



EESTI MAAÜLIKOOL

Metsandus- ja maaehitusinstituut

Kati Küngas

**VOOLUTSÜTOMEETRIA RAKENDAMINE GENOOMI JA
EOSE SUURUSTE MÕÕTMISEKS VALITUD KANDSEENTE
GRUPPIDES**

**APPLICATION OF FLOW CYTOMETRY TO MEASURE
GENOME AND SPORE SIZES OF SELECTED
BASIDIOMYCOTA GROUPS**

Magistritöö Loodusvarade kasutamise ja kaitse õppekava

Juhendaja dotsent Bellis Kullman

Tartu 2016

Eesti Maaülikool Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		Magistritöö lühikokkuvõte	
Autor: Kati Küngas		Õppekava: Loodusvarade kasutamine ja kaitse	
Pealkiri: Voolutsütomeetria rakendamine genoomi ja eose suuruse mõõtmiseks valitud kandseente gruppides			
Lehekülgi: 79	Jooniseid: 25	Tabeleid: 5	Lisasid: 8
Osakond:	PKI mükoloogia		
Uurimisvaldkond:	Bio- ja keskkonnateadused 1.4		
Juhendaja(d):	dotsent Bellis Kullman		
Kaitsmiskoht ja aasta:	Tartu 2016		
<p>Voolutsütomeetria kasutatakse valdavalt meditsiinis haigustekitajate ja rakutsükli uurimiseks. Seene eoste ja genoomi suuruse mõõtmiseks on varem kasutatud valgusmikroskoopiat. Eose suurus on oluline tunnus seente süstemaatikas, mida kasutatakse nii liikide piiritlemisel kui liikide määramisel (Parmasto E. ja Parmasto I. 1987). Genoomi suurus, tuuma DNA sisaldus ja polüploidus on olulised parameetrid seente elurikkuse uurimisel.</p> <p>Uuringu eesmärk oli rakendada voolutsütomeetria taelikute (<i>Phellinus</i>) ja servikute (<i>Pleurotus</i>) liikidel eose ja genoomi suuruse määramisel. Töötati välja uus meetodika ellipsoidsete seeneeoste mõõtmiseks. Eostest genoomis suuruse määramiseks lahendati mitmeid probleeme. Töötati välja uus meetodika eostest tuumade väljutamiseks sest selgus, et genoomi suurust eoste tugeva autofluoresentsi tõttu paksukestaliste eoste tuumadest mõõta ei saa. Seevastu selgus, et eoseid ja tuumi on lihtne grupeerida tänu autofluoresentsi olemasolule nende suuruse mõõtmiseks. Eose autofluoresentsi intensiivsus ise aga uue tunnusena võimaldab koos eose suurusega kasutades eritada gruppe, mis ainult eose pikkuse ja laiuse järgi ei eritu.</p> <p>Töö käigus eraldati intaktsed tuumad liikidel austerservik (<i>Pleurotus ostreatus</i>) ja kopservik (<i>P. pulmonarius</i>). Uuringu käigus mõõdeti 136 seene eoste suurus ning 16 seene genoomi suurus. Tuuma suuruse ja DNA-sisalduse vahel on seos korrelatsioonikordajaga 0,75. Intaktsete tuumade mõõtmine väldib eoste autofluoresentsist ja eosproovis mingi osa mitmiktuumadega eoste olemasolust tekkida võivat tegelikult suurema genoomi saamist. Genoomi suuruste suhteliseks määramiseks kasutati referentorganismi austerservik (<i>Pleurotus ostreatus</i>) TAAM126992 (genoomi suurusega 32 Mbp) kasutades selleks rakutsükli faasis G1 olevaid tuumi.</p> <p>Uuringu käigus välja töötatud läbivoolutsütomeetria metoodeid on võimalik kasutada seente süstemaatika jaoks eoste ja genoomi suuruse järgi liikide grupeerimiseks, liikide piiritlemiseks ja määramiseks. Voolutsütomeetria võimaldab kiiresti saada täpseid andmeid eosproovis olevate eoste mitmete parameetrite varieeruvuse kohta. Kasutades etalone saab suhtelistesed mõõdud konverteerida absoluutseteks ja teiste meetoditega saadud andmetega koos kasutada</p>			
Märksõnad: läbivoolutsütomeetria, kandseened, eose suurus, autofluoresents, genoomi suurus			

Estonian University of Life Sciences Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		Abstract of Master's Thesis	
Author: Kati Küngas		Specialty: Natural resources management	
Title: Application of flow cytometry to measure genome and spore sizes of selected Basidiomycota groups			
Pages: 79	Figures: 25	Tables:5	Appendixes: 8
Department:	PKI mycology		
Field of research:	Biosciences and Environment 1.4		
Supervisors:	dotsent Bellis Kullman		
Place and date:	Tartu 2016		
<p><i>Flow cytometry is mainly used in medicine to study pathogens and cell cycles. Fungal spore size is one of the most important characteristics in fungal taxonomy when studying species delimitation or determining species (Parmasto E. and Parmasto I. 1987). Previously, fungal spore and genome sizes were usually measured using light microscopy. Genome size, nuclear DNA content, and polyploidy are important if exploring fungal diversity.</i></p> <p><i>The aim of this study was to implement flow cytometry to measure spore and genome sizes of selected fungal groups of genus Phellinus and Pleurotus. A new methods for measuring elliptical spore sizes was developed for this. Due to strong autofluorescence of spores genome size was hard to measure for thick-walled spores and a new way to excrete nuclei of spores was therefore developed. In contrast, autofluorescence allowed for an easier way select groups of spore for further measuring. Using spore sizes and intensity of autofluorescence measured by flow cytometry allows for grouping specimen where differentiation based on spore length and width is difficult.</i></p> <p><i>Intact nuclei were isolated from Pleurotus ostreatus and P. pulmonarius spores. During this study, spores of 136 fungi and genome sizes of 16 fungi were measured. Correlation coefficient between DNA content and volume of the nucleus was 0,75. Measuring only intact single nucleus of spore excludes possibility to make mistakes by measuring two nuclei as one. To determine genome size reference organism (Pleurotus ostreatus) TAAM126992 (genome size 32 Mbp) cell cycle G1 phase spores were used.</i></p> <p><i>The study provides new methods for flow cytometry to measure spores size of elliptical spores and obtain intact nuclei for measure their DNA content. Using flow cytometry, large amounts of spores could be measured in minutes and using random sampling. Using two parameter analysis of spore sizes and intensity of autofluorescence reveal groups for fungal taxonomy to identify and delimit species.</i></p>			
Keywords: Flow cytometry, Basidiomycota, spore size, autofluorecence, genome size			

SISUKORD

SISSEJUHATUS.....	6
1. KIRJANDUSE ANALÜÜS	8
1.1. Seene eoste ja genoomi suuruse määramine	8
1.2. Töös kasutatud seadmed: voolutsütomeetria kasutamisest	11
1.3. Perekond taelik (<i>Phellinus</i>)	13
1.4. Perekond servik (<i>Pleurotus</i>).....	15
1.5. Raku(tuuma)tsükkel	18
1.6. Autofluoresents	20
2.MATERJAL JA METOODIKA	22
2.1. Materjal	22
2.1.1. Valitud seenegrupid.....	22
2.2. Metoodika	27
2.2.1. Voolutsütomeeter ja eoste mõõtmine	27
2.2.2. Mõõtmiste võrreldavus teiste metoodikatega	30
2.2.3. Genoomi suuruse mõõtmine voolutsütomeetriga.....	31
3.TULEMUSED.....	33
3.1. Mõõtmisandmete korrigeerimine (perekond <i>Phellinus</i>).....	33
3.2.Tulemused perekonnas taelik (<i>Phellinus</i>)	35
3.3. Tulemused perekonnas servik (<i>Pleurotus</i>).....	40
3.3.1. Eoste suuruse mõõtmine.....	40
3.3.2. Genoomi suuruse mõõtmised.....	41
4. DISKUSSIOON	45
KOKKUVÕTE.....	53
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU.....	55

APPLICATION OF FLOW CYTOMETRY TO MEASURE GENOME AND SPORE SIZES OF SELECTED BASIDIOMYCOTA GROUPS.....	61
Summary	61
LISAD	63
Lisa 1. Töös kasutatud tsütomeetr ja selle sisu	64
Lisa 2. Perekond taelik (Phellinus) algandmed.....	65
Lisa 2. järg.....	66
Lisa 2. järg.....	67
Lisa 2. järg.....	68
Lisa 3. Perekond servik (Pleurotus) algandmed.....	69
Lisa 3. järg.....	70
Lisa 4. Paranduskoefitsientide arvutused kasutades Q (Carl Kullman 2015)	71
Lisa 4. järg.....	72
Lisa 4. järg.....	73
Lisa 4. järg.....	74
Lisa 4. järg.....	75
Lisa 5. Intaktsete tuumade DNA- sisaldus ja genoomi suurus (perekond servik).....	76
Lisa 6. F-test ja Studenti t-test mikroskoobi ja tsütomeetri pindalade võrdlemiseks (perekond taelik)	77
Lisa 7. F-test ja Studenti t-test parandatud ja parandamata pindalade võrdlemiseks (perekond servik	78
Lisa 8. P. ostreatus ja P. pulmonarius tuumade ruumala ja genoomi suuruse vaheline regressioonianalüüs	79

SISSEJUHATUS

Seente eoseid on mõõdetud valgusmikroskoobiga ning see on olnud tähtis meetod seente süstemaatikas liikide piiritlemisel ja määramisel. Tõusev ternd määrata sene liike sekventsi abil sõltub samuti eose mõõtude määramise täpsusest, sest otsitakse kokkulangevusi liikidega ja tüüpeksemplaridega, mis on eelnevalt määratud eosmõõtude ja teiste morfoloogiliste tunnuste abil. Eestis on teada 3278 kandseeni liiki (PlutoF andmebaas).

Seente kirjeldamisel ja määramisel kasutatakse laialdaselt eosmõõtmeid ning nende täpsele määramisele liigisisese ja eksemplarisese varieeruvuse uurimiseks on pööraanud erilist tähelepanu Erast Parmasto ja Ilmi Parmasto (1987). Ühe seene eosproov sisaldab informatsiooni juba järgmise, F1-põlvkonna kohta. Iga eos on potsensiaalne jägmise põlvkonna esindaja. Üks eosproov sisaldab tuhandeid kahe eellase rekombinatseid järglasi kusjuures kummagi eelase mingi tunnus lahkneb põlvkonnas F1 vahekorras 1:1 kuna tegu on haploididega. Samas sisaldab ühe seene üks eosproov tuhandeid erinevaid F1 põlvkonna rekombinante võimaldades seega uurida tunduvalt suuremat väljavõtet liigi varieeruvusest kui paaristuumse viljakeha tunnus.

Publitseeritud andmed seente genoomi suuruse kohta on koondatud andmebaasi Fungal genome size database (Kullman *et al.* 2005). Teada on üle 1800 seene genoomi suuruse määratuna erinevate meetodite abil (Tavares *et al.* 2014). Seente genoomi suurus jääb 2.5 Mb *Encephalitozoon cuniculi* (Ditrich *et al.* 2011) ja 3050 Mb *Neottiella* sp. vahele (Kullman 2007) kusjuures 90% olemasolevatest andmetest jääb vahemikku 10 Mb kuni 60 Mb. Genoomi suurus on tähtis elurikkuse tunnus, mille uurimisel on nii praktiline kui teoreetiline tähtsus bioloogias. C-väärtus (*C value*) on DNA kogus haploidses genoomis, mis antakse molekulaarses kaalus või massiühikutes (Biology online 2005 *s. v.* *C value*). Andmed liigi C-väärtue kohta võimaldavad hinnata kogu genoomi sekveneerimiseks vajaminevaid vahendeid ja aega.

Voolutsütomeetriat on laialdaselt kasutatud meditsiinis kuid siiani suhteliselt vähe mükoloogias (Davies 2016). Eose mõõtmine voolutsütomeetriaga annab võimaluse määrata nii eose suurust kui ja eoste autofluoresentsi ja DNA sisaldust ja genoomi suurust (Dreyer ja Morte 2009, Tavares 2014) ühe proovi tuhandetest eostest ja tagada tulemuste usaldusväärsus. Voolutsütomeetria võimaldab uurida nii liigisisest kui liikide vahelist varieeruvust, määrates seene eoste DNA sisaldust, polüploidisust ja hübriidsust (Kullman ja Greve 2007)

Käesoleva töö eesmärgiks oli rakendada süstemaatiliselt ja geneetiliselt oluliste liigitunnuste, eose suuruse, tuuma DNA-sisalduse ja genoomi suuruse määramiseks voolutsütomeetriat ja uurida saadud tulemuste kasutatavust kandseene perekondades servik (*Pleurotus*) ja taelik (*Phellinus*) liikide uurimiseks. Samuti taheti välja töötada meetod, et mõõta intakseid tuumi ning seejärel uurida seost tuuma suuruse ja DNA- sisalduse vahel. Eesmärgiks oli mõõta ka taeikute eossuurused ja rakendada autofluoresentsi intensiivsust, et eoseid grupeerida substraadi ja asukoha alusel.

Samuti taheti töös kindlaks teha, kas eoste mõõtmist mikroskoobiga, mis on aega- ja vaevanõudev ning silmadele kahjulik, saab asendada mõõtmisega FC-ga, mis on oluliselt kiirem ja usaldusväärsem. Võrdluseks kasutati Ilmi Parmasto poolt varem mikroskopeeritud eosproove perekonnast taelik (*Phellinus*) (Autori avaldamata andmed, autori nõusolekul 2015).

Täna kõiki Eesti Maaülikooli Põllumajandus- ja keskkonnainstituudi mükoloogia osakonna töötajaid. Tänuavaldused suurepärase juhendamise eest Bellis Kullmanile ja Ilmi Parmastole eosproovide tekstide ja avaldamata mõõtmisandmete eest. Mükoloogiaalaste ja keeleliste korrektuuride eest avaldan tänu veel Triin Varvasele. Matemaatilise abi ja nõustamise eest tänan Carl Kullmani.

1. KIRJANDUSE ANALÜÜS

Käesolevas peatükis tuuakse ülevaade töös kasutatud liikide perekondadest ning eoste suuruse määramisest. Käesolevas töös ei ole eesmärgiks muuta süstemaatikat ega tundmatuid liike määrata, vaid antakse ülevaade täiendavast võimalusest uurida problemaatilisi liike ja perekondi. Kirjanduse põhjal on toodud ülevaade erinevatest küsimustest, mis ei ole lahendust leidnud.

Samuti kirjeldatakse uuringus kasutatud voolutsütomeetria kasutusalasid ning viimase tööpõhimõtet. Lühidalt kirjeldatakse töös kasutatud fluorokroomide mõju ning antakse ülevaade genoomisuuruse mõõtmist mõjutavast autofluoresentsist ja rakutsüklist.

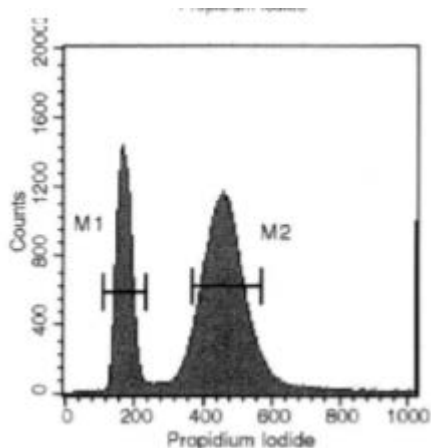
1.1. Seene eoste ja genoomi suuruse määramine

Genoomi suurus on väga varieeruv eukarüootide hulgas ning otsitakse selgitust nn C-väärtuse paradoksile. Käimas on projekt 1000 seeneliigi genoomi sekveneerimiseks (Grigoriev 2014). Selle meetodiga on esialgu saadud informatsiooni 172 seeneliigi genoomi kohta (Mohanta 2015). Arvestades kõiki genoomi suuruse määramiseks kasutatavaid meetodeid on avaldatud genoomi suurused 1943 seene eksemplari kohta (seisuga 11.05.2016 andmebaasi „Fungal genome size database“ alusel (Kullman et al. 2005, Tavares *et al.* 2014). Kõige rohkem on seene genoomi suuruse määramiseks kasutatud mikrospektrofotomeetria (Kullman 2000). Seda meetodit on rakendanud kandseentel (Wittmann-Meixner 1989) ja kottseentel (Weber 1992). Voolutsütomeetria hakati seente puhul esmalt kasutama pärmide rakutsükli ja ploidsuse uurimiseks (Carlson 1997). Pärast leiva-pärmseene (*Saccharomyces cerevisiae*) genoomi täielikku sekveneerimist 1996 aastal oli võimalik hakata seda liiki kasutama

referendina ka teiste seente genoomi suuruse suhteliseks määramiseks voolutsütomeetria abil (Kullman 2000).

DNA sisalduse määramisel kasutatakse fluorokroome, mis fluoreseeruvad kindlal lainepikkusel (Walker-Daniels 2012). Propiidiumiodiid (PI) ja DAPI (4',6-diamidino-2-fenüülindool) (*4',6-diamidino-2-phenylindole*) kuuluvad kõige kasutatavamate orgaaniliste värvainete hulka, mida ergastatakse sinise lainepikkusega valguse poolt (Johnson 1998 viidatud Walker-Daniels 2012) Samas on teada, et mõned rakuosad omavad autofluoresentsi.

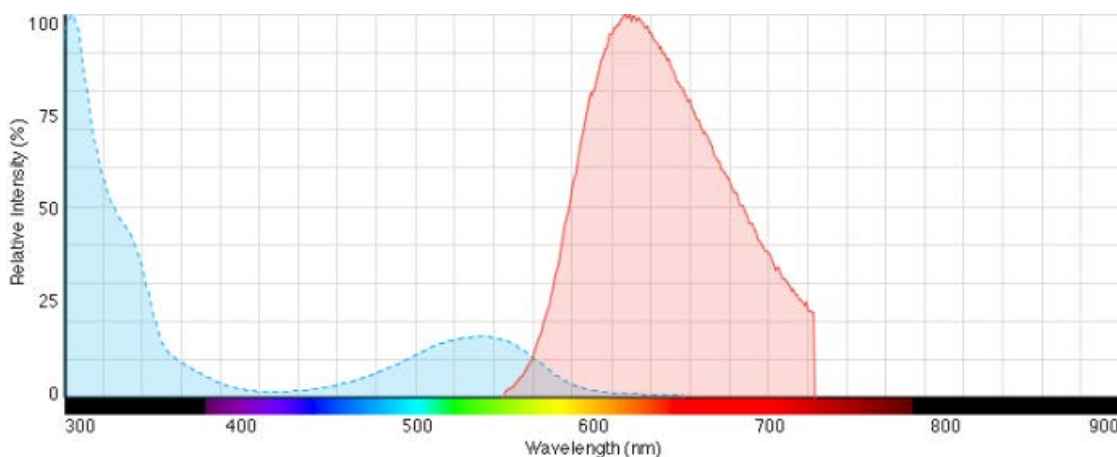
Tuuma DNA sisalduse ja genoomi määramisel kasutatakse mitmeid meetodikaid. Käesolevas töös kasutati tuuma DNA värvimiseks propiidiumiodiidi, mis värvib DNA-d surnud rakkudes (Bruckner 2012). PI eeliseks on see, et seondub kaheahelalise DNA ahelate vahel interkaleerudes proportsionaalselt baaspaaridega (R&D Systems 2016). See omadus muudab aine sobilikuks genoomi suuruse mõõtmisel. PI seondub ka kaheahelalise RNA-ga ning genoomi mõõtmiseks tuleb see eemaldada (Arndt-Jovin 1989 viidatud Walker-Daniels 2012)



Joonis 1. DNA sisalduse sagedusdiagramm *Pleurotus ostreatus* (M1) and *Phellinus punctatus* (M2) eostes. (Kullman 2000).

Märkus. Siin illustreeritakse suhtelist mõõtmist referntorganismi eosproovi suhtes värvituna propiidiumiodiidiga

PI kasutatakse voolutsütomeetrias ja sellega värvitakse genoomi ja kromosoome. PI'd kasutatakse ka surnud rakkude tuvastamisel (ThermoFisher 2015). PI seondub DNA-ga baassidemete vahel. Fluoresentsi emissiooni maksimum on lainepikkusel 617 nm (*Ibid*) nagu on näidatud joonisel 1. Selle lainepikkuse mõõtmiseks sobib töös kasutatud voolutsütomeetri FL3 kanal. Rakus imendub propiidiumiodiid tsütoplasmas ja tsütosoolis (*Ibid*). Sobilik laser ergastamisel on 488 nm.



