri (joonis 4). Neist 14, ehk osakaalult 48% olid potentsiaalselt mükotoksiine produtseerivad seeneliigid.

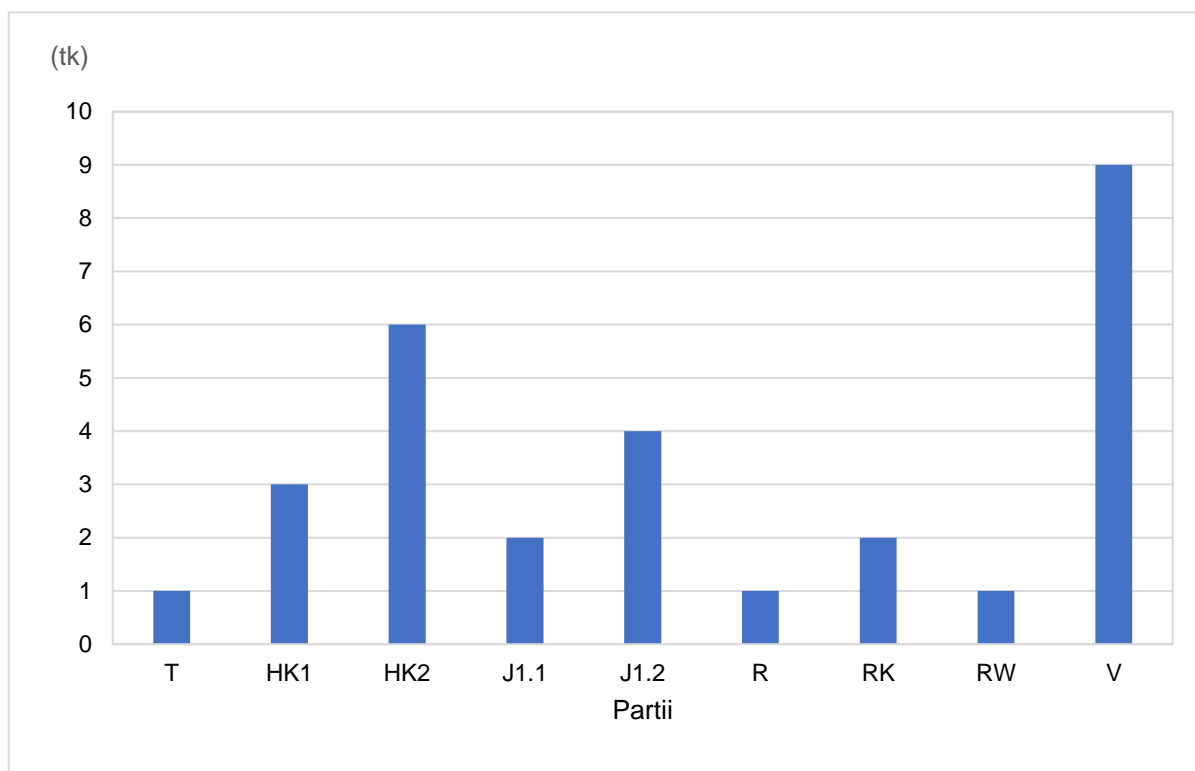


Joonis 4. Seemnepartiidest tuvastatud seentest mükotoksiine tootvate seente osakaal.

Seeneliikidest 15 ehk 52% ei olnud potentsiaalselt mükotoksiine tootvad. Need olid valdavalt tatra taimega sümbioosis olevad seened, mis toorainele ehk seemnele olulist mõju ei avalda.

Edasise analüüsi käigus eemaldati samas proovis korduvad seeneliigid ja –perekonad, et vältida puhaskultuuride külvamisel saadud korduseid. Osakaalult enim esines potentsiaalselt mükotoksiine produtseerivaid seeneliike partiides Rimi (R), Rehekivi (RK), Remedyway (RW) ning Tõrvaaugu talu (T) 100% tuvastatud liikidest olid potentsiaalselt mükotoksiine tootvad. Järgnes Mäe talu 2 partii 57%, Jürgensoni (J) 50%, Viira talu (V) 45% ning Mäe Talu 1 partii 25%.

Kõige arvukamalt tuvastati seenekultuure Viira talu (V) partiis, kokku 13. Neist potentsiaalseid mükotoksiinide produtseerijaid 4 kultuuri (joonis 5.)