Joonis 2. Propiidiumiodiidi fluoresentsi lainepikkus (ThermoFisher 2015).

Märkus. Punane värv tähistab propiidiumiodiidi emissiooni lainepikkuse vahemikku.

DAPI meetodika kasutamine võimaldab uurida ka elusaid rakke, kuid tuleb arvestada veega, mis võib tekkida sellest, kuhu värv ladestub. DAPI kasutamine on kiirem, sest ei vaja eelnevat töötlust RNase lahusega (Chazotte 2010). Propiidiumiodiidiga värvides tuleb eemaldada eoses sisalduv RNA, et vältida valemõõtmisi (Walker-Daniels 2012, Davies 2016). Mõlemad meetodikad põhinevad fluoresentsil ning seetõttu on autofluoresentsi uurimine DNA sisalduse määramisel oluline. Autofluoresentsi võib mõjutada ka proovide säilitamis- ja või kogumistingimused, mida tuleb arvestada (Raghavachari 2003, Dreyer ja Morte 2009)

Eoseid on üldiselt mõõdetud valgusmikroskoobi abil ning peetud tähtsaks karakteristikuks (Kullman 1993). Eraldiseisvate tuumade mõõtmisel valgusmikroskoobiga võib probleeme tekkida, sest osakesed on väga väikesed. Buckner väitel on väikseid rakke mikroskoobi all

raske mõõta, sest võivad mittebiotiliste osakeste alla jääda, lahus valgub laiali või muutub keemiliselt (2012). Tsütomeetris saab mõõta suure koguse osakesi lühema ajaga.

Taelikute eoseid on põhjalikult uurinud Erast ja Ilmi Parmasto. Nad kasutasid selleks valgusmikroskoopiat ja matemaatilist analüüsi (1987). Nad kirjeldatud liikide eose suure varieeruvust ning tõid välja ka liigi- ja isendisese varieeruvuse. Käesolevas töös uuritud perekond taeliku geneetikat ja DNA- sisaldust on varem põhjalikult käsitletud Michael Fischeri poolt (Fischeri 1987). Selle perekonnas liike on meil uurinud nii oma magistri kui ka doktoritöös Indrek Sell (2007, 2012)

Perekond servik (*Pleurotus*) eoste suuruseid ning morfoloogiat on uuritud väga mitmete autorite poolt, kuid väga üksikasjaliku ülevaate eosuuste varieeruvusest annab (Hilber 1982) ning voolutsütomeetria abil on genoomi suurust määratud Kullmani poolt (2000).

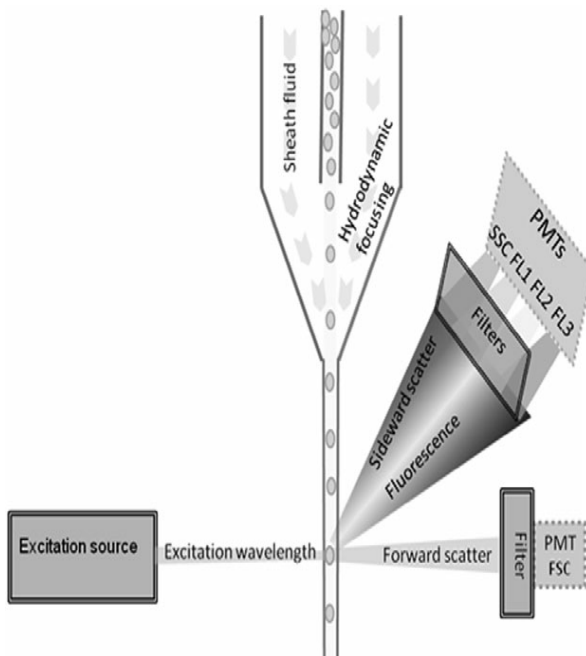
1.2. Töös kasutatud seadmed: voolutsütomeetria kasutamisest

Fluoresentsipõhist voolutsütomeetriat hakkas seente geneetika uurimisel kasutama Carlson, tutvustades seda pärmseente abil, kuid tsütomeetria ajalugu meditsiiniliselt on pikem (1997). Tsütomeetria tähendab raku mõõtmist. Voolutsütomeetria abil saab analüüsida osakeste mõõtmeid, fluoresentsi ja kogust voolusüsteemis. Tsütomeeter võimaldab osakesed ergastada laseri abil ja konverteerib andmed arvutile sobilikuks (Dreyer ja Morte 2009). Tähtsal kohal on tsütomeetrias rakutsükli leidmine, mis oli viimase üks esimesi kasutusviise (Davies 2016).

Voolutsütomeetria abil on võimalik mõõta osakesi suuruses 0,2- 200 μm . Käesolevas töös kasutatud tsütomeeter võimaldab mõõta osakesi suurusega alates 0,5 μm (Dreyer ja Morte 2009, Flow Cytometry user guide). Samuti on oluline, et eoseid eksponeeritakse laserile lühikest aega ning seetõttu ei tekitata eostele kiiritusel vigu ja neid saaks edaspidi kultuuris kasvatades uurida (Dreyer ja Morte 2009). See on oluline eelkõige elusate eoste mõõtmisel, aga ka muudes uuringutes, sest algmaterjali säilimine andmete töötlemisel on tähtis.

Voolutsütomeetria kasutamiseks tuleb tuumad värvida florokroomidega, mis liitub DNA hulgaga proportsionaalselt. Seejärel mõõdetakse iga eosele fluoretsi intensiivsust eraldi kusjuures fluoretsi intensiivsus vastab DNA sisaldusele (Kullman 2000). Veselska *et al.* mõõtis tsütomeetriga seente genoomi suurust ning sai vastavuse varem sekveneeritud andmetega (2014). Dreyer ja Morte andmetel on võimalik voolutsütomeetriaga leida ja mõõta seente eoseid (2009). Seente tuum on eostes ja hüüfides haploidne ning seega vastab DNA hulk rakutsükli faasis G1 genoomi suurusele (Kullman 2000).

Voolutsütomeetria on kasutatud seente eoste ja geneetika uurimisel (Carlson 1997, Kullman 2000, Tavares *et al.* 2014, Veselska *et al.* 2014, Ramos 2014). Samas on viiteid voolutsütomeetria kasutamisest seente uurimisel veel vähe. Voolutsütomeetriga on võimalik mõõta voolusüsteemis väikeste osakeste suurust, kogust ja fluoretsi, kuid selle põhiline väärtus on genoomi suuruse määramine (Kullman 2000, D'Hondt *et al.* 2011).



Joonis 3. Voolutsütomeetri tööpõhimõte (D'Hondt *et al.* 2011)

Voolutsütomeeter koosneb voolutist, optilisest ja elektrilisest süsteemist, kus iga voolutit läbiv intaktne osake ergastatakse valgusallika (laserkiire) abil ja mõõdetakse. Joonisel 1 on näidatud, kuidas voolutsütomeetriga saab mõõta osakeste suurust, kogust ja fluoretsi. Joonisel oleval skeemil on näha fotokordistid, mille abil on võimalik mõõta väga nõrka valgussignaali (D'Hondt *et al.* 2011). Voolutsütomeetris olev laser emiteerib valgust ning footonis toimuva imendumise tagajärjel elektron kiirgab valgust (Microscopy research centre).

1.3. Perekond taelik (*Phellinus*)

Kandseente hõimkonda kuuluv selts Hymenochaetales, taelikulaadsed, võeti kasutusele aastal 1977 (Oberwinkler viidatud Larsson *et al.* 2006). Perekond taelik (*Phellinus*) on mitmete autorite poolt uuritud, kuid siiski on liikide grupeerimine problemaatiline ning paljude liikide asend selgusetu (Oberwinkler 1977 viidatud Larsson *et al.* 2006, Fischer 1987, Parmasto E. Ja I 1987, Fischer 1995, 1996, 2001, Jin *et al.* 2005, Sell 2006, Larsson *et al.* 2006, Baltazar ja Gibertoni 2010, Rajchenberg 2011).

Taelikulaatsete selts on valdavalt saprotroofseid liike sisaldav, mis lagundavad tselluloosi, hemitselluloosi ja ligniini. Liigid on valgemädaniku tekitajad, kus jäetakse elutegevuse käigus suurem osa ligniini alles (Rayner ja Boddy 1988 viidatud Larsson *et al.* 2006). Mitmed polüroidsed taelikulaadsed seened on esmased lagundajad - *Phellinus*, *Poroaedalea*, *Fomitiporia*. Liigid pääsevad surnud kudede kaudu puusse ning muudavad puud tormihellaks (Larsson *et al.* 2006). Metsanduses põhjustab kahjusid *Phellinus pini* ja *P. igniarius* südameädanike põhjustajatena (*Ibid*). Samas võivad taeliku liigid olla kasulikud meditsiinis ja puidujääkide eemaldamisel (*Ibid*).

Liikide nimede ajakohasust kontrolliti andmebaasist Index Fungorum ning asend eluslooduse süsteemis saadi eElurikkus andmebaasist. Perekond taelik (*Phellinus*) kuulub riiki seened (fungi), hõimkonda kandseened (Basidiomycota), alamklassi (Agaricomycotina), klassi

(Agarimycetes), alamklassi (Agaricomycetes subcl. Incertae sedis), seltsi taelikulaadsed (Hymenochaetales) ja sugukonda taelikulised (Hymenochaetaceae) (Elurikkuse andmebaas).

Kuusetaelik (*Phellinus chrysoloma*) on kuusikute indikaatorliik ja männitaelik (*Phellinus pini*) männikute indikaatorliik (Parmasto 2008: 16). Seega on neil liikidel metsade kasvukohatüüpide määramisel oluline roll. Kuusetaelik (*Phellinus chrysoloma*) ja haavataelik (*P. Populicola*) on leitud Poruni põlismetsadest (Saar *et al.* 2007).

Taeliku perekonna liigid on välimuselt sarnased ning raskesti määratavad ning ei piisa ka peremeestaimest, et liik määrata. Viljakehade värvus on pruun ning need on mitmeaastased ja tugevad. Hüüfidel puuduvad pandlad ning värvus on kuldpruun ja samuti on leitud, et eoste suurus on väga varieeruv (Parmasto *toim.* 2008:182).

Taelikute perekonna kohta on tehtud väga mitmeid fülogeneesi puid, mida on palju muudetud (Fischer 1987, 1995, 1996, 2001, Jin *et al.* 2005, Larsson *et al.* 2006). Yombiyeni *et al.* (2011) järgi kuuluvad *Fomitiporia* perekonda *F. hartigii* (*P. hartigii*) ja *F. punctata* (*P. punctatus*) ning seega eraldi gruppi teistest, mis kuuluvad praeguseni perekonda taelik. Sama autori poolt on *P. populicola* ja *P. igniarius* määratud ühte klaadi, kuhu kuulub ka *P. alni* (2011). Larsson *et al.* (2006) järgi kuuluvad ühte gruppi/subklaadi *Prodaedalea chrysoloma* ja *P. pini* ehk eraldi *Phellinuste* esindajatest. Samuti on määratud ühte gruppi *Phellinus igniarius* ja *P. populicola* ning *Fomitiporia robusta* ja *F. punctata* (2006).

Perekonna taelik liikidele võib sekundaarses mütseelis olla mitu tuuma ning esineda bipolaarne heterotalne paljunemise süsteem ehk paljunemine toimub ühe ja sama talluse piires (Dictionary of Biology 2004 s. v. *heterothallic*, Rajchenberg 2011). Samuti on nad dimitilised ehk neil on kaks erinevat tüüpi hüüfe- generatiivne ja skeletaalne või generatiivne ja siduv (Australian Government, Rajchenberg 2011).

Taelikute perekonnas on liike jaotatud kaheks (Fischer 1987: 62) vastavalt ploidsusastmetele. Esimesse gruppi on paigutatud *Phellinus robustus*, *P. hartigii*, *P. hippophaecola*, *P. punctatus*. Need liigid on nimetatud kui paljunemisviisilt homotalsed liigid ehk seemed, mis kasutavad paljunemisel sama tüvega mütseeli ning võivad olla kahekordse ploidsusastmega (Fischer 1987: 62, Dictionary of Biology 2004 s. v. *homothallic*).

Teise gruppi on Fischer lisanud liigid, mis on heterotalsed (Dictionary of Biology 2004 s. v. *heterothallic*) ning 1x ploidsusastmega. Sellesse kuuluvad: *Phellinus igniarius*, *P. torulosus*, *P. tremulae*, *P. pini*, *P. chrysoloma* (Fischer 1987: 62). Indrek Sell on leidnud, et *P. nigricans* erineb teistest *P. igniarius* grupi liikidest eose suuruse poolest märkimisväärselt, kuid ei ole ainult eose mõõtmete järgi siiski määratav (Sell 2006). Molekulaarsete analüüsidega on *P. igniarius* gruppi kuuluvad seened saadud 100% tõenäosusega ühte klaadi kuuluvaks (Sell 2008).

1.4. Perekond servik (*Pleurotus*)

Michael Kuo järgi on perekonna servik liikide viljakehadel tugev ja keskne jalg ning esineb osaline rõngas, mis ei kata kogu jalga ning kuulub perekonda, mille nimetusest tuleneb sõna *pleurotoid* (2009). Kopsservik (*Pleurotus pulmonarius*), austerservik (*P. ostreatus*) ja loorservik (*P. dryinus*) kuuluvad riiki seened (Fungi), hõimkonda kandseened (Basidiomycota), alamhõimkonda (Agaricomycotina), klassi (Agaricomycetes), alamklassi (Agaricomycetidae), seltsi šampinjonilaadsed (Agaricales), sugukonda (Pleurotaceae) ja perekonda servik (*Pleurotus*) (eElurikkuse andmebaas).

Eestis on määratud serviku perekonna esindajaid kaitse alla ning neid leidub kaitsealustes metsades (eElurikkuse andmebaas). Austerservik (*Pleurotus ostreatus*) on Eestis leitud rohkem Lääne-Eesti ja saartel ning Kagu-Estis. Rõngasservik (*Pleurotus calypttratus*) kuulub ohulähedaste liikide hulka ning ohuteguriteks on metsahooldustööd, kuid arvukus on stabiilne. Kaitsesoovituseks antakse hooldustööde vähendamist (eElurikkuse andmebaas).

Perekond servik on majanduslikult väga tähtis just toidutööstuse tõttu, aga ka meditsiinis ning puidu lagundamises (Camarero *et al.* 1995, Kumla 2013). Substraadina kasutatakse tihti saepuru (Kumla 2012). Kopsservik toodab väga palju eoseid ning allergikutele ja kasvandustes töötavatele inimestele mõeldes on püütud aretata uusi vorme, mis eoseid ei tooda (Oukuda *et al.* 2009). Kopsservik liigil on leitud ka vähivastaseid omadusi (Wasser 2002).

Liikide austerservik ja kopsservik eristamine on problemaatiline ning seda on uuritud mitmete autorite poolt (Petersen ja Hughes 1992, Kullman *et al.* 2005, Kullman ja Greve 2007, Kumala 2013). Larraya *et al.* järgi on austerservikul varieeruv genoomi suurus ning kromosoovide arvud on erinevad isegi protokloonide vahel (1999). Liikide tuvastamisel on kasutatud nii morfoloogiat kui ka DNA analüüsi (Kumala 2012). See näitab, et määramisel on hea kasutada kombineeritud metoodikat, et vältida vigu.

ITS regiooni peetakse seentel universaalseks markeriks (Schoch *et al.* 2011). Seene liike määratakse tänapäeval põhiliselt ITS regiooni sekveneerimisega, kuid uuringuid on tõestanud, et see varieerub ning on siiski väike osa DNA järjestusest (Nilsson *et al.* 2008). Kogu genoomi sekveneerimine on kallis ning seetõttu kasutatakse enamasti ainult ITS regiooni, aga probleemsete liikide puhul oleks siiski sobilik erinevaid metoodikaid kombineerida või enne sekveneerimist genoomi suurus määratleda odavamate vahenditega. Kogu genoomi sekveneerimine on kulukas, kuid teenust pakutakse mitmete ettevõtete poolt (Science Exchange 2016). Liike uuritakse ja võrreldakse mitmete metoodikatega ning raskesti eristatavate seeneliikide puhul kasutatakse ristumiskatseid. Leiti, et *P. citrinopileatus* ja *P. cornucopiae* vahel on ristumissobimatus (Petersen ja Hughes 1992). Nende testidega tõestatakse väga sarnaste liikide erinevust (Burnett 2003:247).

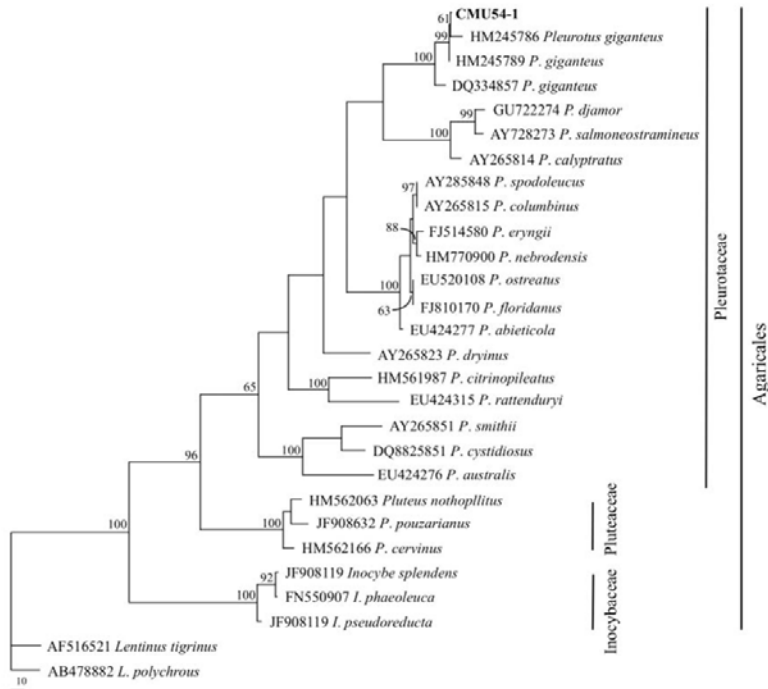
Euroopast ja Põhja-Ameerikast pärinev austerservik (*Pleurotus ostreatus*) on välimuselt kopservikust (*P. Pulmonarius*) eristamatu. Geograafilise erinevuse tõttu tekivad paljunemisbarjäärid, kuid kultuuris on võimalik neid omavahel ristata, mis viitab sellele, et geneetika on sama (Petersen ja Hughes 1992). Kopservik (*P. Pulmonarius*) ja austerservik (*P. Ostreatus*) vahel kokkukasvamist kultuuris ei toimi (Petersen ja Hughes 1992). Samas on Kullman *et al.* järgi mõõdetud austerservikul mitmete metoodikatega genoomi suurus ning on saadud erinevaid tulemusi (2005). Vaja on metoodikat, mis võimaldaks tuumi eostest väljutada, et genoomi suurus täpsemalt mõõta. Erinevate metoodikate võrdlemine võimaldab tulemusi täiendavalt analüüsida ja selgitada kas tulemuste erinevused on tingitud mõõtmisvigadest (näiteks autofluorestsentsi olemasolust) või on genoomis suurus tõesti nii varieeruv.

Kirjanduse põhjal on loorservik (*P. dryinus*) liigiga *P. levis* morfoloogiliselt sarnased. Seetõttu sobiks eristamiseks molekulaarsed analüüsid. Ökoloogiliselt on loorservik saprotroofne ning levinud Põhja-Ameerikas (Kuo 2009). Eestis leidub loorservikut Järvelja looduskaitsekvartalil ning on lisatud Järvelja kaitsealuse põlismetsa seenestiku nimekirja ning liiki on vaadeldud Erast Parmasto poolt Antsla vallas Kuldres (eElurikkuse andmebaas). Loorservik kasvab üksi või grupiti ning eelistab substraadina kõvalehtpuud. Ökoloogiliselt saprotroofne ning levinud Põhja-Ameerikas (Kuo 2009). Eestis leidub loorservikut Järvelja looduskaitsekvartalil ning on lisatud Järvelja kaitsealuse põlismetsa seenestiku nimekirja ning seega võib vajada uurimist, et tagada vajalik kaitse (eElurikkuse andmebaas).

Perekond serviku eoseid on väga põhjalikult uurinud Oswald Hilber (1982). Autor on välja toonud liikide keskmised eoste pikkuse ja laiuse suhted ehk Q . Kopserviku (*P. Pulmonarius*) keskmine Q on 2,53 μm , austerserviku (*P. ostreatus*) 2,71 μm , rõngasservik (*P. calyptratus*) 2,54 μm , kuldservik (*P. citrinopileatus*) 2,43 μm , loorservik (*P. dryinus*) 2,95 μm

Eosjalg on loorserevikul Michael Kuo järgi valge ning keemiline reaktsioon KOH-iga on negatiivne (2009). Välja on toodud ka eoste suurused, mis on elliptilised ning suuruselt 9-15 x 3,5-5 μm (Kuo 2009). Seega on eoste pikkuse ja laiuse suhe üsna suur, mida tuleb arvestada mõõtmisel.

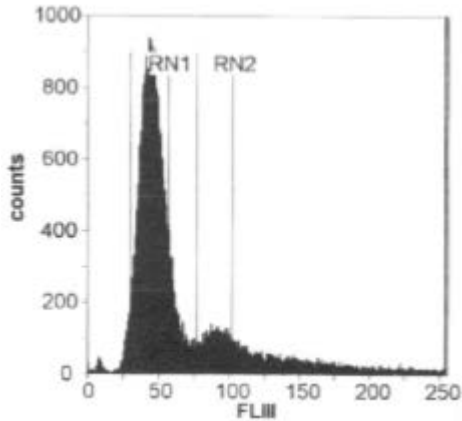
Käesolevas uuringus kasutatud liikide paiknevus Kumala *et al.* (2013) poolt avaldatud fülogeneesipuul on esitataud joonisel 4 (*P. citrinopileatus* *P. dryinus* *P. ostreatus* ja *P. eryngii* ja *P. calyptratus* (2013).



Joonis 4. Perekond servik (*Pleurotus*) mõningate liikide fülogeneesiupuu (Kumla 2013)

1.5. Raku(tuuma)tsükkel

Rakutsükkel võib esineda ka seente eostes olevates tuumades ja seega mõjutada mõõtmistulemusi. Seetõttu on toodud kirjanduse ülevaade antud teemast. Alljärgnevalt on toodud illustreeriv joonis rakutsüklist.

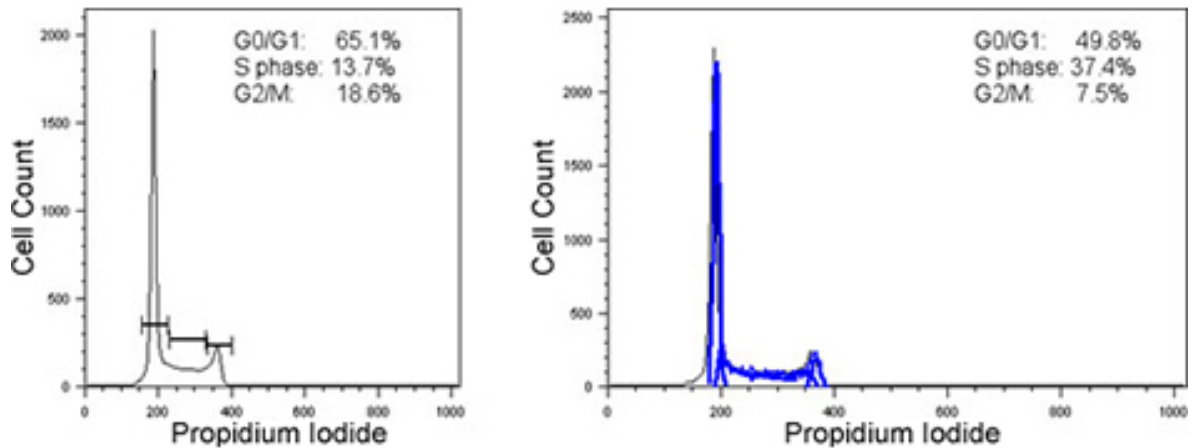


Joonis 5. DNA sisalduse sagedusdiagramm (*T. hemisphaerioides*), kus enamus eoseid on G1 faasis (Kullman 2000).

Märkus. Suhe $RN2/RN1=2.0$

Genoomi suuruse määramiseks on vajalik mõõta G1 faasis olevaid eoseid (Tavares *et al.* 2014). Selles faasis ei ole tuumad replitseerunud ning saadav tuumas DNA sisaldus vastab genoomi suurusele. Seetõttu on andmete analüüsimine väga oluline ning samuti mõõdetud tuumade/eoste arv, et tuumatsükkel oleks graafikul nähtav. Juhul kui tuumatsükkel kogu eosproovi mõõtmisel ei avaldu - ei tuuma, eose üldsuuruses ega üldfluoresentsis, ei pruugi kätte saada ka genoomi suurust. Proovis võib eoseid olla erinevas tuumatsükli faasis ning selle väljaselgitamine on oluline, et teha mõõtmist volutsütomeetriga.

Genoomi suuruse määramisel tuleb kasutada G1 faasis olevaid eoseid/ tuumi. S-faasis olevad rakud sisaldavad rohkem DNA-d ning seetõttu on fluoresents kõrgem kui G1 faasis ning G2 faasis on fluorokroomiga värvitud tuumade fluoresents topelt võrreldes G1 faasiga (Kullman 2000, Davies 2016) seenel. Jooniselt 2 on näha rakutsükli kui rakud on värvitud propiidiumiodiidiga.



Joonis 6. Rakutsükkel värvituna propiidiumiodiidiga (Davies 2016).

Märkus. Sinine värv on toodud joonisel märkimaks propiidiumiodiidiga paremini väljatulevat rakutsükli

1.6. Autofluoresents

Eosproovide autofluoresents (AF) esinemist on märgatud FC mõõtmise käigus kuid seda pole siiani täpselt uuritud. Selle tähtsus seene eoste ja seentele pole selge ja ka see, mis AF täpsemalt põhjutab ei ole selge. AF rakendamise kohta seente eoste määramisel leidub vähe andmeid. Raghavachari (*et al.* 2003) järgi on autofluoresents põhjustatud konjugeeritud sidemetest elektronide vahel orgaanilises molekulis. On leitud, et nii elusad kui surnud rakud autofluoresseeruvad sinise valgusega mõjutamisel (Dreyer ja Morte 2009). Samuti ei ole teada, mis ained autofluoresentsi põhjustavad, aga ilmselt paikneb see eose kestas (*Ibid*).

Fluoresents tekitab meditsiinilises valdkonnas analüüside tegemisel probleeme. Genoomi suuruse mõõtmisel on oluline proovis olev autofluoresents eemaldada, et DNA sisaldust õigesti määrata ning selle eemaldamiseks soovitatakse keemilist töötlemist (Raghavachari *et al.* 2003). Töötamise käigus võib eos või tuum omadusi muuta ning fluoresents ei pruugi täielikult kaduda. Samas on leitud, et seente eoste uurimisel võib olla autofluoresentsist kasu, et määrata eoseid mingis piirkonnas (Dreyer ja Morte 2009).

Arktiliste seente eostel uuriti kunstlikult suurendatud UV kiirguse mõju ning saadi tulemuseks, et emmisiooni maksimumid jäid 345, 430 ja 510 nm. Selgus, et UV kiirgus mõjutab pigmentide imendumist suurendatud UV-ga eostes (Arcangeli *et al* 1997). Autofluoresents võib olla eostele tähtis, sest kaitseb UV kiirguse eest (Arcangeli *et al* 1997). Seega võiks eeldada, et kõrgema UV- kiirguse piirkonnas geograafiliselt võib olla seente eoste autofluoresents valdavalt kõrgem. Samas selle tuvastamine on keeruline.

On leitud, et seentel ja bakteritel on erinev fluoresents ning seetõttu saaks õhus leiduvaid seente eoseid ning baktereid eristada (Saari *et al* 2013). Erinev fluoresents võib abiks tulla ka voolutsütomeetria kasutades, sest nii saaks eristada seente eoseid ja võimalikke baktereid. Eoste suuruse järgi grupeerimisel võib voolutsütomeetrias olla autofluoresents kasulik (Dreyer *et al.* 2006, 2009).

2.MATERJAL JA METOODIKA

2.1. Materjal

2.1.1. Valitud seenegrupid

Töös kasutati perekond taelik (*Phellinus*) ja servik (*Pleurotus*) esindajaid, et mõõta eoste ja genoomi suurust. Eosproovid pärinevad Eesti Maaülikooli Põllumajandus- ja keskkonnainstituudi mükoloogia osakonna fungaariumist. Eosproovid on kogutud erinevatest geograafilistest piirkondadest Põhja-Euraasias, peamiselt endistele Nõukogude Liidu aladelt.

Tabel 1. Kasutatud eosproovid perekonnast taelik (*Phellinus*)

Sporoteegi nr.	liik	Substraat	Asukoht
151918	<i>P. igniarius</i>	<i>Betula pendula</i>	Eesti
151909	<i>P. igniarius</i>	<i>Betula pendula</i>	Eesti
K87	<i>P. igniarius</i>	<i>Betula pendula</i>	Eesti
15191	<i>P. igniarius</i>	<i>Betula pendula</i>	Eesti
K77	<i>P. igniarius</i>	<i>Betula verucosa</i>	Kardla, Eesti
K110	<i>P. igniarius</i>	<i>Betula verucosa</i>	Kardla, Eesti
P10	<i>P. igniarius</i>	<i>Betula verucosa</i> (lamav puit)	Puurmani (Iodumets)
115	<i>P. igniarius</i>	<i>Betula pubescens</i> ssp. <i>Tortuosa</i>	Polaar-Uraal
102	<i>P. igniarius</i>	<i>Betula pubescens</i> ssp. <i>Tortuosa</i>	Polaar-Uraal
110	<i>P. igniarius</i>	<i>Betula pubescens</i> ssp. <i>Tortuosa</i>	Polaar-Uraal
108	<i>P. igniarius</i>	<i>Betula pubescens</i> ssp. <i>Tortuosa</i>	Polaar-Uraal

128	<i>P. igniarius</i>	<i>Alnus fruticosa</i> (elus)	Polaar-Uraal
126	<i>P. igniarius</i>	<i>Alnus fruticosa</i> (elus)	Polaar-Uraal
118	<i>P. igniarius</i>	<i>Alnus fruticosa</i> (elus)	Polaar-Uraal
117	<i>P. igniarius</i>	<i>Alnus fruticosa</i> (elus)	Polaar-Uraal
125	<i>P. igniarius</i>	<i>Alnus fruticosa</i> (elus)	Polaar-Uraal
127	<i>P. igniarius</i>	<i>Alnus fruticosa</i> (elus)	Polaar-Uraal
124	<i>P. igniarius</i>	<i>Alnus fruticosa</i> (elus)	Polaar-Uraal
119	<i>P. igniarius</i>	<i>Alnus fruticosa</i> (elus)	Polaar-Uraal
P58	<i>P. igniarius</i>	<i>Alnus fruticosa</i>	Polaar-Uraal
P22	<i>P. igniarius</i>	<i>Alnus glutinosa</i> (elus)	Puurmani
K86	<i>P. igniarius</i>	<i>Alnus incana</i>	Kandla
Ko18	<i>P. igniarius</i>	<i>Salix fragilis</i>	Kolomõja
Ko19	<i>P. igniarius</i>	<i>Salix fragilis</i>	Kolomõja
Ko20	<i>P. igniarius</i>	<i>Salix fragilis</i>	Kolomõja
K85	<i>P. igniarius</i>	<i>Salix caprea</i>	Kandla
56-1	<i>P. igniarius</i>	<i>Salix caprea</i>	Jõgevamaa, Puurmani
56-2	<i>P. igniarius</i>	<i>Salix caprea</i> (lamav tüvi)	Jõgevamaa, Puurmani
325	<i>P. igniarius</i>	<i>Salix caprea</i> (elus tüvi)	Jõgevamaa, Puurmani
313	<i>P. igniarius</i>	<i>Salix caprea</i> (elus tüvi)	Jõgevamaa, Puurmani
E37	<i>P. igniarius</i>	<i>Salix caprea</i>	-
E39	<i>P. igniarius</i>	<i>Salix caprea</i>	-
E38	<i>P. igniarius</i>	<i>Salix caprea</i>	-
E9	<i>P. igniarius</i>	<i>Salix caprea</i>	-
125904	<i>P. igniarius</i>	<i>Juglans</i>	Habarovsk
125905	<i>P. igniarius</i>	<i>Juglans</i>	Habarovsk
104849	<i>P. igniarius</i>	<i>Juglans</i>	Habarovsk
76-3	<i>P. igniarius</i>	<i>Juglans</i>	Suputirka
76-4	<i>P. igniarius</i>	<i>Juglans</i>	Suputirka?
76-5	<i>P. igniarius</i>	<i>Juglans</i>	Suputirka
76-9	<i>P. igniarius</i>	<i>Juglans</i>	Suputirka
PHIQ-19	<i>P. igniarius</i>	<i>Quercus petracea</i>	Bel. Puštša
157	<i>P. igniarius</i>	<i>Quercus petracea</i>	Bel. Puštša
165	<i>P. igniarius</i>	<i>Quercus petracea</i>	Bel. Puštša
PHIQ-2	<i>P. igniarius</i>	<i>Quercus petracea</i>	Bel. Puštša
16	<i>P. igniarius</i>	<i>Quercus petracea</i>	Bel. Puštša
PHIQ1	<i>P. igniarius</i>	<i>Quercus</i>	-
Ko13	<i>P. igniarius</i>	<i>Malus domestica</i>	Kolomõ
Ko12	<i>P. igniarius</i>	<i>Malus domestica</i>	Kolomõ
Ko11	<i>P. igniarius</i>	<i>Malus domestica</i>	Kolomõ

PN3	<i>P. nigricans</i>	-	Habarovsk Terr.
PN1	<i>P. nigricans</i>	-	Habarovski krai
PJ1	<i>P. nigricans</i>	<i>Juglans</i>	Habarovsk Terr.
PN-2	<i>P. nigricans</i>	<i>Populus tremula</i>	Sihhote-Alin
13	<i>P. pini</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	Valgamaa,Hargla
14	<i>P. pini</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	Valgamaa,Hargla
15	<i>P. pini</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	Valgamaa,Hargla
12	<i>P. pini</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	Valgamaa,Hargla
4	<i>P. pini</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	Valgamaa,Hargla
5	<i>P. pini</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	Valgamaa,Hargla
6	<i>P. pini</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	Valgamaa,Hargla
18	<i>P. pini</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	Valgamaa,Hargla
19	<i>P. pini</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	Valgamaa,Hargla
22	<i>P. pini</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	Valgamaa,Hargla
23	<i>P. pini</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	Valgamaa,Hargla
310	<i>P. alni</i>	<i>Alnus incana</i> (elus)	Jõgevamaa,Levala
309	<i>P. alni</i>	<i>Alnus incana</i> (elus)	Jõgevamaa,Levala
101	<i>P. alni</i>	<i>Alnus incana</i>	Tartumaa, Valgemetsa
104	<i>P. alni</i>	<i>Alnus incana</i>	Tartumaa, Valgemetsa
107	<i>P. alni</i>	<i>Alnus incana</i> (elus)	Tartumaa, Valgemetsa
332	<i>P. alni</i>	<i>Alnus incana</i>	Jõgevamaa,Levala
327	<i>P. alni</i>	<i>Corylus Avellana</i>	Levala
329	<i>P. alni</i>	<i>Corylus Avellana</i>	Levala
336	<i>P. alni</i>	<i>Corylus Avellana</i>	Pudu
151449	<i>P. alni</i>	<i>Corylus Avellana</i>	Sihhote-Alin
151450	<i>P. alni</i>	<i>Corylus Avellana</i>	Sihhote-Alin
151447	<i>P. alni</i>	<i>Corylus Avellana</i>	Sihhote-Alin
52519	<i>hartigii</i>	<i>Corylus Avellana</i>	Sihhote-Alin
52721	<i>P. hartigii</i>	<i>Corylus Avellana</i>	Sihhote-Alin
150121	<i>P. hartigii</i>	<i>Corylus Avellana</i>	Sihhote-Alin
52717	<i>P. hartigii</i>	<i>Corylus Avellana</i>	Sihhote-Alin
K58	<i>P.populicola</i>	<i>Populus tremula</i>	Kardla
Nr3 26.06.81	<i>P.populicola</i>	<i>pop tremula</i>	Järvelja
Nr4PPo-2	<i>P.populicola</i>	<i>Populus sp</i>	Järvelja
322	<i>P.populicola</i>	<i>Pupulus tremula</i> (lamav tüvi)	Jõgevamaa
151959	<i>P.populicola</i>	<i>Populus sp</i>	Eesti
PPO-1	<i>P.populicola</i>	<i>Populus sp</i>	Eesti
870	<i>P.populicola</i>	<i>Populus tremula</i> (elus)	Belowiža Puštša

11-24.9.69	<i>P.populicola</i>	<i>Populus tremula</i>	Belowiža Puštša
103968	<i>P.chrysoloma</i>	<i>Pinus koraiensis</i>	Ussuurimaa, Primorje
59627	<i>P.chrysoloma</i>	<i>Pinus koraiensis</i>	Ussuurimaa, Primorje
102611	<i>P.chrysoloma</i>	<i>Larix dahurica</i>	Sihhote -Alin
102713	<i>P.chrysoloma</i>	<i>Larix dahurica</i>	Sihhote-Alin
52764	<i>P.chrysoloma</i>	<i>Larix ochotensis</i>	Sihhote-Alin
52751	<i>P.chrysoloma</i>	<i>Larix sp.</i>	Sihhote-alin
151482	<i>P.chrysoloma</i>	<i>Larix sp.</i>	Sihhote-Alin
151400	<i>P.chrysoloma</i>	<i>Larix sp.</i>	Sihhote-Alin
97207	<i>P. punctatus</i>	<i>Tilia sp</i> (elus tüvi)	Raadi
97203	<i>P. punctatus</i>	<i>Tilia sp</i>	Raadi
152336	<i>P. punctatus</i>	-	Eesti, Raadi
51824	<i>P. punctatus</i>	<i>Quercus mongolica</i>	Sihhote-Alin
52823	<i>P. punctatus</i>	<i>Quercus mongolica</i>	Sihhote-Alin

Tabel 2. Kasutatud eosproovid perekonnast servik (*Pleurotus*)

Sporoteegi number	Liik	Substraat	Asukoht
157719	<i>P. dryinus</i>	-	-
147333	<i>P. dryinus</i>	-	-
157981	<i>P. dryinus</i>	-	-
157732	<i>P. dryinus</i>	-	-
157982	<i>P. dryinus</i>	-	-
107451	<i>P. citrinopileatus</i>	-	Primorgi
107542	<i>P. citrinopileatus</i>	-	Primorgi
107503	<i>P. citrinopileatus</i>	-	Primorgi
107665	<i>P. citrinopileatus</i>	-	Primorgi
107666	<i>P. citrinopileatus</i>	-	Primorgi
107472	<i>P. citrinopileatus</i>	-	Primorgi
107664	<i>P. citrinopileatus</i>	-	Primorgi
178231	<i>P. pulmonarius</i>	-	Järvselja
179857	<i>P. pulmonarius</i>	-	Võrtsjärve aas
106162	<i>P. pulmonarius</i>	-	Kedr. Padj.

107504	<i>P. pulmonarius</i>	-	Primorgi
93854	<i>P. pulmonarius</i>	-	-
157788	<i>P. pulmonarius</i>	-	-
93854	<i>P. pulmonarius</i>	-	-
179795	<i>P. pulmonarius</i>	-	-
179250	<i>P. pulmonarius</i>	-	-
9135	<i>P. ostreatus</i>	Populus tremula	Nigula LKA
107777	<i>P. ostreatus</i>	-	Eesti
151033	<i>P. ostreatus</i>	-	N. Carolina
175016	<i>P. ostreatus</i>	-	-
159565	<i>P. ostreatus</i>	Pärna känd	Tartu, turu tn
151089	<i>P. ostreatus</i>	-	Carolina
125925	<i>P. ostreatus</i>	-	Primorgi
77603	<i>P. ostreatus</i>	Populus sp.	Raadi
150933	<i>P. ostreatus</i>	-	Sihhote-Alin
179856	<i>P. ostreatus</i>	-	Otepää
150066	<i>P. ostreatus</i>	-	Sihhote-Alin
126992	<i>P. ostreatus</i>	Salix sp	Tartumaa, Võsivere
PV 142824		-	-
PU 157761	<i>P. calyptratus</i>	-	-

Uuringus kasutati 102 taeliku (*Phellinus*) ning 34 serviku (*Pleurotus*) eosproovi eoste suuruse mõõtmiseks ja 16 serviku (*Pleurotus*) eosproovi tuumade DNA sisalduse ja suuruse mõõtmiseks.