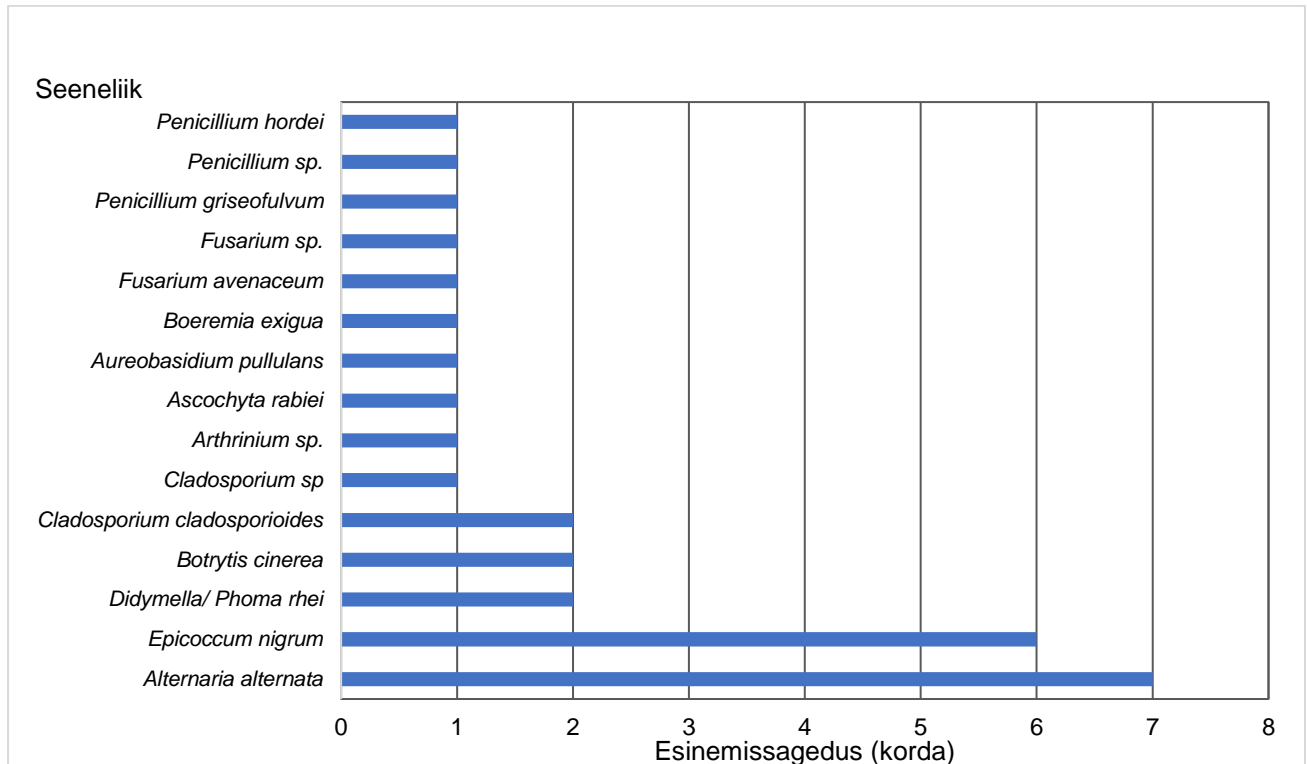
Joonis 5. Seemnepartiidest tuvastatud seente arvukus.

Mäe talu MK2 partiist tuvastati kuus erinevat seeneliiki, nendest potentsiaalselt mükotoksiine tootvaid seeneliike oli neli. Neli seeneliiki tuvastati Jürgensoni partiist J1.2, millest kaks olid potentsiaalselt mükotoksiine tootvad. Kolm seeneliiki esines Mäe talu partiis HK1, neist üks oli potentsiaalselt mükotoksiine tootev. Jürgensoni partiis J1.1 ja Rehekivi seemnepartiis RK esines võrdselt kaks seeneliiki, neist esimese puhul oli mükotoksiine tootev üks liik, teisel mõlemad tuvastatud liigid. Ainult üks liik suudeti tuvastada Rimi (R) ja Remedyway (RW) seemnepartiist ning mõlemad osutusid ka mükotoksiine tootvateks. Üheksa seeneliiki tuvastati Viira talu (V) seemnepartiist, millest neli liiki kuuluvad potentsiaalselt mükotoksiine produtseerivate seente hulka.