2.2. Metoodika

2.2.1. Voolutsütomeeter ja eoste mõõtmine

Uuringus kasutati BD Accuri C6 voolutsütomeetrit (Lisa1). Tsütomeeter sisaldab kahte laserit, mis mõõdavad vastavalt punast 640 nm ja sinist lainepikkust 480 nm. Seadmel on neli optilist filtrit. Seade võimaldab mõõta nii osakeste suurust, kogust kui ka fluoresentsi (Cflow User Guide 2010).

Mõõtmisel tuleb arvestada, et optilised filtrid FL1 ja FL2 loevad sinist ning FL3 ja FL4 loevad punast emissiooni. Seade sisaldab nelja fluoresentsi detektorit, et mõõta fluorokroome: FITC, PE, PerCyP-Cy™ 5,5 ja APC. Töös kasutatud tsütomeetris on optilised filtrid seadistatud nii, et FL1 mõõdab valguse intensiivsust lainepikkusel 533/30 nm, FL2 585/40nm, FL3 610/20 nm ja FL4 675/25 nm vastavalt. Filter FL3 on seadistatud nii, et selle abil oleks võimalik mõõta propiidiumiodiidiga värvitud eose DNA sisaldust.

Kõige väiksem osake, mida tsütomeetriga mõõta saab on 0,5 µm, kõige suurem 40 µm ning proovi kohta üks maksimaalselt miljon osakest. Võimalik minimaalne osakese suurus annab eelduse selleks, et seente eoseid on võimalik mõõta, sest on teada, et kasutatud liikidel on eosed ja ka tuumad suuremad kui 0,5 µm. Laserite profiil on 10 korda 75 µm ning mõõtmisel on valguse tabamisel külghajumine $90^\circ \pm 13$ ja otsehajumine $0^\circ \pm 13$.

Uuringus kasutati valideerimiseks Spherotech 8-tipuga kerasid, et valideerida voolutsütomeetri FL1, FL2 ja FL3 kanaleid. Kasutatud kerad on spetsiaalselt väljatöötatud, et neid kasutada Accuri C6 tsütomeetriga mõõtmisel. Lisaks kasutati töös Spherotech 6-tipuga kerasid, et valideerida tsütomeetri FL4 kanalit. Etalonkerade suurus on 3,2 µm.

Tsütomeeter mõõdab suurusi suhtelistes ühikutes ning seega on vajalik kasutada etaloniks kerasid, mille kaudu saab määrata absoluutseid mõõtmeid. Töös arutati etalonkera pindala S

mikromeetrites ja kasutati seda tsütomeetriga saadud mõõtude ümberarvestamisel. Ümberarvutustes kasutades ellipsi pindala valemit $S_k = \pi \times a \times b$, kus S_k on etalonkerade pindala, a ja b on poolteljed.

Etalonkerade kaudu eose pindala arvestamine mikromeetritesse

$$Eoste S = \frac{Kera S \times eoste Sv}{Kera Sv}, \quad (2.2.1.1)$$

kus Eoste S on eose pindala μm^2 ;

Kera S- etalonkera μm^2 ;

Eoste Sv- eoste suhteline pindala mõõdetuna tsütomeetris sü;

Kera Sv- kera suhteline pindala mõõdetuna tsütomeetris sü.

Töös arvutati eoste ekvivalent raadius ja diameeter, mis saadi järgnevate valemitega tuletatuna pindalast.

$$Kesk_{de} = 2 \times \sqrt{\frac{Sv}{\pi}}, \quad (2.2.1.2)$$

kus $Kesk_{de}$ on eose ekvivalent diameeter μm ;

Sv- eose varjupindala/ eose koefitsiendiga parandatud pindala μm .

$$Kesk_r = \sqrt{\frac{Sv}{\pi}}, \quad (2.2.1.3)$$

kus $Kesk_r$ on eose ekvivalent raadius μm ;

Sv- eose varjupindala μm^2 .

Tuletati pikkused ja laiused, mis oleks ligilähedaselt võrreldavad mikroskoobiandmetega kasutades pikkuse ja laiuse suhet.

$$l = 2 \times \sqrt{\frac{S \times Q}{\pi}}, \quad (2.2.1.4)$$

kus l on eose pikkus;

S on pindala

Q on pikkuse ja laiuse suhe

Eoste ja tuumade ruumala arvutamisel lähtuti pindalast ning pikkuse ja laiuse suhtest Q . Tuletati valem:

$$V = \frac{3}{4} \times \pi \times \sqrt{\frac{Sv}{\pi}}^3 \times Q, \quad (2.2.1.5)$$

kus V on eose või tuuma ruumala;

Sv - eose varjupindala/ tuuma varjupindala μm^3 ;

Q – pikkuse ja laiuse suhe

Eoste mõõtmisel kasutati 1,5 mL suuruseid steriilseid mikrotsentrifuugtuube. Seeriaviisiliseks mõõtmiseks viidi esiteks kõik eosproovid tuubidesse. On teada, et erinevates lahustes eoste suurused muutuvad ning uuringu käigus tuleb selleg arvestada (Kullman *et al.* 2010). Puhastatud (0,001 μS) vesi lisati igale proovile vahetult enne mõõtmist, et tagada kõikidele samasugused mõõtmistingimused ning vältida eoste paisumist. Tsütomeeter suudab mõõta minimaalselt 50 μL suuruseid proove. Uuringus lisati proovidele puhastatud vett 400 μL . Oluline oli kasutada kõrge puhtusastmega vett, sest tsütomeeter mõõdab väikseid osakesi ning vees leiduv sade segab proovide mõõtmist.

Tsütomeeter võimaldab mõõta erinevatel kiirustel, kas aeglane, keskmine või kiire. Antud katses kasutati aeglast voolukiirust – 14 μL minutis, sest mida väiksemad osakesed, seda aeglasem peaks mõõtmisel voolukiirus olema (CFlow User Guide 2010).

2.2.2. Mõõtmiste võrreldavus teiste meetodikatega

Tsütomeeter saab mõõta osakese suurust laserkiire teele jääva osakese taha tekkiva varju suuruse kaudu. Saadav tulemus on eosproovi kekmine varjupindala. Juhul kui tahetakse eose pindala ning ruumala andmed saada võrreldavaks ka teiste meetodikatega, tuleb kasutada koostatud mudelit, mis arvestab millise nurga alt ja kuidas eos laserkiire eest möödub. Sellest oleneb, kuidas ja millisel küljel varjupindala mõõdetakse.

Töös kasutati Carl Kullmani poolt välja töötatud mudelit paranduskoefitsendi *Smik* saamiseks (avaldamata andmed 2015, autori nõusolekul, Lisa 4). Arvestatakse, et eosed on pöördellipsoidsed ning läbides laseri ette jäädas kiire juhusliku nurga all, tekitavad erineva suurusega varje, mida tsütomeeter mõõdab, ja seega vea eose suuruse mõõtmisel. Teades eoste pikkuse ja laiuse suhet Q arutati välja paranduskoefitsient *Smik*, mida kasutati, et saada tulemus täpsemaks.

Eose laseri ette jäämise võimalused erinevatel nurkadel on 90 kraadi sees. 90 kraadi jaotati külmekümneks sektoriks sammuga kolm ning arutati kui suurel osal sellest mõõdetakse eost kerana ja sellest tulenev viga (Lisa 4). Andmete analüüsimiseks kasutati BD Accuri C6 tarkvara ning programmi Microsoft Office Excel.

Eoste ja tuumade suhtelise suuruse ümberarvestamisel absoluutseteks kasutati etalonkerasid deameetriga 3,2 μm ning genoomi suurute määramiseks kasutati referndina austerserviku (*Pleurotus ostreatus*) TAAM 126992 eosproovi G1 faasis olevate tuumade DNA sisaldust 32 Mbp. (Kullman et al 2005, Fungal Genome size database).

2.2.3. Genoomi suuruse mõõtmine voolutsütomeetriga

Metoodika väljatöötamisel lähtuti varem tuumade värvimiseks eoste sees kasutatud metoodikast. Viimast modifitseeriti kuni saadi servikute eosproovidest kätte intaktseid tuumad, et mõõta nende suurust ja määrata DNA sisaldust. Põhilised alused saadi Kullman (2000) ning Kullman ja Greve (2007) artiklitest. Töö käigus taheti leida metoodika, mille abil eostest tuumad väljutada ning seejärel mõõta sisalduv DNA. Sarnast metoodikat on kasutanud ka Derek Davies oma töös rakkude DNA- määramisel (2016).

Genoomi suuruse arvutamiseks kasutati järgmist valemit, kus tuuma DNA sisaldus konverteeritakse fluorestsentsi intensiivsuse suhtelistest ühikutest (sü.) Mbp-deks kasutades referentseksemplari genoomi suurust Mbp-des

$$C = \frac{\text{Proovi G1 faasi FL}}{\text{Referendi G1 faasi FL}} \times \text{Referendi genoomi suurus}, \quad (2.2.3.1)$$

kus C on määratava proovi genoomi suurus Mbp;

Proovi G1 faasi FL – Määratava proovi G1-faasis olevate tuumade fluorestsents sü;

Referendi G1 faasi FL- Määratud eksemplari G1 faasis olev fluorestsents sü;

Referendi genoomi suurus ja määratud eksemplari genoomi suurus on Mbp.

Proovide mõõtmiseks kasutati 1,5 mL steriilseid eppendorfi tuube. Genoomi suuruse määramiseks kasutati eppendorfidesse eose suuruse mõõtmisest järele jäänud proove. Puhastatud vees 2 tundi seisnud proovidele lisati 96 kraadist piiritust saamaks 70 kraadine fiksaator, milles eoseid fikseeriti viis ööpäeva toatemperatuuril. Seejärel fuugiti proovi 10 000 rpm juures 10 minutit tsentrifuugiga *biofuge pico* firmalt Heraeus, et sadestada eosed tuubi põhja.

Eoseid pesti kaks korda lisades 1 mL puhastatud vett ning uuesti fuugades. Seejärel lisati eostele värskelt valmistatud pepsiin 0,5% pH 1,8 kus neid hoiti 30-35 minutit temperatuuril 40 °C juures. Homogeense suspensiooni saamiseks ja selleks, et ensüüm toimiks ühtlaselt

kõikidele eostele, pandi proovid soojendusega loksutisse firmalt *Biosan* TS-100, mis töötab 380 rpm kiirusega.

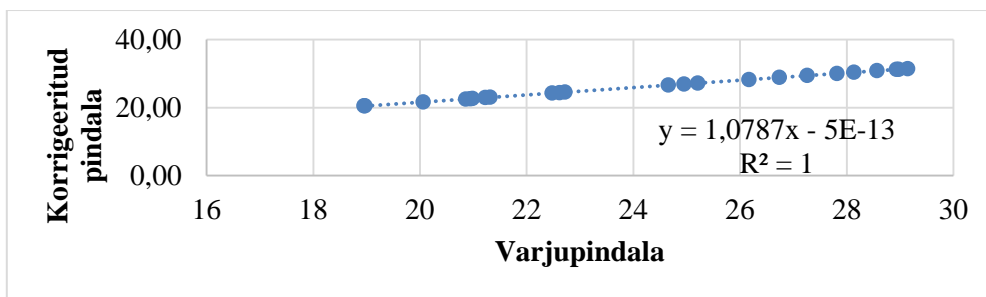
Pepsiinilahuses olnud eostele lisati puhastatud vesi aeglaselt, et ei tekiks keemiliselt liiga kiiret pH muutust. Neutraliseerimiseks pesti proovi kaks korda fuugides puhastatud veega kontrollides proovide pH'd selleks ettenähtud testribadega, et veenduda pH sobivuses RNase'le. Seejärel lisati sadestatud eostele 150 µl puhastatud vett ja 24 µl RNase lahust (10 mg/ml; Sigma-Alorich Chemical Co). Proovid asetati soojendusega loksutisse kahekümne neljaks tunniks 50 °C juures, kus loksuti töötab kiirusel 380 rpm. Seejärel tõsteti proovid lumega täidetud nõusse jahtuma ning lisati 800 µl fosfaat puhverdatud soolalahust (PBS, CSH Protocols 2006) ning seejärel jagati proovid kaheks.

Algsele proovituubile lisati 5 µl propiidiumiodiidi lahust (1 mg/ml; Sigma-Alorich Chemical Co), paralleelproov jäeti ilma värvita autofluorestsentsi mõõtmiseks ning viidi pimikusse lume peale üheks tunniks värvuma ja mõõtmiseks toodi proovid paarikaupa välja. Enne tsütomeetrisse asetamist segati proovi kergelt üles alla keerates ja tsütomeetri nõela all kergelt keerutades. Tuumad olid eostest välja tulnud ja liigne pipeteerimine oleks nad lõhkunud ning selline meetoodika sobis servikute (*Pleurotus*) genoomi suuruse mõõtmiseks. Seejärel kontrolliti proovides sisalduvat valgusmikroskoobi abil, et näha, kas on esineb värvunud eoseid ja kas tuumad on selgelt vabanenud.

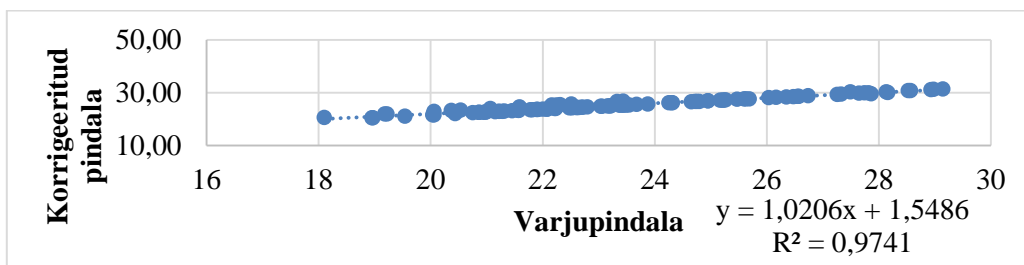
3.TULEMUSED

3.1. Mõõtmisandmete korrigeerimine (perekond *Phellinus*)

Voolutsütomeeter mõõdab eose varjupindala (vt. pt. Metoodika), seega oli tulemuste esitamisel tähtsus andmete analüüsimisel ja seejärel korrigeerimisel. Selgus, et juhul kui mõõta väikese pikkuse ja laiuse suhtega (Q) eoseid, siis andmete korrigeerimine ei anna paremat tulemust (Lisa 2). Juhul kui Q on 1,1-1,2 μ , siis on tsütomeetri andmed kasutatavad paranduseta (Joonis 7, 8, Lisa 4). Juhul kui tahetakse analüüsida koos mikroskoobis mõõdetud ja tsütomeetris mõõdetud andmeid peaks kasutama parandust.

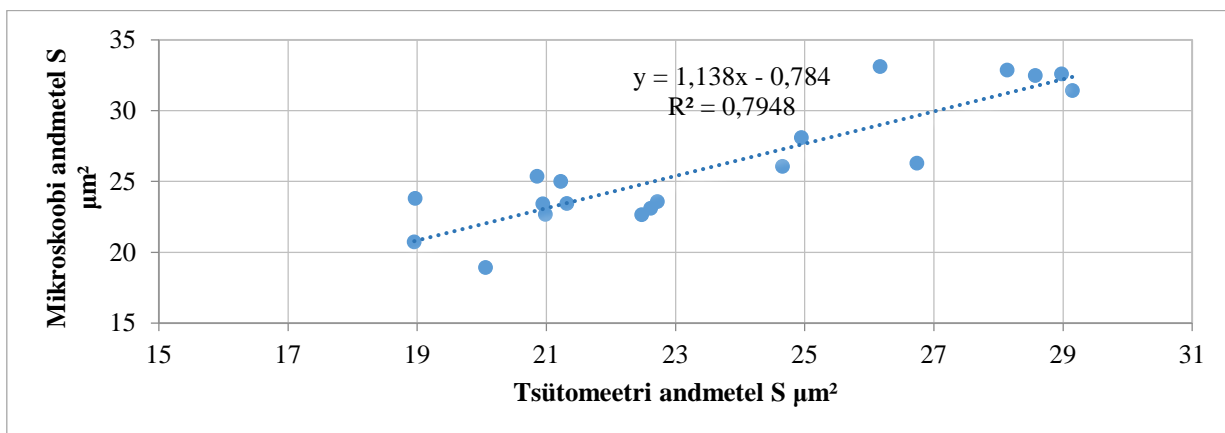


Joonis 7. Korrelatsioon varjupindala ja mikroskoobiandmete põhjal korrigeeritud pindala vahel

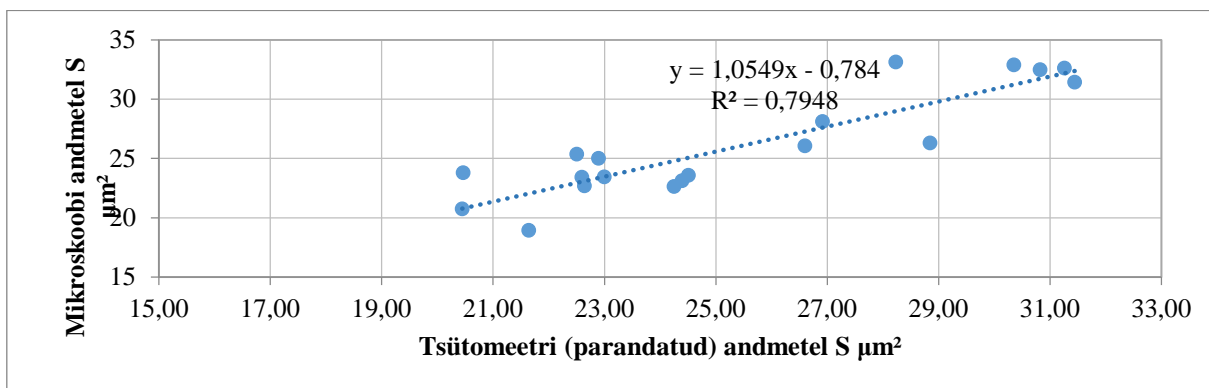


Joonis 8. Korrelatsioon varjupindala ja korrigeeritud pindala kasutades kirjanduspõhist Q vahel

Lineaarse korrelatsioonikordaja ruut ehk determinatsioonikordaja R^2 näitab, kui suure osa ühe tunnuse hajuvusest saab kirjeldada teise tunnuse kaudu. R^2 näitab veel ka seose rangust ning saadud valemi abil (Joonis 9 ja 10) on võimalik tsütomeetri pindalast prognoosida oletatav mikrokoobis saadav pindala.



Joonis 9. Korrelatsioon mikrokoobi ja tsütomeetri abil mõõdetud pindalade vahel



Joonis 10. Korrelatsioon mikrokoobi ja tsütomeetri parandatud pindala vahel

Joonistelt 3 ja 4 on näha, et kasutades parandamata või parandatud andmeid, tuleb determinatsioonikordaja sama. Prognoositavas väärtuses kasutades valemit, on erinevus. Jooniselt 1 on näha, et parandamata tsütomeetri andmetel on seos tugev, korrelatsioonikordajaga 0,89. Kasutades f-testi dispersioonide võrdlemiseks ja studentit t-testi,

ei saadud nullhüpeteesi kummutada, ehk andmete andmete erinevust ei tõendatud (Lisa 6). F-statistik ei ületanud kriitilist väärtust.

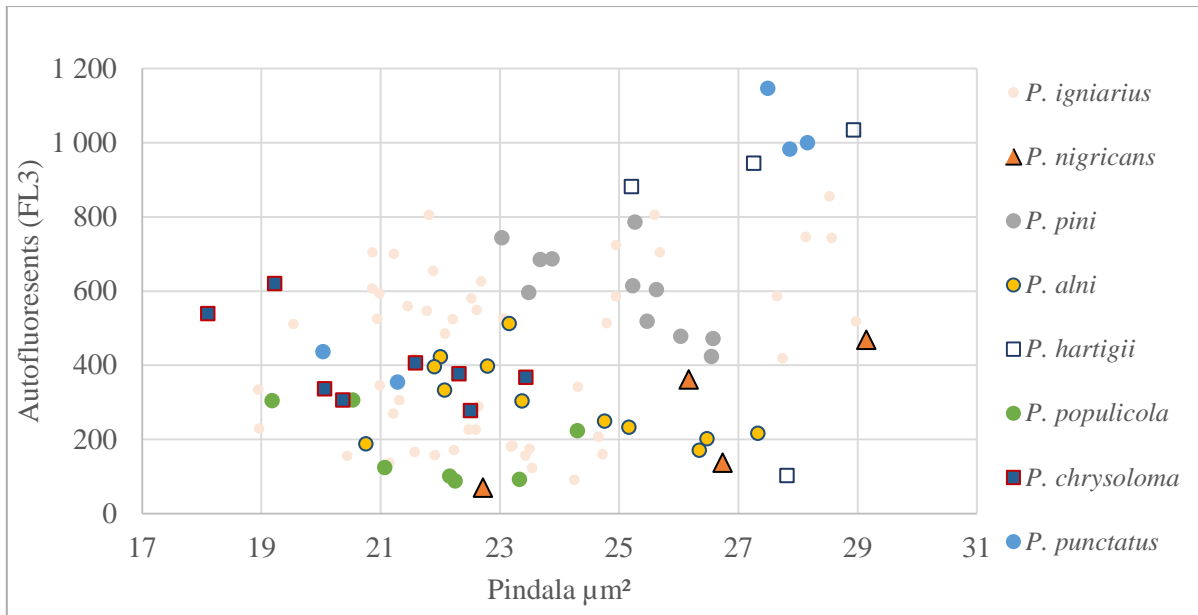
3.2. Tulemused perekonnas taelik (*Phellinus*)

Uuringu käigus mõõdeti 102 taelik (*Phellinus*) perekonna eosproovi ning leiti proovisisene ja liigisisene varieeruvus. Tabelist (3) on näha, et liigi variatsioonikoefitsient (Liigi CV % - ühe liigi eksemplarikeskmiste eosmõõtude varieeruvus) on valdavalt väiksem kui keskmine eksemplarisene variatsioonikoefitsient.

Tabel 3. Perekond taelik (*Phellinus*) empsemplari- ja liigisiseseid keskmised variatsioonikoefitsiendid voolutsütomeetri andmete alusel.

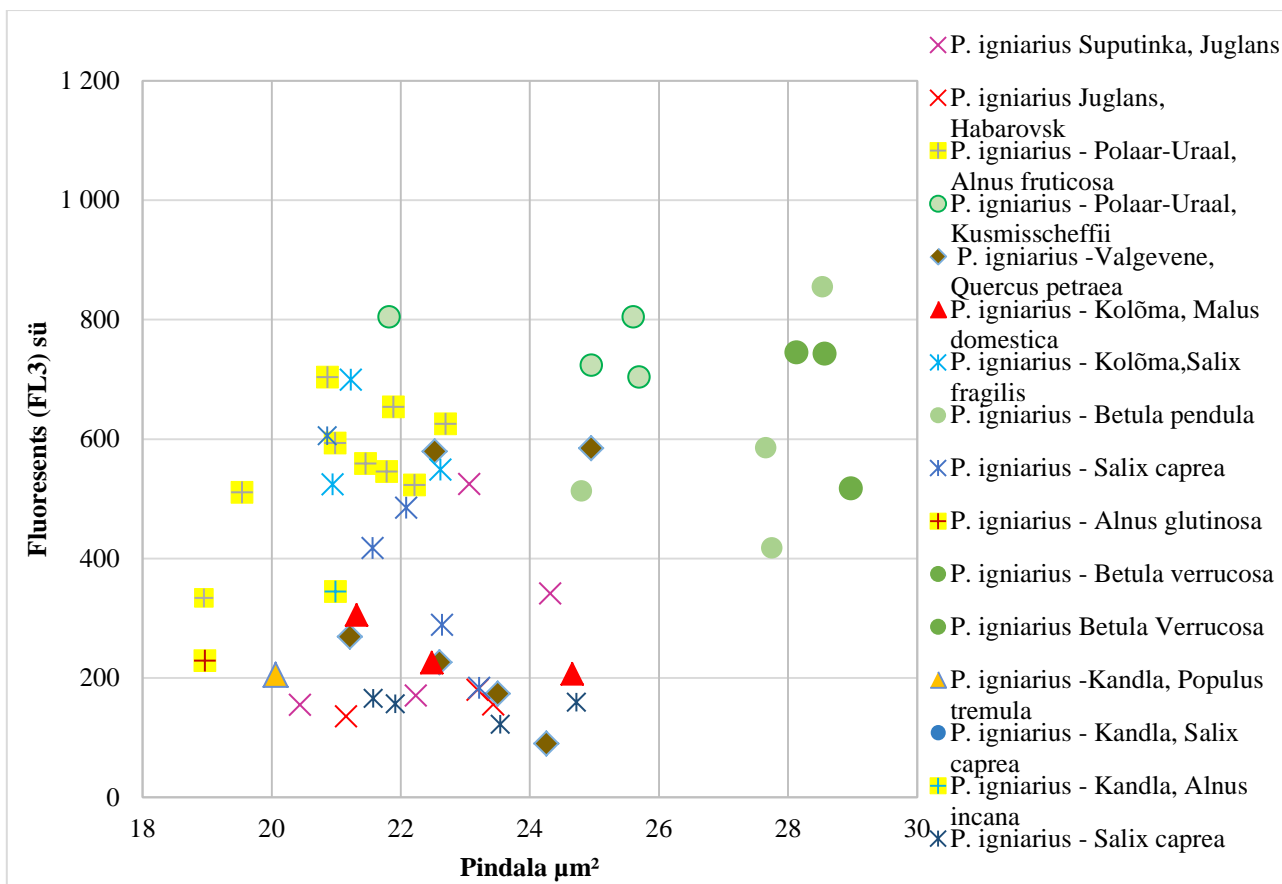
Liik/ Perekond	Proov N	Eosed N (proovis)	Liigi keskmine eose suurus μm^2	Keskmine eosesuuruste CV% liigi isenditel	Liigi eksemplari keskmiste eosesuuruste CV%
<i>Phellinus</i>	102	> 10 000	23.49	16	11
<i>Phellinus igniarius</i>	50	> 10 000	23.10	14	11
<i>Phellinus nigricans</i>	5	> 10 000	26.20	15	10
<i>Phellinus pini</i>	11	> 10 000	24.99	15	5
<i>Phellinus alni</i>	12	> 10 000	23.85	16	9
<i>Phellinus hartigii</i>	4	> 10 000	27.31	11	10
<i>Phellinus populicola</i>	8	> 10 000	21.61	20	8
<i>Phellinus chrysoloma</i>	8	> 10 000	20.95	19	9
<i>Phellinus punctatus</i>	5	> 10 000	24.97	23	16

Märkus. Eoste kogus N tähendab, et tsütomeeter oli seadistatud mõõtma vähemalt 10 000 osakest



Joonis 11. Perekond taelik (*Phellinus*) liikide eose suuruse ja autofluorestsentsi varieeruvus.

Joonisel on näidatud, et uuritud liikide eksemplarid moodustavad hajusaid grupe eoste autofluorestsentsi ja pindala alusel kusjuures liigi *P. igniarius* varieeruvus hõlmab peaaegu kogu ülejäänud liike. *P. igniarius* struktuuriühikud - grupid peremees perekondade ja ka peremeesliikide alusel - omavad kokku peaaegu sama suurt mahtu kui perekonna teised liigid kokku (Joonis 11). Joonisel 12 on näha, et eose autofluorestsentsi (mõõdetud optilise filtriga FL3) ja eose pindala alusel eristuvad liigi tuletaelik (*P. igniarius*) sees erinevad grupid vastavalt peremeestaimedele.

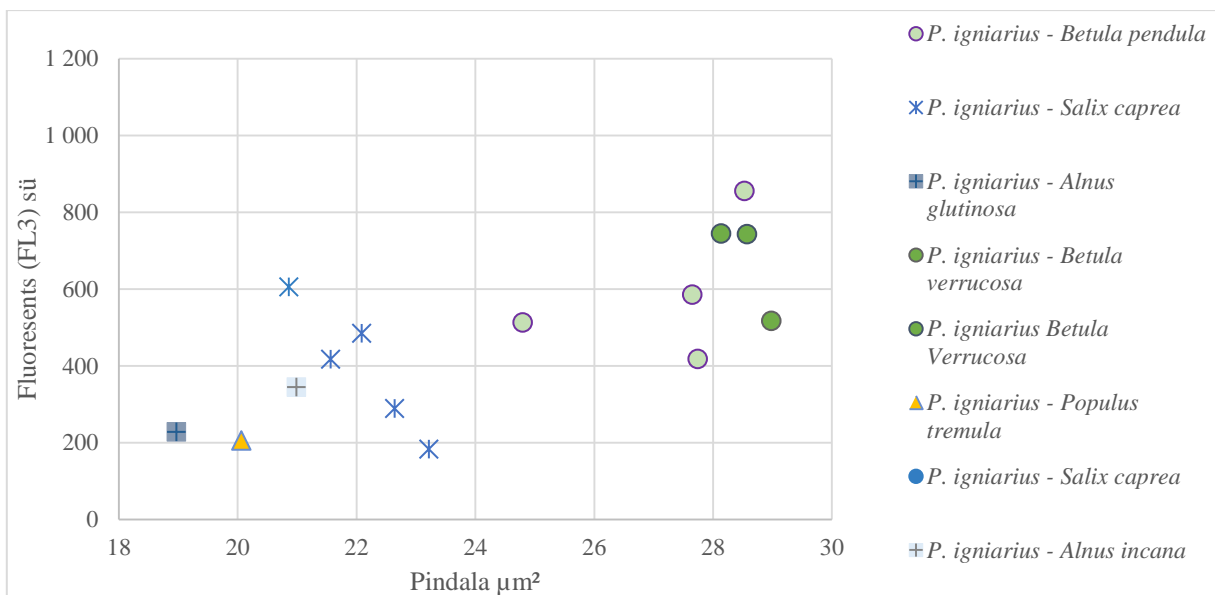


Joonis 12. *Phellinus igniarius* liigisisene struktuur vastavalt erinevatele peremeestaimede eose autofluorestsentsi ja eose suuruse alusel.

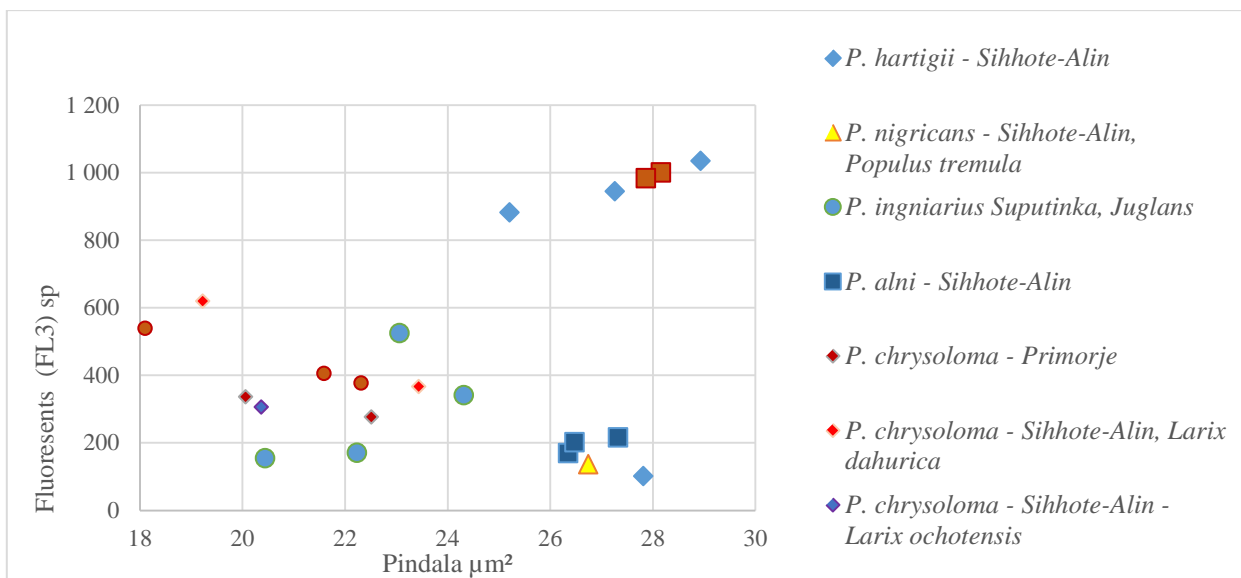
Lähedased liigid eristuvad tunnusruumis selgemalt kui analüüsida andmeid geograafiliste piirkondade kaupa eraldi (Joonis 12). Samas peremeestaimel järgi liigi sees eraldatud gruppide analüüsimisel on kasu just erinevate geograafiliste populatsioonide omavahelisest võrdlemisest. Juhul kui vaadelda joonist 12 ja joonist 13, siis on näha, et ainult Eesti materjali alusel (Joonis 13) kasel kasvavate *P. igniarius* eksemplaride hulgas on justkui üks grupit hälbinud eksemplar, aga kui lisada teiste piirkondade andmed, siis langeb ta mujal kaskedel kasvavate tuletäelikute eksemplaride poolt muudustuvasse gruppi, mille eose pindala jääb vahemikku 24-26 µm.

Joonistelt on näha, et valdavalt on ühel peremeestaimel kasvaval liigil kaks morfoloogiliselt erinevat populatsiooni. Antud juhul näib avalduvat selline „astmelisus“ peremees perekonna

kask erinevate liikude, *B. Kusmischeffii* ja arukask (*B. Pendula*), piires. Grupid tekivad nii fluoretsentsi kui ka pindala järgi.

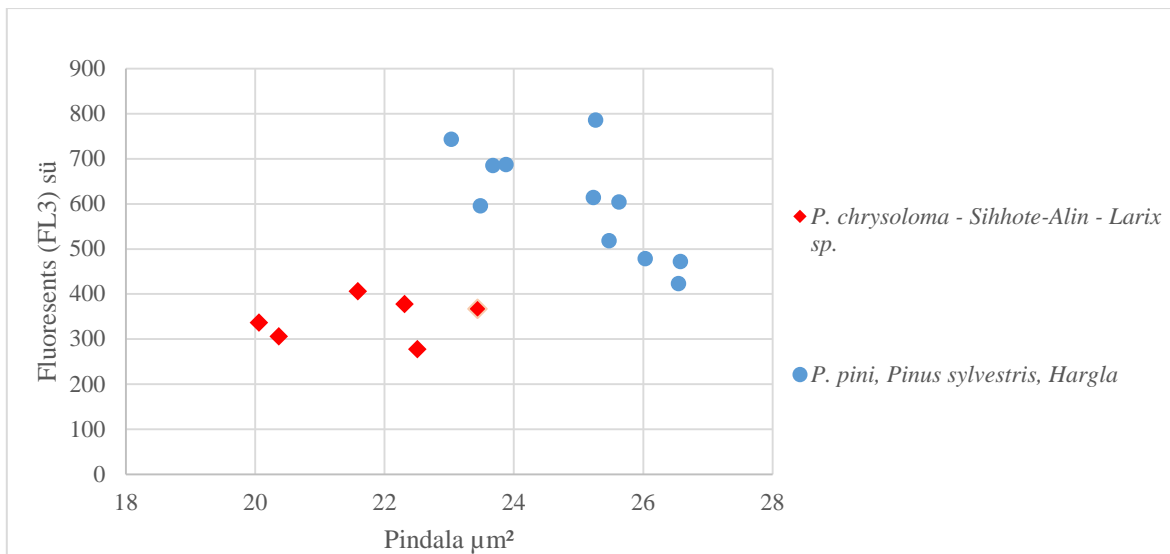


Joonis 13. *Phellinus igniarius* grupid Eestis peremeestaime alusel.



Joonis 14. Kaug-Ida perekonna *Phellinus* liikide eose suurus ja autofluorestsents

Eestis kasvavad ning erinevatel peremeestaimedel olevad grupid eristuvad ka väikest piirkonda kasutades. Selgus, et kasutades kaht tunnust, fluoretsentsi ja pindala koos, on võimalik eosproove grupeerida peremeestaimede alusel (Joonis 13). Samas täpset liiki ei saa ainult nende anmete abil määratleda ning lisaks tuleb kasutada teisi meetodikaid. Joonisel 14 moodustavad liigid *P. punctatus* ja *P. hartigii* liigid ühise grupi (*P. punctatus* on tähistatud punakspruuni nelinurgaga). On teada, et need liigid on kahekordse ploidsusastmega, mis tuleb joonisel esile.



Joonis 15. *Phellinus chrysoloma* ja *P. pini* eristuvad selgelt kasutades kahte tunnust autofluoretsentsi (FL3) ja pindala

Märkus. Liik *P.pini* proovid pärinevad Eestist ning *P. chrysoloma* proovid kohast Sihhote-Alin

Joonisel 15. on näha, et kasutades analüüsiks fluoretsentsi kanalis FL3 ja pindala FSC ilmneb kahe liigi vahelise piiri ehk hiatuse olemasolu. Tuleb arvestada ka, et liigid on kogutud erinevatest geograafilistest piirkondadest. Kui kasutada ainult suurust, siis need ei eristu. Sel viisil on võimalik ka õhuproovidest määrata allergiat põhjustavate seeneliikide olemasolu ja arvukust. Selleks on vaja eelnevalt neid liike iseloomustada vastavate parameetritega.

3.3. Tulemused perekonnas servik (*Pleurotus*)

3.3.1. Eoste suuruse mõõtmine

Kokku mõõdeti 40 serviku perekonna esindaja eosproovid ning arvatati eoste pindala kasutatades parandust (Lisa 4). F-testi tulemusena saadi teada, et parandatud ja parandamata eoste suuruste dispersioonid on erinevad ning sejärel kontrolliti andmeid võrdlemiseks veel Studenti t-testiga ning ka sellega saadi erinevus, mistõttu võrreldes andmeid mikroskoobiandmetega, tuleks vaadata parandatud andmeid (Lisa 7). Selgus, et parandamata kujul ei ole perekond serviku eossuurused isegi üldistatud kujul võrreldavad mikroskoobi andmetega.

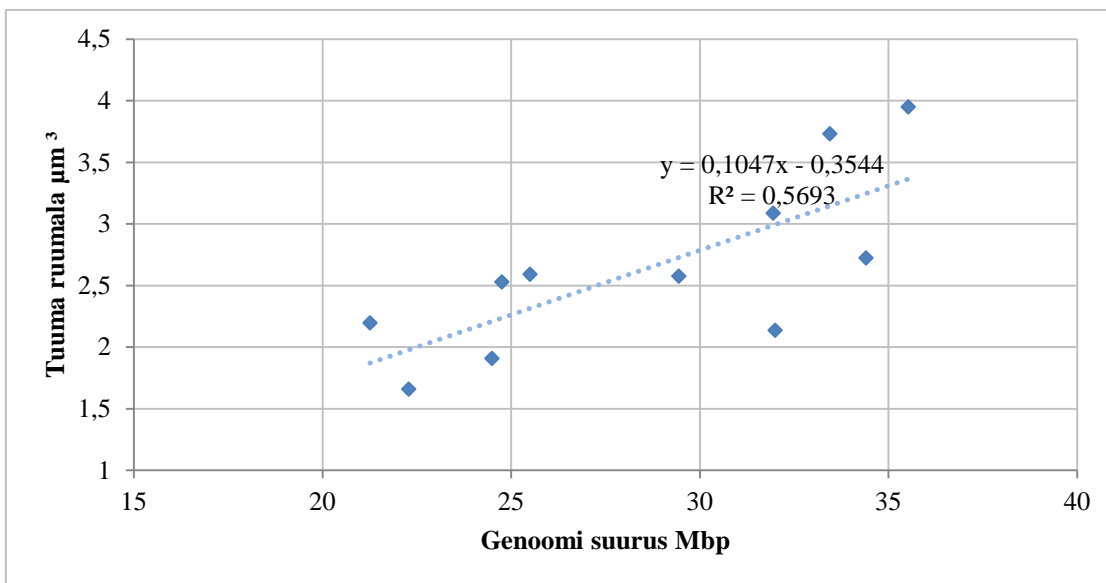
Tabel 4. Perekond servik (*Pleurotus*) eksemplari- ja liigisisesed keskmised

Liik/ Perekond	Proov N	Eosed N (proovis)	Liigi keskmine eose suurus μm^2	Keskmine eosesuuruste CV% liigi isenditel	Liigi eksemplarikeskmiste eosesuuruste CV %
<i>Pleurotus</i>	40	> 10 000	29,18	35	22
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	9	> 10 000	25,37	40	12
<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	8	> 10 000	23,12	38	17
<i>Pleurotus dryinus</i>	6	> 10 000	39,82	19	6
<i>Pleurotus ostreatus</i>	13	> 10 000	28,54	37	8
<i>Pleurotus eryngi</i>	2	> 10 000	38,05	43	9
<i>Pleurotus calyptratus</i>	2	> 10 000	34,06	28	0

Märkus. Eoste kogus N tähendab, et tsütomeeter oli seadistatud mõõtma vähemalt 10 000 osakest

3.3.2. Genoomi suuruse mõõtmised

Töötati välja meetodika, et mõõta genoomi suurust intaktsetest tuumadest. Se viisil mõõdeti liikidel austerservik(*Pleurotus ostreatus*) ja kopsservik(*P. pulmonarius*) tuumade suurused ning genoomi suurus kasutades propiidiumidiidi (Lisa 5).