3.2 Tatra seemneproovidest tuvastatud seeneliigid

Kokku tuvastati tatra seemnetest väljakasvanud 29 puhaskultuurist 11 erinevat seeneliiki. 8 korral õnnestus seente määramine vaid perekonna tasemel. Kõige enam tuvastati

seemneproovidest *Alternaria alternata*, 7 korral (joonis 6). Kuuel korral esines *Epicoccum nigrum*.

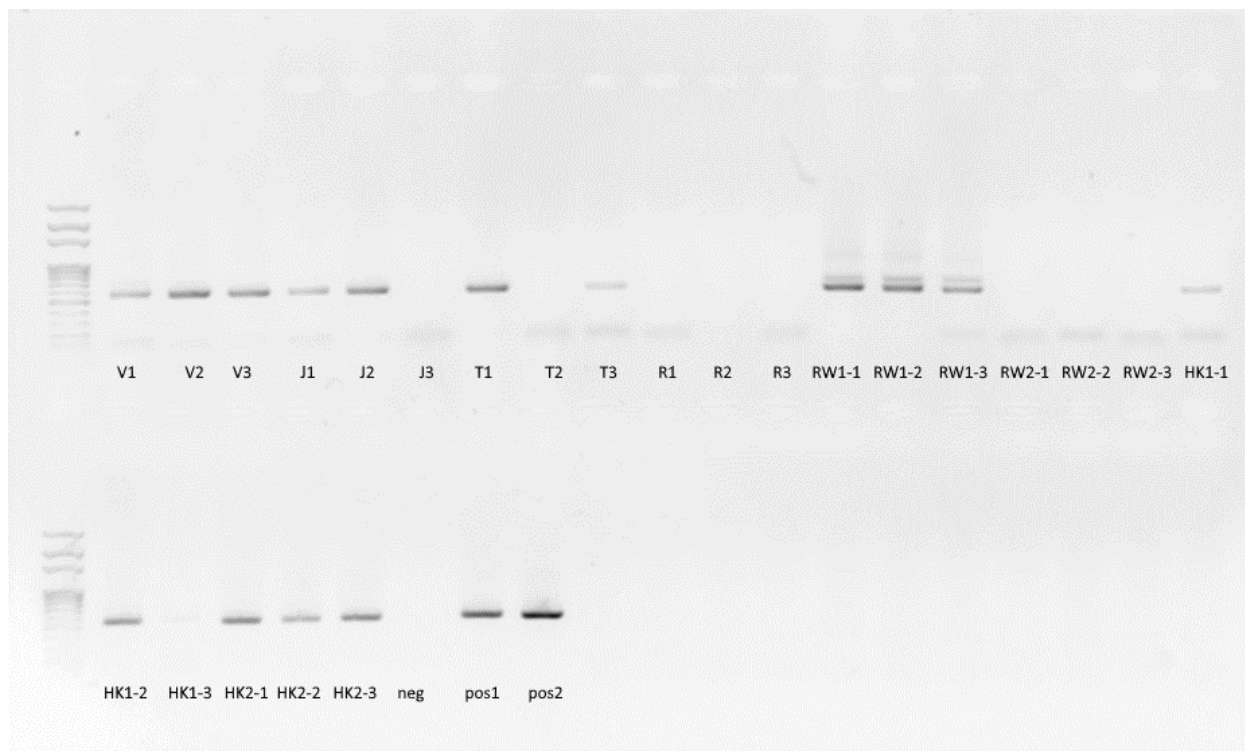


Joonis 6. Seemnepartiidest tuvastatud seeneliigid ja nende arvukus

Cladosporium spp, liike esines kolmel korral, millest 2 puhul oli tegu liigiga *Cladosporium cladosporioides*. Samuti kolmel korral esines *Penicillium* liike. Kaks korda tuvastati nii *Didymella/Phoma rhei* kui ka *Botrytis cinerea* ning perekondade *Fusarium* liike, millest tuvastati ühel juhul *Fusarium avenaceum*. Veel esines proovides ühel korral *Boeremia exigua*, *Aureobasidium pullulans*, *Ascochyta rabiei* ning *Arhriniiumi* liike.

3.3 Perekonnaspetsiifiliste praimeritega tuvastatud *Fusarium* spp.

Teostatud analüüs *Fusarium* spp. perekonnaspetsiifiliste praimeritega näitas, et saastumine *Fusarium* seentega oli valdav. (Joonis 7).



Joonis 7. *Fusarium* perekonnaspetsiifiliste praimeritega läbi viidud PCR geelil.

Viira talu kõik kolm proovi kordust andsid *Fusarium* perekonna suhtes positiivsed tulemused. Jürgensoni ja Tõrvaaugu talul olid positiivsed 2 kordust. Rimi tootepartiist võetud proovid olid kõik negatiivsed. Remedyway kordused olid kõik positiivsed. Mäe talu puhul olid kõik kahe partii kordused peale ühe positiivsed. Kuna tegemist oli proovide bioloogiliste kordustega, võime juba ühe positiivse proovi korral veenduda, et proovis esineb *Fusarium* seeni (tabel 2).

Tabel 2. *Fusarium* spp. perekonnaspetsiifiliste praimeritega analüüsitud proovid ja nende tulemused

Partii	<i>Fusarium</i> spp.
V (Viira talu)	Positiivne
J (Jürgenson)	Positiivne
T (Tõrvaaugu)	Positiivne
HK1 (Mäe talu partii 1)	Positiivne

HK2 (Mäe talu partii 2)	Positiivne
R (Rimi)	Negatiivne
RW (RemedyWay)	Positiivne
RK (Rehekivi)	Positiivne

4. ARUTELU

Tatras esinevate mükotoksiine tootvate seeneliikide esinemist on seni väga vähe uuritud. Tatra edasise populaarsuse kasvu jätkumisel muutub üha aktuaalsemaks toodetud saagi seire. Täpsemalt tuleb seirata võimalike patogeenide sisaldust tatrasedemnetes (Keriene 2018). Täna puudub selge ülevaade, mil määral sisaldab turule jõudev tatar seeneliike, mis on potentsiaalselt võimelised tootma erinevaid mükotoksiine, mis muuhulgas võivad kujutada ohtu ka inimese tervisele (Paterson et al. 2010). Valdavas osas on Eestis tatrakasvatuse puhul tegu mahetootmisega ja seega puudub intensiivne tõrje sünteetiliste fungitsiididega, vähendamaks patogeenide hulka nii põllul kui seeläbi ka tulevases saagis (Põllumajandus ja Toiduamet 2022). Seetõttu on maailmas katsetatud erinevate alternatiivsete viisidega saagi töötlemisel, kuid suurt läbimurret selles valguses pole toimunud (Karlovsky et al. 2016).

Töös uuritud partiidel esines mitmeid kirjanduses esile toodud enimlevinud potentsiaalselt mükotoksiine tootvaid seeneliike: *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* ja *Penicillium* (joonis 6). Kõige rohkem esines kogutud partiides potentsiaalsetest mükotoksiinide tootjatest *Alternaria* spp. ja kõige vähem *Penicillium* liike. Ei tuvastatud *Rhizopus* spp. esindajaid, mida uuringute tulemusena samuti tatralt leitud (Hocking 2003). Seega võib töös kasutatud partiides esineda mükotoksiinidega saastumist ning tooraine kvaliteedi langust tulenevalt partiist leitud seeneliigi elutegevusele.

Fusariumi esinemist põhjustab taimel valdavalt mehaaniline kahjustus, kuna selle tagajärjel saab taim kahjustada ja nõrgeneb ning on vastuvõtlikum patogeenidele (Singh et al. 1989). *Fusarium* seente levikut soodustavad soojad ja niisked ilmastikuolud. Antud seeneperekonda kuuluvad liigid on uurimuste tulemusena näidanud kolme ohtliku mükotoksiini tootmist. Deoxynivalenool (DON) (Ganesan et al. 2022), zearalenone (ZEN) (Rogowska et al. 2019) ning fumonisins (Henry ja Wyatt 1993) on soodustavateks faktoriteks vähkkasvaja tekkeks inimorganismis. Antud uurimustöös kasutatud partiides esines *Fusarium* liike kõigis Eesti päritolu seemnetes.

Edaspidi tuleks uurida suurema mahuliselt erinevaid tatrapartiisid, et saada referents Eesti turu olukorrast. Samuti peaks olema uuringusse kaasatud need partiid, mis pole küll Eestis toodetud, kuid turustatakse siin. Lisaks võrdlus mahe – ja tavatootmise vahel näitaks, kas fungitsiidide kasutus omab reaalselt mõju turustatava saagi ohutusele.