Joonis 16. Tuuma ruumala sõltuvus genoomi suurusest G1-faasis

Märkus. Kasutatud on liikide austerservik ja kopsservik tuumade ruumala ja genoomi suurust

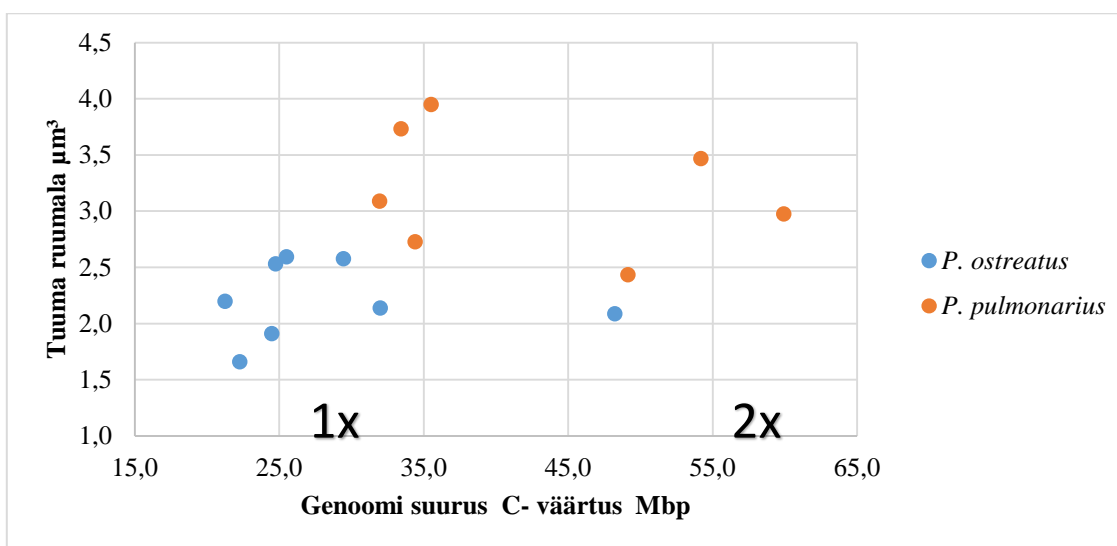
Jooniselt 16 on näha, et genoomi suurusel ja tuuma ruumalal on seos, kuid eose ja genoomi suuruse vahelist seost ei tuvastatud. Joonisel 16 on näha G1 faasis mõõdetud tuumade ja nende ruumala seos ning vastavad suurused on toodud tabelis 5. Alljärgnevas tabelis on näha mõõdetud proovidest tuumade ruumala, pindala ja genoomi suurus (Tabel 5). Joonisel 16 on näha G1 faasis mõõdetud tuumade ja nende ruumala seos.

Tabel 5. *Pleurotus ostreatus* ja *P. pulmonarius* genoomi suurused ja üldine DNA sisaldus

Tuuma DNA sisaldus*	Sporoteegi number	Tuuma DNA-sisaldus kui TAAM126992 C=32Mbp	Tuuma ruumala μm^3	Tuuma pindala
kogusisaldus	126992	52,4	4,1	3,1
G1		32,0	2,1	2,0
kogusisaldus	77603	35,1	3,7	2,9
G1		21,3	2,2	2,0
kogusisaldus	179856	59,6	3,5	2,8
G1		48,2	2,1	2,0
kogusisaldus	151089	29,8	2,9	2,4
G1		24,5	1,9	1,9
kogusisaldus	107777	49,3	7,2	3,9
tipp S-faas		54,4	4,2	3,2
kogusisaldus	175016	50,0	5,9	4,0
Sfaas domin		52,7	3,2	2,6
kogusisaldus	151033	34,2	4,6	3,3
G1		24,8	2,5	2,2
kogusisaldus	125925	35,7	4,9	3,5
G1		29,4	2,6	2,3
kogusisaldus	150066	31,5	4,7	3,4
G1		25,5	2,6	2,3
kogusisaldus	150933	30,1	3,8	2,9
G1		22,3	1,7	1,7
G1	179798	59,9	3,0	2,5
kogusisaldus		74,5	6,1	4,0
g1	106162	35,5	3,9	3,0

kogusisaldus	106162	34,2	5,4	3,7
g1	107504	33,4	3,7	2,9
kogusisaldus	107504	36,8	6,2	4,1
g1	179231	54,2	3,5	2,8
kogusisaldus	179231	62,7	3,8	4,1
g1	157788	34,4	2,7	2,4
kogusisaldus		35,6	4,0	3,0
g1	93854	32,0	3,1	2,6
kogusisaldus	93854	35,2	4,4	3,3

Märkus: G1 tähistab eosproovis G1 faasis olevate eoste tuumade DNA sisaldust ehk genoomi suurust; „kogu“ tähistab eosproovi kõikide eoste keskmist DNA sisaldust.

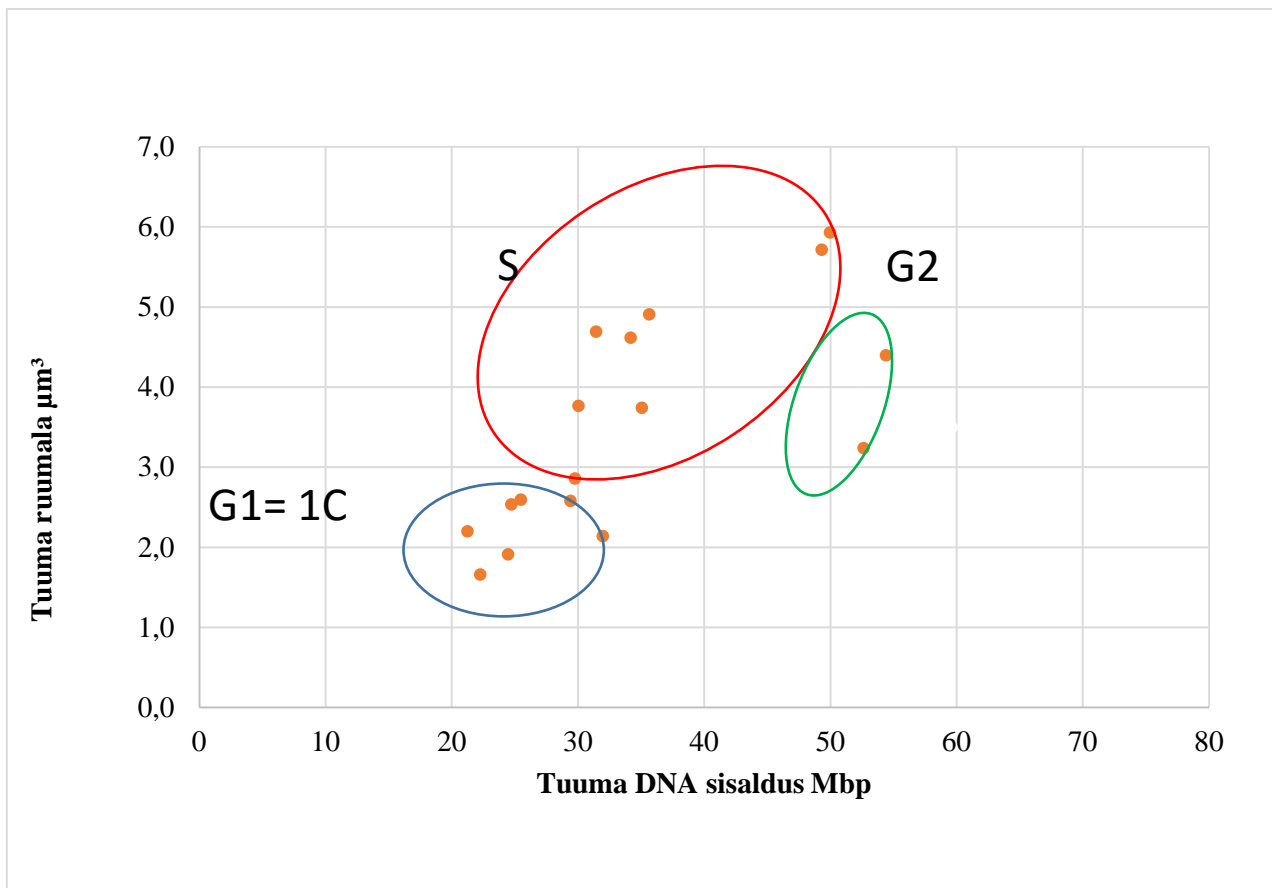


Joonis 17. Austerserviku (*P. ostreatus*) ja kopsserviku (*P. pulmonarius*) eksemplaride genoomi suurused

Märku. IC väärtused, mõõdetuna intaktsetest tuumadest näitavad, et mõlemad liigid on poliploidsed.

Liikide tuumade DNA sisaldus saadi kasutades referenti, millel oli suurus varem määratud. Kasutatud liik on proovi numbriga (TAAM 126992) ning genoomi suurus 32 Mbp (Kullman

et al 2005, korrigeeritud 2015) (Fungal Genome size database). Genoomi suurused saadi kasutades G1 faasis olevaid tuumi, arvestades tuumatsükli. Leiti, et tuumadel on autofluoresents ning pärast töötlemist uuringus kasutatud meetodikaga (vt pt. meetodika), peab proovid jagama kaheks, et autofluoresents tulemustest eemaldada. Joonisel 8. on näha ühekordse ja kahekordse ploidsusastmega tuumi. Mõlemad liigid on polüploidised kusjuures kopserviku (*P. pulmonarius*) ruumala on suurem.



Joonis 18. Austerserviku (*Pleurotus ostreatus*) ühes ja samas eosproovis võib esineda erinevaid tuumatsükli faase.

Leiti, et kontrollida tuleb, mis faasis on proovis olevad eosed, et mõõta G1 faasi, mis võrdub genoomi suurusega. Joonisel 18 on märgitud faasid vastavalt ning G1 faas on sinise joonega piiritletud all vasakus nurgas. Ilmnes, et proovides on eoseid nii G1, S kui ka G2 faasis ning töö käigus need eraldati ja kasutati ainult G1 faasi.

4. DISKUSSIOON

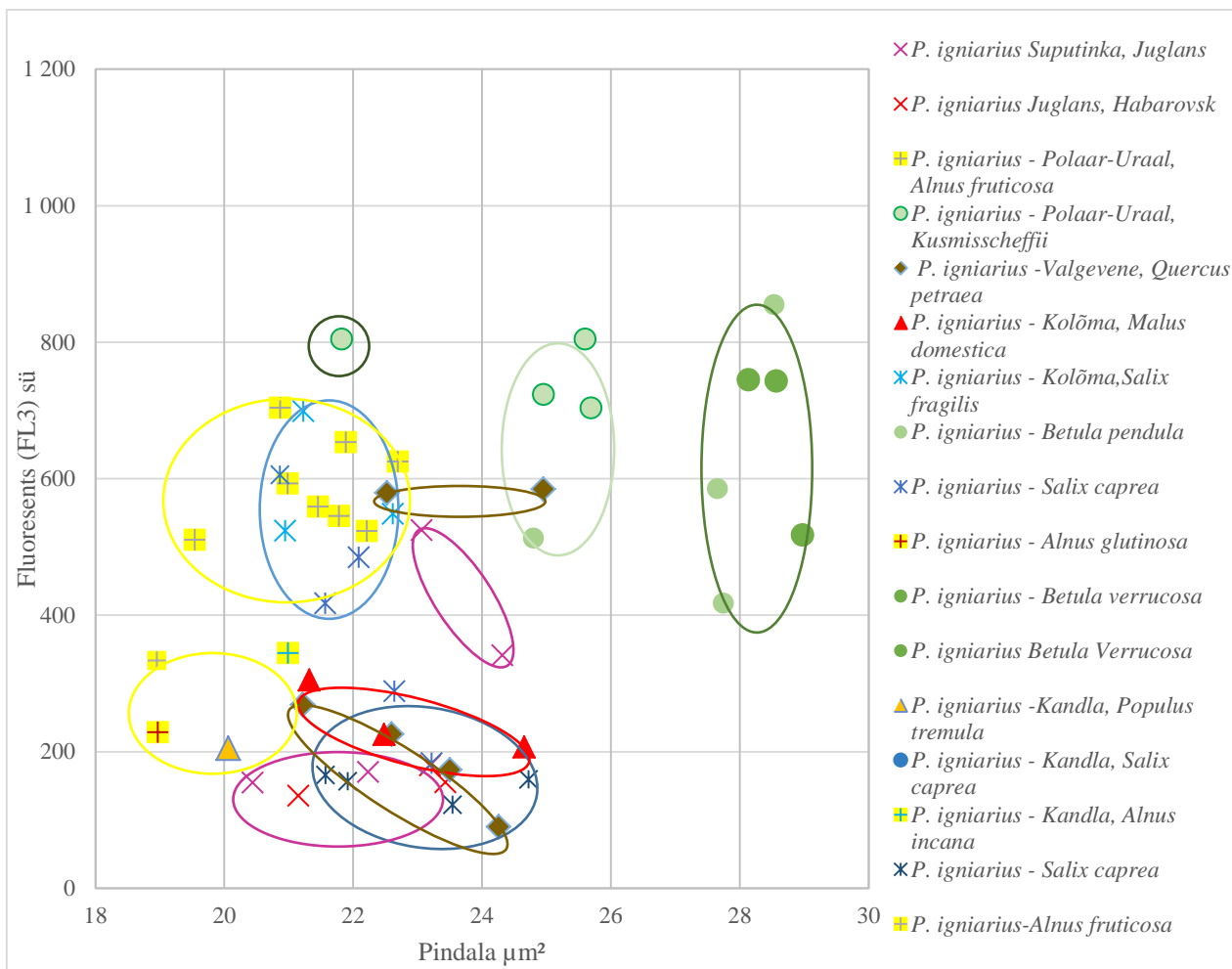
Eoste suuruste määramine on olnud tähtis liikide määramisel, kuid mõõtmisel tekivad vead ning paratamatult on eosed ka bioloogia tõttu varieeruvad. Eoste suurus on kvantitatiine ja spetsiifiline karakteristik, kus esineb varieeruvus põhjustatuna erinevast eose suurusest ja meetodikast. Eosed on ellipsoidsed ning mikroskoobis mõõdetakse neid kui kera või ellipsit (Rahi ja Kullman 1993). Antud töös määrati eoste suurust samal põhimõttel nagu valgusmikroskoobiga, kuid kogused olid suuremad ja saadi siiski märkimisväärne varieeruvus, ka proovi siseselt (Lisa 2, 3) .

Varieeruvuse arvutamisel rõhutatakse seda, et saadakse liiga suur või väike tulemus juhul kui valim on väike või eosed ei ole juhuslikult valitud (Parmasto E. ja Parmasto I. 1987: 92). Tsütomeeter annab suure valimi ja eosed valitakse juhuslikult. Käesolevas töös kasutati eosproovist taelikute mõõtmisel vähemalt 10 000 eost ning masin võtab eoseid proovis juhuslikult. Seega võib tsütomeetria eeliseks olla eoste mõõtmine juhuslikult ning suured kogused. Samas tuleks eoste olemasolu proovis valgusmikroskoobi all kontrollida, sest tsütomeeter annab statistikud ja graafikud, kuid ei võimalda eoseid identifitseerida pildi abil.

Isendisisest (*intra-individual*) ja liigispetsiifilist (*intra-specific*) varieeruvust on põhjalikult uurinud Parmasto E. ja Parmasto I, kus selgitati, et liigispetsiifilise varieeruvuse arvutamine tuleb omakorda varieeruvuse kaudu ning seetõttu võidakse pidada statistiliselt ebamääraseks, kuid liikide ja eoste võrdlemisel bioloogiliselt võib see tulemust anda (1987). Antud töös saadi isendisisene varieeruvus suurem kui liigispetsiifiline ning siin võib olulist mõju avaldada see, et mõõdeti pindala ning suuremad kogused ja samuti ei ole päris täpselt selge kui suure osa sellest varieeruvusest tuleneb masina mõõtmisveast.

Autofluoresents võib aidata gruppide lahutamisel, sest eosed on suuruse järgi sarnased, aga autofluoresentsi järgi erinevad. Sellist asjaolu on kasutanud oma töös ka Dreyer ja Morte (2009), kuid peremeestaime järgi autofluoresentsi otseselt nad ei määranud. Käesolevas

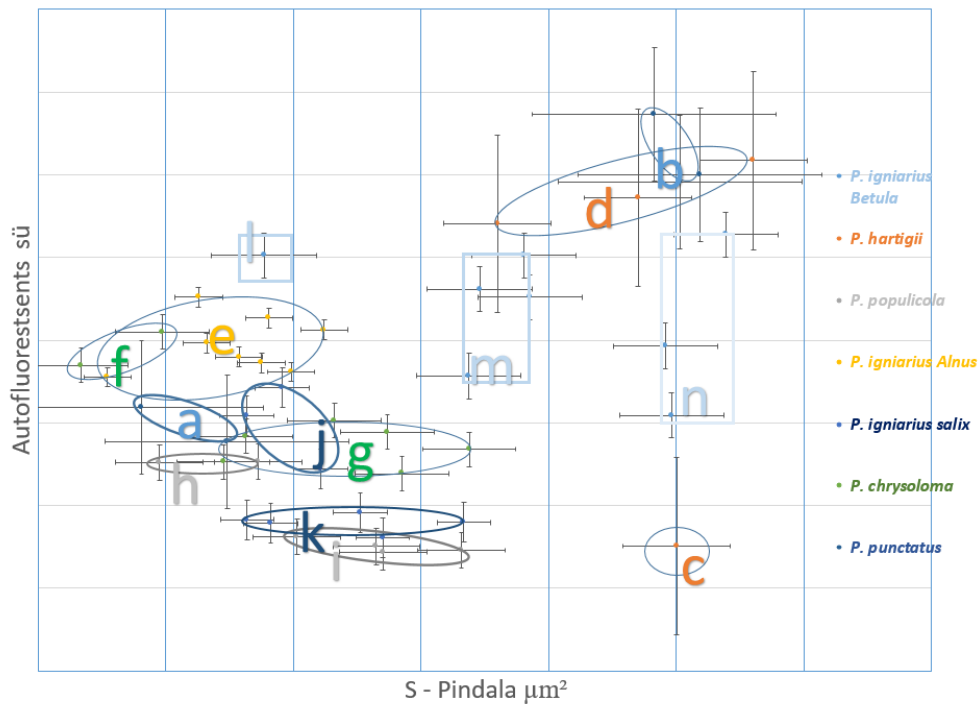
uuringsus leiti, et ühel peremeesliigil kasvavatel taelikutel võib esineda kahesuguseid eoseid või ka erinevaid liike *Phellinus igniarius* grupist. Nende eosed eristuvad kas suuruse: r ja e - *Alnus fruticos*; s ja t - *Betula pendula*; l ja m - *Betula kusmischeffii* või autofluoresentsi alusel: j ja k - *Salix caprea*; o ja p - *Quercus petraea*. (Joonis 20). Ühel peremeestaimel võib olla eose suuruse ja autofluoresentsi alusel ühe liigi erinevaid morfe.