KOKKUVÕTE

Käesolevas uurimustöös koguti 8 erinevat tatra seemnepartiid nii Eestist kui ka Leedust. Eesmärgiks oli tuvastada ja määrata tatraseemnetes esinevate potentsiaalselt mükotoksiine produtseerivate seeneliikide olemasolu ja nende kultuuripõhiselt ning *Fusarium spp.* tuvastamiseks teostati perekonna spetsiifilise praimeriga seemnetest saadud PCR reaktsiooni produktiga võrdlus.

Töös kasutatud seemnepartiidest suudeti kokku tuvastada 29 seeneliiki. Enim esines neid Viira talus, kust leiti 13 erinevat liiki. Järgnesid Mäe Talu 2 partii kuue liigiga, Jürgesoni partiid kuue liigiga, Mäe Talu 1 partii kolme liigiga, Rehekivi kahe liigiga ning Remedyway, Rimi ning Tõrvaaugu Talu ühe liigiga. Potentsiaalselt mükotoksiine tootvaid seeneliike esines 48% juhtudest, ehk pea iga teine tuvastatud seen või seeneperekond. Proovide lõikes leidis sellist tüüpi seeni 100% ulatuses Rimi, Remedyway, Rehekivi ning Tõrvaaugu talu partiides. Mäe Talu 2 proovis oli mükotoksiine tootvaid liike 57% tuvastatud liikidest, Jürgensoni partiis 50%, Viira talus 45% ning Mäe Talu 1 proovis 25%. Puhaskultuuridest olid potentsiaalselt mükotoksiine tootvad 48% liikidest.

Fusarium spp. liikide esinemine kõigis antud uurimustöös kasutatud Eestist pärit partiides näitab selgelt selle seeneperekonna laialdast levikut seemnetes.

Tulemustest võib järeldada, et uurimustöös kasutatud partiides esines potentsiaalselt mükotoksiine esinevaid seeneliike. See näitab, et tulevikus tuleks jätkata mükotoksiinide sisalduse määramist tatraseemnetest.

KASUTATUD KIRJANDUS

Abarenkov, K., Nilsson, R. H., Larsson, K.-H., Alexander, I. J., Eberhardt, U., Erland, S., Høiland, K., Kjølner, R., Larsson, E., Pennanen, T., Sen, R., Taylor, A. F. S., Tedersoo, L., Ursing, B. M., Vrålstad, T., Liimatainen, K., Peintner, U., Kõljalg, U., (2010), The UNITE database for molecular identification of fungi – recent updates and future perspectives. *New Phytologist*, 186: 281-285.

Allen, B., Wu, J., Doan, H., (2003). Inactivation of Fungi Associated with Barley Grain by Gaseous Ozone. *Environmental Science and Health*, B 38:5, 617-630.

Antony, M., Shukla, Y., Janardhanan, K. K., (2003). Potential risk of acute hepatotoxicity of kodo poisoning due to exposure to cyclopiazonic acid. *Ethnopharmacology Volume 87*

Arendt, K. E., Zannini, E., (2013). Buckwheat. *Cereal Grains for the Food and Beverage Industries*

Barrett, T., Beck, J., Benson, D.A., Bollin, C., Bolton, E., & Bourexis, D., Brister, J., Bryant, S. H., Canese, K., Clark, K., Dicucci, M., Dondoshansky, I., Federhen, S., Feolo, M., Funk, K., Geer, L., Gorelenkov, V., Hoepfner, M., Holmes, B., Zbicz, K., (2015). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research Volume 43*

Bottalico, A., Logrieco, A., (1998). Toxicogenic *Alternaria* species of economic importance. *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*, 65–108

D’Mello, J.P.F., Placinta, C.M., Macdonald, A.M.C., (1999). usarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity, *Animal Feed Science and Technology*, Volume 80, 183-205

Dall’Asta, C., Cirlini, M., Falavigna, C., (2014). Chapter Three - Mycotoxins from *Alternaria*: Toxicological Implications. *Elsevier Volume 80*, 107-121

De Favaro, L.C.L., de Sebastianes, F.L.S., Araujo, W.L., (2012) *Epicoccum nigrum* P16, a sugarcane endophyte, produces antifungal compounds and induces root growth. *Araújo PLoS One*, 7

FaoStat (2022). ÜRO Toidu- ja Põllumajandusorganisatsioon. Kasutatud 08.04.2022 <https://www.fao.org/faostat/en/#home>

Fillinger, S., Elad, Y., (2016). *Botrytis – The Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer International Publishing

Ganesan, A. R., Mohan, K., Rajan, D. K., Pillay, A. A., Palanisami, T., Sathiskumar, P., Conterno, L., (2022). Distribution, toxicity, interactive effect and detection of ochratoxin and deoxynivalenol in food. *Food Chemistry Volume 378*

- Gardes, M., Burns, Tom.,** (2008). ITS Primers with enhanced specificity for Basidiomycetes - Application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* Volume 2. 113 - 118
- Grube, M., Schmid, F., Grube, G. B.,** (2011). Black fungi and associated bacterial communities in the phyllosphere of grapevine. *Fungal Biology* Volume 115, 978-986
- Henry, M., Wyatt, R. D.,** (1993) A Review of Fumonisin Production by *Fusarium moniliforme* and Fumonisin Toxicosis in Animals. *Applied Poultry Research* Volume 2
- Hocking, A. D.,** (2003). Microbiological facts and fictions in grain storage ochratoxin A. *Proceedings of the Australian Postharvest Technical Conference*, pp 25-27
- Karlovsky, P., Suman, M., Berthiller, F.,** (2016). Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination, *Mycotoxin Res* Volume 32, 179-205
- Karlsson, I., Edel-Hermann, V., Gautheron, N., Durling, M. B., Kolseth, A. K., Steinberg, C., Persson, P., Friberg, H.** (2016). Genus-Specific Primers for Study of *Fusarium* Communities in Field Samples. *ASM Journals - Applied and Environmental Microbiology* Vol. 82, No. 2
- Keriene, I., Makeiciene, A., Cesnuleiciene, R.** (2018). Risk factors for mycotoxin contamination of buckwheat grain and its products. *Wageningen Academic Publishers*
- Kovacec, E., Likar, M., Regvar, M.,** (2016). Temporal changes in fungal communities from buckwheat seeds and their effects on seed germination and seedling secondary metabolism. *Fungal Biology*, Volume 120:5
- Kozjek, K., Kundel, D., Kushwaha, S. K., Olsson, P. A., Ahren, D., Fleissbach, A., Birkhofer, K., Hedlund, K.,** (2021). Long-term agricultural management impacts arbuscular mycorrhizal fungi more than short-term experimental drought. *Applied Soil Ecology*. Volume 168
- Kumar, R., Gupta, A.,** (2020) *Seed-Borne Diseases of Agricultural Crops: Detection, Diagnosis & Management*. Springer
- Kurowski, T.P., Damszel, M., Wysocka, U.** (2012) Fungi colonizing the grain of the spring wheat grown in the conventional and organic systems. *Phytopathologia*, 63, pp. 39-50.
- Logrieco, A., Bottalico, A.,** (1992). *Alternaria plant diseases in Mediterranean countries and associated mycotoxins*. Elsevier, 209-232
- Logrieco, A., Bottalico, A., Mule, G., Moretti, A., Perrone, G.,** (2003). Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *Institute of Sciences of Food Production*.