Joonis 19 *Phellinus igniarius* grupid lahutatud autofluoresentsi ja pindala abil

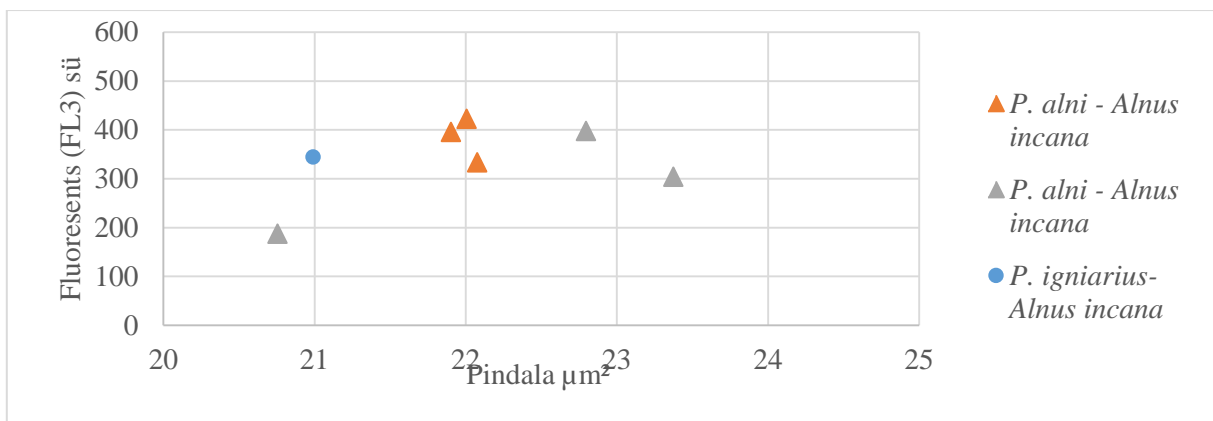
Joonisel (19) on näha liigi tuletaelik (*Phellinus igniarius*) liigisisene eose suuruse varieeruvus ja grupperumine vastavalt peremeestimele ja geograafilisele varieeruvusele. Saadi 4 gruppi, kusjuures samalt substraadilt pärinenud eostel tuvastati üldiselt 2 gruppi, kuid ilmnes ka

kolmeseid gruppe. kasutades peremeespuude järgi grupeerimist Selgus, et grupid eristuvad pigem substraadi kui piirkonna alusel, sest isegi erinevatest piirkondadest pärit sama liigi proovid jagunevad hajusasse gruppi. Alljärgneval joonisel (20) on näha, et erinevate liikide grupid tulevad hajusalt esile kasutades eose pindala ja autofluoresentsi.



Joonis 20. Perekond taelik (*Phellinus*) liikide provisoore grupperimine eose suuruse ja autofluoresentsi alusel

Joonisel 21 on näha, et eosproovid on hajusalt, kuid *Phellinus alni* ja *P. igniarius* langevad lähedasse gruppi fluoretsentsi ja varjupindala abil. Oluliseks võib osutuda see, et liigid kasvavad samal substraadil, mis ilmselt mõjutab autofluoresentsi intensiivsust.



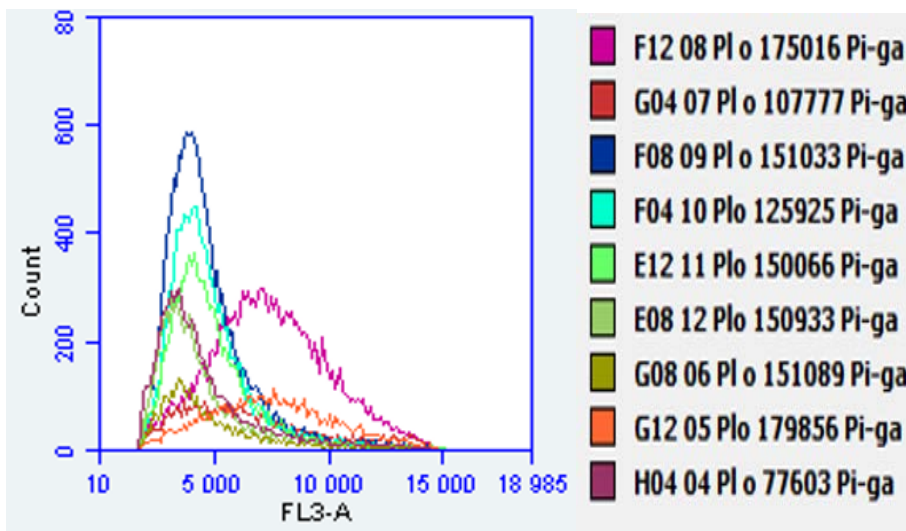
Joonis 21. *Phellinus populicola* ja *P. igniarius* samal peremeestaimel hallil lepal (*Alnus incana*)

Genoomi suuruse määramiseks katsetati töös erinevaid meetodikaid, et saada kätte intaksed tuumad. Töö käigus õnnestus leida viis tuumade eraldamiseks eostest servikute (*Pleurotus*) genoomi suuruse mõõtmiseks (vt pt. Metoodika). Oluliseks osutus ensüüm pepsiiniga töötlemise aeg ja pipeteerimise intensiivsus, sest vabanenud tuumad on õrnad ja purunevad kergesti. Varem mõõdeti genoomi suurust (Kullman 2000, 2007) eoste seest. Käesolevas töös tehti katseid ning modifitseeriti erinevaid meetodikaid kuni saadi kätte intaktsed tuumad. Oluliseks võis osutada pikemalt pepsiinilahuses hoidmine ning loksutamise või pipeteerimise vähendamine. Pepsiinilahuses hoidmisega katsetati ja kohendati. Proove hoiti katsetes pepsiinilahuses 5 minutit, 10 minutit, 20 minutit ning lõpuks 30-35 minutit.

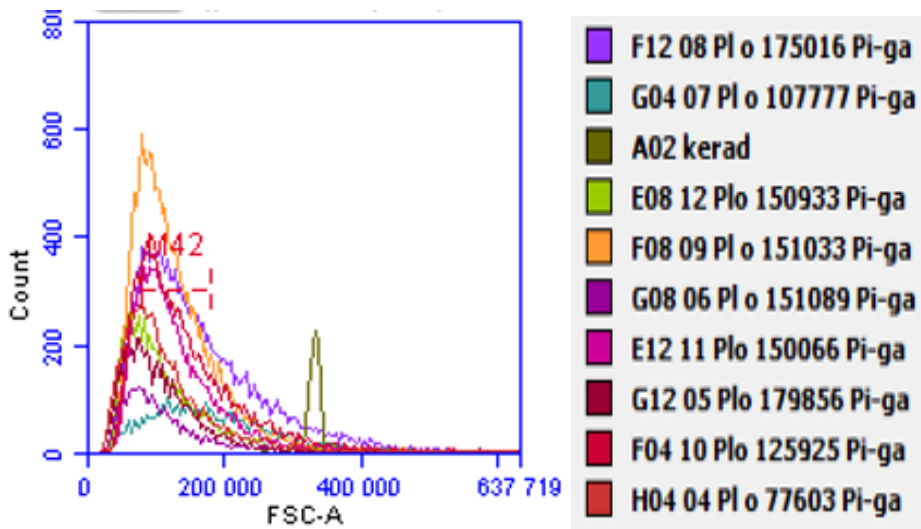
Genoomi suuruse mõõtmisel on oluline mõõta ainult G1 faasis olevaid eosid ning seega tuleb enne mõõtmist andmeid analüüsida (Tavares *et al* 2014, Wang *et al.* 2015). Töö käigus mõõdeti paljusid proove ning leiti, et sama liigi proovides DNA sisaldus varieerub samades piirides, variatsiooni amplituut jääb samaks erinevate proovi lõikes, kusjuures kas samas eosproovis või siis sama liigi eosproovides avalduvad DNA sisalduse sagedesjaotuses (histogrammil) kahekordselt erinevate väärtustega maksimumid. See annab alust arvata, et tegemist võib olla tuumatsükliga. Kui esineb ainult üks maksimum, siis tuleb jälgida, kas see langeb sama liigi rakutsükli piiridesse.

Selgus, et austerserviku rakutsükkel pole arreteritud G1 faasis ja tuuma replikatsioon võib eoses toimuda. Selle kohta annab tõendust ka üksikute kahetuumsete eoste olemasolu eosproovi mikroskoopeerimisel. Enamasti on eosproovis olevad eosed siiki G1 Faasis (Joonis 23). Rakutsükli faas ja tuumade replitseerumine avaldub ka eosproovis olevate tuumade suuruses (Joonis 24).

Erinevaid tsükli faase aitab täpsustada autofluoresentsi olemasolu, mis võimaldab tuumi eraldada masinamürast ja seejärel suuruse ja PI sisalduse järgi analüüsida. Ainult suuruse alusel tuumi eraldades ei tule esile, kas DNA sisalduse maksimum jääb kogu proovi keskele ning hõlmab mitmeid faase või on tegemist G1 faasiga. Seente geneetika uurimisel on autofluoresentsi kasutanud ka Tavares *et al.* (2014).

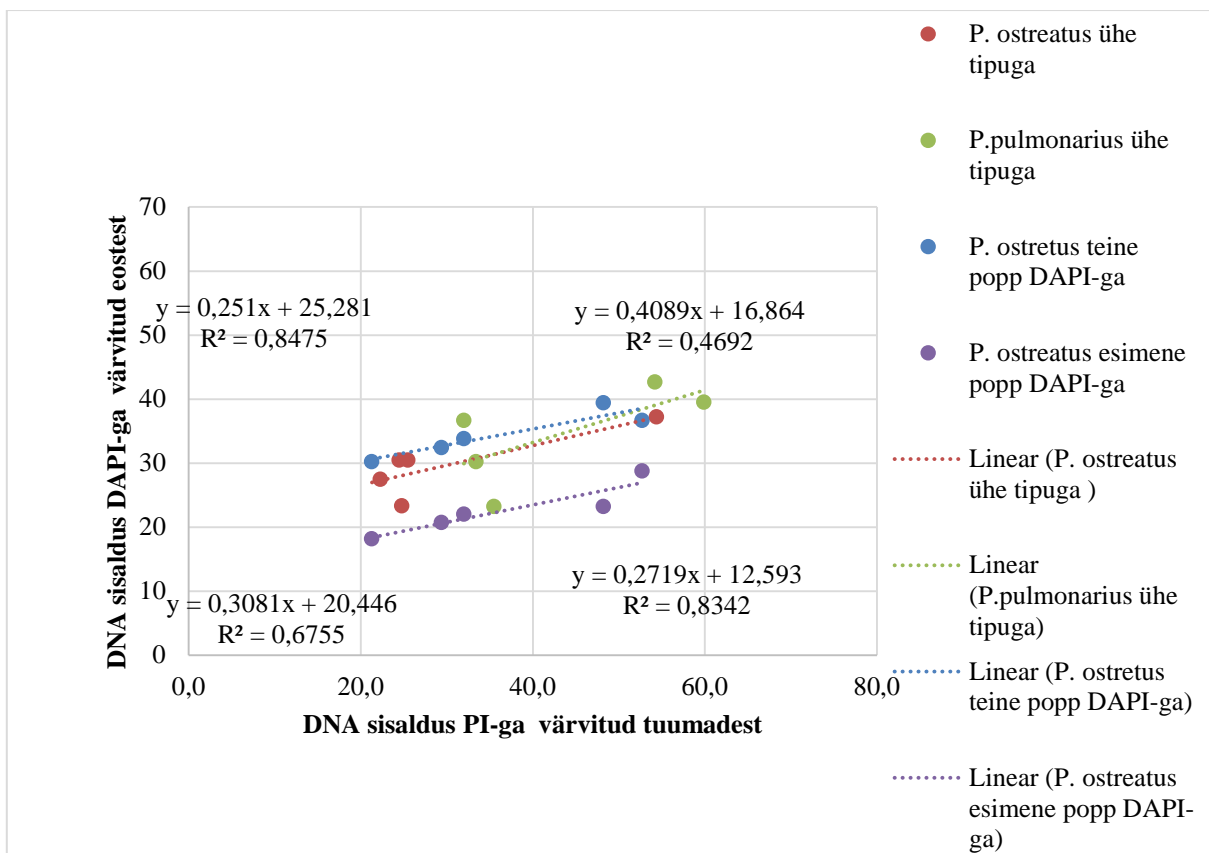


Joonis 23. PI-ga värvitud austerserviku (*Pleurotus Ostreatus*) tuumade suhteline DNA sisaldus. Enamus mõõdetuis on rakutsükli G1 faasis.



Joonis 24. Austerserviku tuumade suhteline suurus mõõdetuna volutsütomeetris. Absoluutse suuruse saamiseks on proovis ekvivalentkerad A02 kerad läbimõõduga 3,2 μm

DAPI-ga värvides on populatsioonide eristamine probleemne, sest ei ole teada, kas on tegu on kahekordse ploidsusastmega või on G2 (Kullman 2007). Käesolevas töös püüti G1 määrata ja kui see ei õnnestunud, siis jäi C määramata. Joonisel 25 on võrreldud DAPI-ga saadud populatsioone kumbagi eraldi propiidiumiodiidiga saadud G1 suhtes. Juhul kui esimene populatsioon on G1 ja teine G2, siis ülejäänud populatsioonid, mida ei õnnestunud eristada, jäävad S- faasi.



Joonis 25. DAPI-iga (FL1) ja Propiidiiumiodiidiga (FL3) mõõdetud tuuma DNAsisaldus

Perekonna servik mõlemad uuritud liigid on polüploidised (Joonis 25). Ploidsusastmel 1x olevate kopsservikute eksemplaride genoomi suurused on $33,8 \pm 1,5$ Mbp $n=4$ ja austerservikute $25,7 \pm 3,8$ Mbp $n=7$. Ploidsusastmel 2x on vastavalt $57 \pm 4,0$ Mbp $n=2$ ja $51,8 \pm 3,2$ $n=3$ (Tabel 5). Austerserviku C-suuruse varieerumine on kirjeldatud ka varasemates töödes (Fungal Genome Size Database).

Dreyer *et al.* järgi saadi arbuskulaarse mükoriisa eoste emissiooni maksimumid 503-527, 559-608 ja 655-680 nm (2006). Antud töös kasutati fluoretsi intensiivsust kanalist FL3, mis mõõdab lainepikkust 610/20 nm ning saadi liikidele erinevad intensiivsused. Samas ei ole teada, kas autofluorets arbuskulaarsel mükoriisal pärineb peremeestaimest või seentest, kuid Dreyer *et al.* järgi peaks see pärinema siiski seente eostest (2006, 2009). Käesolevas töös uuriti ainult seente eoseid, kuid kõik kasutatud eosed omasid fluoreseeruvat ainet olenemata

peremeestaimest. Samas leiti, et erinevatelt peremeestaimedelt kogutud proovidelt saadakse erinev autofluoresents, mis näitab, et autofluoresentsi intensiivsus võib sõltuda peremeestaimest. Arvatavasti mõjutab peremeestaim kui palju fluoreseeruvat ainet eoses on.

Servikute perekonna uurimisel leiti, et liikidel on sarnane autofluoresents ning selle abil oleks võimalik eristada ainult seente perekondi. Dreyer ja Morte järgi saab arbuskulaarset mükoriisat eristada taimsest materjalist just fluoretsentsi alusel (2009). Saari *et al.* järgi saab eristada fluoretsentsi alusel baktereid ja seeni (2013). Käesolevas töös arvatakse, et autofluoresentsi alusel võiks eristada seeneliike või vähemalt perekondi kui kasutada voolutsütomeetria.

Uuringu käigus leiti, et FL3 kanalis on üldiselt perekond taelikute autofluoresents kõrgem kui servikute esindajatel (Lisa 2 ja 3). Seega võib leida veelgi kinnitust fluoreseeruva aine paiknemine eoses. On teada, et taelikute eoste kestad on võrdlemisi paksud (Parmasto toim. 2008) ning servikutel õhukesed (Hilber 1982, Guzmán 2000). Juhul kui fluoreseeruv aine paikneb kestas nagu pakkusid Dreyer ja Morte, siis sobib see antud uurimusega (2009). Samas käesolevate katsete käigus leiti ka, et intaktsed tuumad fluoreseeruvad, mis annab alust arvata, et põhjuseks võib olla valk. DNA sisalduse määramisel on autofluoresentsi eemaldamine oluline.

Vähe on uuritud seente eoste autofluoresentsi ning põhjuseid, mis selle määravad ning kuidas viimane seentele kasulik on. Autofluoresentsi juures vajavad uurimist, kas seda on seentel vaja ja samuti, kas see on liigispetsiifiline, asukohast või peremehest sõltuv. Samuti, kas see aitab eristada liike ning nendes leiduvaid grupe. Genoomi suuruse määramisel on oluline, et autofluoresents oleks elimineeritav. Selgitati eoste autofluoresentsi olemasolu ja selle osakaalu eose summaarsest fluoretsentsi intensiivsusest kui eost värvitakse autofluoresentsiga samal lainepikkusel helendava fluorokroomiga. Siin tuleb arvestada fluoretsentsi tugevat varieeruvust (Lisa 2,3) ning samuti eoste liigisisest ja isendi varieeruvust (Parmasto E. ja Parmasto I. 1987).

KOKKUVÕTE

Töö eesmärgiks oli rakendada voolutsütomeetria seente eose suuruse ja genoomi suuruse mõõtmiseks ning anda ülevaade, milliseid piiranguid omab ja võimalusi annab voolutsütomeetria kasutamine seente süstemaatikas. Võrreldes valgusmikroskoopiaga annab voolutsütomeetria kasutamine eosproovist lühema ajaga esinduslikku informatsiooni. Võimalik on mõõta tuhandeid eoseid, kuid nende suuruste võrdlemiseks mikroskoobist traditsiooniliselt mõõdetavete tunnustega, eose pikuse ja laiusega, tuleb kasutada paranduskoefitsienti.

Lisaks suurusele ja hulgale on võimalik mõõta eoste autofluoresentsi nelja erineva optilise filtriga. Uuringu käigus selgus, et kahe tunnuse, autofluoresentsi intensiivsus ja eose suurus, graafikute kasutamine võimaldab erisrada lähedasi liike ja liikide sees grupeid vastavalt peremehele ja piirkonnale. Tänu optilisele filtrile, mis on seadistatud vastavalt mõõtma propiidiumiodiidi, saadi määrata seente genoomi suurust.

Uuringus mõõdeti 102 taeliku (*Phellinus*) perekonna esindaja eossuurused nii, et proovis oleks vähemalt 10 000 eost ning samuti mõõdeti nende autofluoresentsi intensiivsus. Kasutades autofluoresentsi, eose suurust, geograafilist piirkonda ja peremeestaimede proovide alusel piiritleda ja grupeerida liike perekonnas taelik. Samuti mõõdeti 40 serviku (*Pleurotus*) perekonna esindaja eossuurused ning autofluoresents. Mõlemas perekonnas arvutati proovisisesed ja liigisised variatsioonikoefitsiendid. Perekonna taelik keskmine variatsioonikoefitsient saadi eksemplari siseselt 16% ja liigi keskmine variatsioonikoefitsient saadi 11% ning eose pindala mõõdetuna tsütomeetris 23,49 μm^2 . Perekonna servik keskmine variatsioonikoefitsient saadi eksemplari siseselt 35% ja liigi keskmine 22% ning eose pindala mõõdetuna tsütomeetris ja parandatud Q kaudu 29,18 μm^2 .

Käesoleva magistritöö käigus töötati välja meetodika eosproovist intaktsete tuumade saamiseks ning tuuma suuruse ja DNA-sisalduse mõõtmiseks otse tuumadest. Antud meetodika võimaldab vältida DNA-sisladust tervetest eostest mõõtes tekkivaid võivaid vigu, milledeks on esiteks eose autofluorestsentsist tingitud viga ja teiseks mõningase hulga kahetuumsete eoste esinemine eosproovis. Leiti, et selleks, et mõõta voolutsütomeetriga korrektselt genoomi suurust, peab mõõtmiseks kasutatavaid proove üle kontrollima kasutades valgusmikroskoopi ja jälgima, et proovis oleks tuumad eostest vabanenud, terved ja värvunud. Trütomeetri kasutamisel tuleb kasuks mõõtmisel ilmnev tuumade autofluorestsents, mis võimaldab tuumi eristada muust proovis olevast.

Uuriti kas perekonna *Pleurotus* liikide eosproovides tuuma DNA replikatsioon on arreteeritud kindlas rakutsükli faasis. Erinevas tsükli faasis tuuma DNA sisaldust mõõtes ei ole genoomi suurust võimalik suhteliselt määrata. Halvimal juhul annab G2 faasis olevate tuumade ehk replitseerunud DNAGA tuumade mõõtmine sama tulemuse, mis on 2x ploidsusastmele omane. Genoomi suurus määrati eosproovis G1 faasis olevate tuumade DNA sisalduse alusel refernteksempari TAAM126992 suhtes. Perekonna servik mõlemad uuritud liigid on polüploidised. Ploidsusastmel 1x olevate kopservikute eksemplaride genoomi suurused on $33,8 \pm 1,5$ Mbp n=4 ja austerservikute $25,7 \pm 3,8$ Mbp n=7. Ploidsusastmel 2x on vastavalt $57 \pm 4,0$ Mbp n=2 ja $51,8 \pm 3,2$ n=3.