- Loit, K., Adamson, K., Bahram, M., Puusepp, R., Anslan, S., Kiiker, R., Drenkhan, R., Tedersoo, L.** (2019). Relative Performance of MinION (Oxford Nanopore Technologies) versus Sequel (Pacific Biosciences) Third Generation Sequencing Instruments in Identification of Agricultural and Forest Fungal Pathogens. – Applied and Environmental Microbiology. Vol 85, Issue 21.
- Lorenz, K., Miller, B. S.,** (1975). Irradiation of cereal grains and cereal grain products. Food Science and Nutrition Volume 6:4, 317-382.
- Los, A., Ziuzina, D., Akkermans, S., Boehm, D., Cullen, P. J., Impe, J. V., Bourke, P.,** (2018). Improving microbiological safety and quality characteristics of wheat and barley by high voltage atmospheric cold plasma closed processing. Food Research International, Volume 106 pp 509-521
- Maftai, A., Ramos-Villarroel, A. Y., Nicolau, A. I., Mart, O., Soliva-Fortuny, R.,** (2013) Pulsed light inactivation of naturally occurring moulds on wheat grain. Science Food Agriculture Volume 94. 721 - 726
- Milevoi, L.,** (1989). Buckwheat diseases. Fagopyrum, Volume 9, 31-40
- Mravlie, J., Regvar, M., Staric, P., Mozetic, M., Vogel-Mikus, K.,** (2021). Cold Plasma Affects Germination and Fungal Community Structure of Buckwheat Seeds, Plants Volume 10, 851
- Neergaard P.,** (1977). Seed Patology. Macmillan, London
- Pal, S., Singh, N., Ansari, K. M.,** (2017). Toxicological effects of patulin mycotoxin on the mammalian system. Toxicology Research Volume 6, 764-771
- Park, Y. S., Kim, K. C., Lee, J. H., Cho, S. M., Choi, Y. S., Kim, Y. C.,** (2008). Cladosporium sp. is the Major Causal Agent in the Microbial Complex Associated with the Skin Sooty Dapple Disease of the Asian Pear in Korea, The Plant Pathology Journal, 118-124
- Paterson, R. R. M., Lima, N.,** (2010). Toxicology of Mycotoxins, Basel, Switzerland, Volume 100
- Perrone, G., Susca, A.,** (2017). Penicillium Species and Their Associated Mycotoxins, Methods Mol Biol, Volume 1542 107-119
- Põllumajandus-toiduamet** (2022). Eesti Põllumajandus-toiduamet. Kasutatud 20.01.2022, 08.04.2022 <https://pta.agri.ee/>
- Prestamo, G., Pedrazuela, A., Penas, E., Lasuncion, M. A.,** (2003). Role of buckwheat diet on rats as prebiotic and healthy food. Nutrition Research 23(6):803-814'

- Rao, Y. C. H., Sruthi, D., Kamalraj, S., Parthasarathy, R., Jayabaskaran, C.,** (2021). Chapter 15 - Endophytic fungi as a potential source of cytotoxic drugs: a fungal solution to cancer, Volatiles and Metabolites of Microbes, 305-323
- Rogowska, A., Pomastowski, P., Sagandykova, G., Buszewki, B.,** (2019). Zearalenone and its metabolites: Effect on human health, metabolism and neutralisation methods. Toxion Volume 162
- Singh, P. N., Sindhu, I. R., Singhal, G.,** (1984). Fungi recorded from seeds and seedling of Fagopyrum esculentum. The Journal of Indian Botanical Society Volume 63, 236-243.
- Skerritt, J.H.,** (1986). Molecular comparison of alcohol-soluble wheat and buckwheat proteins. Cereal Chem 63, 365-369.
- Soriano, J.M., Dragacci, S.,** (2004). Occurrence of fumonisins in foods. Food Res. Int, 37, 985–1000.
- Statistikaamet** (2022). Eesti Statistikaamet. Kasutatud 20.01.2022 <https://www.stat.ee/>
- Vadivambal, R., Jayas, D. S., White, N. D.G.,** (2007) Wheat disinfestation using microwave energy. Stored Products Research Volume 43. 508-514
- Wenneker, M., Köhl, K.,** (2014) Postharvest decay of apples and pears in the Netherlands. II International Symposium on Discovery and Development of Innovative Strategies for Postharvest Disease Management, 107-112
- White T. J., Bruns, T. D., Lee, S., Taylor, J.,** (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Academic Press: London, 315 - 322

LISAD

Lisa 1. Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

ning juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Mina, Kusti Aavik,

(sünnipäev pp/kuu/aa 23/02/1998)

1. annan Eesti Maaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud lõputöö: Tatra taimes ja seemnetes esinevate mükotoksiine produtseerivate seente arvukus Eestis ja mükotoksiinidega saastumise risk.

,

mille juhendajad on Kaire Loit, Britt Puidet

- 1.1. salvestamiseks säilitamise eesmärgil,
- 1.2. digiarhiivi DSpace lisamiseks ja
- 1.3. veebikeskkonnas üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Lõputöö autor *allkirjastatud digitaalselt*

allkiri

Tartu 23.05.2022,

Juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Luban lõputöö kaitsmisele.

Kaire Loit, allkirjastatud digitaalselt

23.05.2022

(juhendaja nimi ja allkiri)

(kuupäev)

Britt Puidet, allkirjastatud digitaalselt

23.05.2022

(juhendaja nimi ja allkiri)

(kuupäev)