Selgus, et paksukestalistel ja tugeva autofluoresentsi intensiivsusega taeliku perekonna liikidel on eosest tuumade väljutamine ja genoomi suuruse mõõtmine problemaatiline. Samas sobib voolutsütomeetria taeliku perekonna suhteliselt väikse pikkuse ja laiuse suhte (Q) tõttu eoste suuruse mõõtmiseks paremini kui servikute eoste mõõtmiseks. Q on kasutatud materjalil perekonnas taelik kuni 1,2 ja servikutel kuni 2,95.

Arvestades eoste autofluoresentsi tähtsust genoomisuuruse määramisel eostes oleks vaja edaspidiseid uuringuid, et teada, milline aine fluoresseerub. Töö käigus selgus, et seda täielikult eostest eemaldada on keeruline. Samuti ilmnes, et autofluorestsentsist võib kasu olla lisaparameetrina eoste suuruse kasutamisel liikide eristamiseks kui ainult eose suuruse järgi grupid ei eristu. Võttes arvesse seda, et eoste autofluorestsents saadi tugeva varieeruvusega tuleks edaspidi uurida, mis seda põhjustab ja kas eoste autofluorestsents on liigispetsiifiline.

KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

1. A Dictionary of Biology. (2004). s. v. heterothallic [<http://www.encyclopedia.com/doc/1O6-heterothallic.html>]
2. A Dictionary of Biology. (2004). s. v. homothallic [<http://www.encyclopedia.com/doc/1O6-homothallic.html>]
3. **Arcangeli, C., Zucconi, L., Onofri, S., Cannistraro, S.** (1997). Fluorescence study on whole Antarctic fungal spores under enhanced UV irradiation.-*Journal of Photochemistry and Photobiology*, 39 (3),258-264.
4. **Arndt-Jovin D, Jovin T.**(2012). Fluorescence labeling and microscopy of DNA. *Methods Cell Biol.* 1989;30:417-48. Viidatud Walker-Daniels, J. Labome.- The world of laboratories [on-line] <http://www.labome.com/method/Live-Cell-Imaging-Methods-Review.html> (04.05.2016)
5. Australian Government. Department of the Environment. Fungi of Australia Glossary. [On-line] <http://environment.gov.au/biodiversity/abrs/online-resources/glossaries/fungi/index.html> (15.01.2016)
6. **Baltazar, MT., Gibertoni, BT.**(2010). New Combinations in *Phellinus* s.l. and *Inonotus* s.l. – *Mycotaxon*, 111, 205-208. Pernambuco, Brazil.
7. BD Accuri C6 User Guide- Manual. [On-line] http://rai.unam.mx/manuales/ucf_BD_Accuri_C6_Software_User_Guide.pdf (01.11.2015)
8. *Biology online*.Dictionary (2005). s. v. C value. [on-line] http://www.biology-online.org/dictionary/C_value (15.12.2016)
9. **Bruckner Z.M.** (2012). *Microbial Life*. Educational Resources.[on-line] http://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/microscopy/viable_quant.html (05.03.2015)
10. **Burnett, J.H.** (2003). *Fungal populations and species*.Oxford,New York, Oxford University Press. 348 pp.
11. **Camarero, S., Böckle, B., Martínez, J. M., Martínez T.A.** (1995).Manganese-Mediated Lignin Degradation by *Pleurotus pulmonarius*.-*Applied and Environmental Microbiology*, 3, 1070-1072.[e-ajakiri] <http://aem.asm.org/content/62/3/1070.full.pdf> (25.04.2016)
12. **Carlson, C.R., Grallert, B., Bernander, R., Stokke, T, Boye, E.** (1997).Measurement of Nuclear DNA content in fission yeast by flow cytometry.-*Yeast*, 13(14), 1329-1335.
13. **Chazotte, B.** (2010). *CSH Protocols*.Cold Spring Harbor Protocols. Labeling Nuclear DNA Using Dapi. [on-line] <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2011/1/pdb.prot5556.full> (10.05.2016)

14. **Derek Davies**, FACS Laboratory, London Research Institute, Cancer Research UK. Abca, plc.(2016). [on-line] <http://www.abcam.com/protocols/flow-cytometric-analysis-of-cell-cycle-with-propidium-iodide-dna-staining> (01.02.2016)
15. **D'Hondt L., Hofte M., Van Bockstaele E., Leus, L.** (2011). Applications of flow cytometry in plant pathology for genome size determination, detection and physiological status.-Molecular Plant Patholgy, 12, 815–828.
16. **Ditrich, O., Chrdle, A., Sak, B., Chamelík, V., Kubále, J., Dyková, I., Kváč, M.** (2011). *Encephalitozoon cuniculi* Genotype I as a Causative agent of Brain Abscess in an Immunocompetent Patient.-Journal of Microbiology,49(7), 2769-2771 [e-ajakiri] <http://jcm.asm.org/content/49/7/2769.full> (12.02.2016)
17. **Dreyer, B., Morte, A., Pérez-Gilabert, M., Honrubia, M.** (2006). Autofluorescence detection of arbuscular mycorrhizal fungal structures in palm roots: an underestimated experimental method.-Mycological Research 110(8), 887-897. [e-ajakiri] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16893637> (25.03.2016)
18. **Dreyer, B.,Morte, A.** 2009.Symbiotic Fungi.Use of the Autofluorescence Properties of AM Fungi for AM Assessment and Handling.- Soil Biology (18), 123-140. [On-line] http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-95894-9_8 (27.03.2016)
19. **Fischer, M.** (1987). Biosystematische Untersuchungen an den Porlingsgattungen *Phellinus* Quéél. Und *Inonotus* Karst.-Bibliotheca Mycologia (107). J. Cramer.Berlin. Stuttgart.133 p.
20. **Fischer, M., Ainsworth A.M., Wagner, T.**2001. *Phellinus cavicola*: a Species not assignable to European subgroups of *Phellinus* s.l.-Mycologist, 15(1),16-18. Berkshire UK.
21. **Fischer, M.**(1995). *Phellinus Igniarius* and its closest relatives in Europe.-Mycological Research. 99(6),735-744. Great Britain.
22. **Fischer, M.**(1996). On the Species Complexes within *Phellinus*: Fomitiporia revisited.-Mycological research,100(12), 1459-1467. Grea Britain
23. **Grigoriev IV, Nikitin R, Haridas S, Kuo A, Ohm R, Otilar R.**(2014). MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes.Nucleic Acids Research. 42(Database issue): D699–704. doi: 10.1093/nar/gkt1183 [e-ajakiri] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3965089/> (05.05.2016)
24. **Guzmán, G.**(2000). Genus *Pleurotus*(Jacq.:Fr) P. Kumm (Agaricomycetidae): Diversity, Taxonomic Problems, and Cultural and Traditional Medicinal Uses.2(2). [on-line] <http://www.dl.begellhouse.com/journals/708ae68d64b17c52,452b39d115b42ef7,664f37f504ad6445.html> (22.01.2015)
25. **Hilber, O.**(1982). Die Gattung *Pleurotus* unter besonderer Berücksichtigung des *Pleurotus eryngii*-Formenkomplexes. J. Cramer.448p.
26. **Jin, W.J., Lim, W.Y., Lee, S.J., Jung, S.H.**(2005). Phylogeny of *Phellinus* and Related Genera Inferred from Combined Data of ITS and Mitochondrial SSU rDNA Sequences.-Journal of Microbiology and Biotechnology, 15(5),1028-1038.Korea

27. **Johnson I.** (1998). Fluorescent probes for living cells. *Histochem J.* 30:123-40. Viidatud Walker-Daniels, J. 2012 Labome.- The world of laboratories [on-line]
<http://www.labome.com/method/Live-Cell-Imaging-Methods-Review.html> (04.05.2016)
28. **Kullman, B.** (2000). Application of flow cytometry for measurement of nuclear DNA content in fungi.- *Folia Cryptogamica Estonica*, 36,36-46.
29. **Kullman, B., Greve, B.** (2007). Diversity of DNA and protein contents of spores of the closely related oyster fungi *Pleurotus pulmonarius* and *P. Ostreatus* as studied by flow cytometry.- *Folia Cryptogamica Estonica*, 43,17-21.
30. **Kullman, B., Greve, B., Severin, E.** (2005). Diversity in the spore print of the Hybrid of *Lentinula* and *Pleurotus* on the Basis of Nuclear DNA content.- Proceedings of the XVI Symposium of Mycologists and Lichenologists of Baltic States. 119-123. Latvia
31. **Kullman, B., Jakobson, A.; Rahi, M.** (2010). The influence of preparation on ascospore measurements. In: G. L. Hennebert (Ed.). THE 100 YEARS OF THE FUNGUS COLLECTION MUCL 1894-1994. Fungal Taxonomy and Tropical Mycology: Quo vadis? Taxonomy and Nomenclature of the Fungi (221–225). Ithaca, New York, USA: Mycotaxon, Ltd. [on-line]
<http://www.mycotaxon.com/pubs/2010MUCL.pdf> (21.02.2016)
32. **Kullman, B., Tamm, H. Kullman, K.** (2005). Fungal Genome Size Database. [on-line]
<http://www.zbi.ee/fungal-genomesize/> (24.04.2016)
33. **Kumla, J., Suwannarach, N., Jaiyasen, A., Bussaban, B., Lumyong, S.** (2013). Development of an Edible Wild Strain of Thai Oyster Mushroom for Economic Mushroom Production.- *Chiang Mai Journal of Science*, 40(2),161-172. [e-ajakiri]
https://www.researchgate.net/publication/286156854_Development_of_an_Edible_Wild_Strain_of_Thai_Oyster_Mushroom_for_Economic_Mushroom_Production (22.03.2016)
34. **Kuo, M.** (2009). *Pleurotus dryinus*. Retrieved from the MushroomExpert.Com [On-line]
http://www.mushroomexpert.com/pleurotus_dryinus.html (20.04.2016)
35. **Kõljalg, U., Zirk, A., Abarenkov, K., Raotviir, T., Piirmann, T., Kume, A., Ivanov, F., Reinhold, K., Põhonen, R., Adojaan, K., Runnel, V.** (2016). PlutoF and mebaas [on-line] <https://plutof.ut.ee/#> (10-05.2016)
36. **Larraya, M.L., Pérez, G., Peñas, M. M., Baars, P.J.J., Mikosch, P. S. T., Pisabarro, G. A., Ramírez, L.** 1999. Molecular Karyotype of the White Rot Fungus *Pleurotus Ostreatus*.- *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3413-3417. [e-ajakiri]
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91513/> (15.03.2016)
37. **Larsson, K-H., Parmasto, E., Fischer, M., Langer, E., Naksone, K.K., Redhead, A.S.** (2006). Hymenochaetales: a molecular phylogeny for the hymenochaetoid clade. *Mycologia*, 98(6), (926-936)
38. Microscopy resource centre [on-line]
<http://www.olympusmicro.com/primer/digitalimaging/concepts/photomultipliers.html>
 (18.04.2016)
39. **Mohanta, K. T., Bae, H.** (2015). The diversity of fungal genome.- *Biological Procedures Online*, 17(8). [e-ajakiri] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4392786/>

40. **Momany, M., Taylor, I.** (2000). Landmarks in the early duplication cycles of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*: polarity, germ tube emergence and septation.- *Microbiology*, 146, 3279-3284. [e-ajakiri]
<http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/146/12/1463279a.pdf?expires=1461594426&id=id&accname=guest&checksum=D6D1ABA1B2D56E6B7A0DCE35BB4556EE>
41. Mükoloogiline oskussõnastik [on-line]
<http://moritz.botany.ut.ee/lectures/mukoloogia/mukol.eksam.sonastik.pdf> (13.05.2016)
42. **Nilsson, H. R., Kristiansson, E., Ryberg, M., Hallenberg, N., Larson, H-K.** 2008. Intraspecific ITS Variability in the Kingdom Fungi as Expressed in the International Sequence Databases and Its Implications for Molecular Species Identification.- *Evolutionary Bioinformatics Online.*, 4, 193-201. [e-ajakiri] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2614188/> (02.03.2016)
43. **Oberwinkler, F.** (1977). Das neue System der Basidiomyceten. In: Frey, W., Hurka, H., Oberwinkler F, eds. Beiträge zur Biologie der niederen Pflanzen. Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag. (59-104). Viidatud. Larsson, K-H., Parmasto, E., Fischer, M., Langer, E., Nakson, KK., Redhead, AS. 2006. Hymenochaetales: a molecular phylogeny for the hymenochaetoid clade. *Mycologia*, 98(6), 926-936.
44. **Oukuda, Y., Murakami, S., Matsumoto, T.** (2009). Development of STS markers suitable for marker-assisted selection of sporeless trait in oyster mushroom, *Pleurotus pulmonarius*.- *Breeding Science*, 59, 315-319. [e-ajakiri] https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsbbs/59/3/59_3_315/_pdf (24.04.2016)
45. **Parmasto, E.** (toim). (2008). Torikseened Soomes ja Eestis. Tartu. Eesti Loodusfoto. 320lk
46. **Parmasto, E., Parmasto, I.** (1987). *Bibliotheca Mycologica* (115). Variation of basidiospores in the Hymenomycetes and its significance to their taxonomy. J. Cramer Publishing. Berlin, Stuttgart. 168 pp
47. **Paul, K.** (2015). Index Fungorum and mebaas [on-line]
<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp> (24.04.2016)
48. **Petersen, R.H., Hughes, K.W.** (1992). Manuscript. Intercontinental interbreeding collections of *Pleurotus pulmonarius*, with notes on *P. ostreatus* and other species [on-line]
http://www.zobodat.at/pdf/Sydowia_45_0139-0152.pdf (11.05.2016)
49. *Phellinus noxious*. Whole genome shotgun sequence. [on-line]
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AYOR01000001.1> (10.05.2016)
50. Phosphate-buffered saline (PBS). Cold Spring Harbor (CSH) Protocols. (2006). [on-line]
<http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.rec8247> (10.03.2016)
60. R&D Systems a biotechne brand. (2016). Flow Cytometry Protocol for Analysis of Cell Viability using Propidium Iodide [on-line] <https://www.rndsystems.com/resources/protocols/flow-cytometry-protocol-analysis-cell-viability-using-propidium-iodide> (09.05.2016)
61. **Raghavachari, N., Bao, Y.P., Li, G., Xie, X., Müller, U.R.** (2003). Reduction of autofluorescence on DNA microarrays and slide surfaces by treatment with sodium borohydride.- *Analytical Biochemistry*. 312(2), 101-105.

- 62..**Rahi, M., Kullman, B.** (1993). Pitfalls in Ascospore Measurements. Fungi and Lichens in the Baltic Region. 12 International Conference Abstracts. Vilnius
- 63..**Rajchenberg, M.**(2011).Nuclear Behaviour of the mycelium and the phylogeny of Polypores(Basidiomycota).-Mycologia,103(4), 677-702.Argentina.
- 64.**Rayner, ADM., Boddy, L.**(1988).Fungal decomposition of wood: its biology and ecology. Chichester, UK: John Wiley and Sons. Viidatud. Larsson, K-H., Parmasto, E.,Fischer, M., Langer, E., Naksone, KK., Redhead, AS. 2006. Hymenochaetales: a molecular phylogeny for the hymenochaetoid clade. Mycologia, 98(6),926-936.
- 65.**Saar, I., Lõhmus, A., Parmasto, E.** (2007). Mycobiota of the Poruni old-growth forest (Estonia, Puhatu Nature Reserve).-Forestry Studies, 47, 71-86. [e-ajakiri]
https://www.researchgate.net/publication/229006121_Mycobiota_of_the_Poruni_old-growth_forest_Estonia_Puhatu_Nature_Reserve (16.04.2016)
- 66.**Saari, S.E., Putkiranta, M.J., Keskinen, J.**(2013).Fluorescence spectroscopy of atmospherically relevant bacterial and fungal spores and potential interferences.-Atmospheric Environment 71, 202-209.
- 67.**Schoch, L. C., Seifert, A. K., Robert, V., Spouge, L. J., Levesque, A. C., Chen, W., Fungal Barcoding Consortium.** (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi.- Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the United States of America, 109(16), 6241-6246. [e-ajakiri]
<http://www.pnas.org/content/109/16/6241.abstract> (11.04.2016)
- 68.Science Exchange. Whole Genome Sequencing. 2016. [on-line]
<https://www.scienceexchange.com/services/whole-genome-seq> (02.05.2016)
- 69.**Sell, I.** (2007). Tuletaeliku (*Phellinus igniarius* s. l) liikide süstemaatika ja spetsialiseerumine. (Magistritöö).Metsandus-jamaaehitusinstituut.Tartu.
- 70.**Sell, I.** (2012). Puitulagundavate kandseente valitud taksonite süstemaatika ja ökoloogia. Põllumajandus- ja keskkonnainstituut. Tartu.
- 71.**Sell, I.**(2006). Size and shape of basidiospores in the *Phellinus igniarius* group.-Agronomy Research, 4(Special issue),359-362.
- 72.**Sell, I.**(2008). Taxonomy of the species in the *Phellinus igniarius* group.-Mycotaxon,104,337-347.
- 73.**Tavares, S., Ramos, A. P., Pires, A.S., Azinheira, H. G., Caldeirinha, P., Link, T., Abranches, R., Lavado, S. M. Do Céu M., Voegelé, R.T., Loureiro, J., Talhinhos, P.**(2014).Genome size analyses of Puccinales reveal the largest fungal genomes. – Frontiers in Plant Science,5(8),(1-11). [on-line] <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00422/full> (25.04.2016)
- 74.ThermoFisher. Scientific. Propidium Iodide. (2015) [on-line]
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/P3566> (02.05.2016)
- 75.Veebipõhine väljund Eesti elurikkuse kohta. eElurikkuse andmebaas [on-line] <http://elurikkus.ut.ee/> (22.02.2016)
- 76.**Veselska,T.,Svuboda, J., Ružičková, Ž., Kolařík, M.**(2014). Application of Flow Cytometry for genome size determination in *Geosmithia fungi*: A comparison of methods.-Cytometry Part A,

- 85(10), 854-861. [on-line] <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto.a.22500/abstract> (04.11.2015)
77. **Walker-Daniels, J.** (2012). Labome.- The world of laboratories [on-line] <http://www.labome.com/method/Live-Cell-Imaging-Methods-Review.html> (04.05.2016)
78. **Wang, J-J., Qiu, L., Cai, Q., Ying, H-S., Feng, M-G.** (2015). Transcriptional control of fungal cell cycle and cellular events by Fkh2, a forkhead transcription factor in an insect pathogen.- Scientific Reports.5(1038). [on-line] <http://www.nature.com/articles/srep10108> (06.05.2016)
79. **Wasser, S.** (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides.- Applied Microbiology and Biotechnology, 60(3),258-274. [<http://link.springer.com/article/10.1007/s00253-002-1076-7>]
80. **Weber, E.** (1992). Untersuchungen zu Fortpflanzung und Ploidie verschiender Ascomyceten. Bibliotheca mycologia. J. Cramer. 186 pp.
81. **Wittmann-Meixner, B.**(1989). Polyploide bei Pilzen, unter besonderer Berücksichtigung der Botales: Möglichkeiten eines cytofluorometrischen Nachweises. Bibliotheca mycologia. J. Cramer. 163 pp.

APPLICATION OF FLOW CYTOMETRY TO MEASURE GENOME AND SPORE SIZES OF SELECTED BASIDIOMYCOTA GROUPS

Summary

Flow cytometry provides a technique to count, measure size and fluorescence of cells. Using flow cytometry it is possible to measure thousands of little particles such as fungal spores or nuclei. If the methodology is correctly applied, it is faster and results could be statistically better than by using light microscopy, because flow cytometry allows for a bigger selection of more uniformly sized sample particles. A correction coefficient is usually needed when comparing flow cytometry data to other data.

The aim of this study was to use flow cytometry to measure fungal spores of selected *Phellinus* and *Pleurotus* species and to determine if flow cytometry could be used in studying species of these genera. The second purpose was to introduce a new methodology for measuring genome size from intact nuclei and to explore how autofluorescence affects the obtained results.

The data and spore prints used in this study came from the University of Life Sciences, Institute of Agricultural and Environmental Sciences, mycology department fungarium and these specimens are retained there. In this survey, 102 *Phellinus* and 40 *Pleurotus* specimens spore size and autofluorescence were measured. Each sample contained about 10 000 spores to obtain a lot of information. Also, genome size of 16 *Pleurotus* specimens was determined and their spore sizes and autofluorescence were measured. Intra- and individual mean variation coefficients for spores were calculated for *Phellinus* and *Pleurotus* species.

Mean variation coefficient for *Phellinus* species within sample were 16%, species specific 11%. Mean variation coefficient for *Pleurotus* species within sample were 35%, species specific 22%. Mean spore sizes were 23,49 μm^2 and 29,18 μm^2 , respectively.

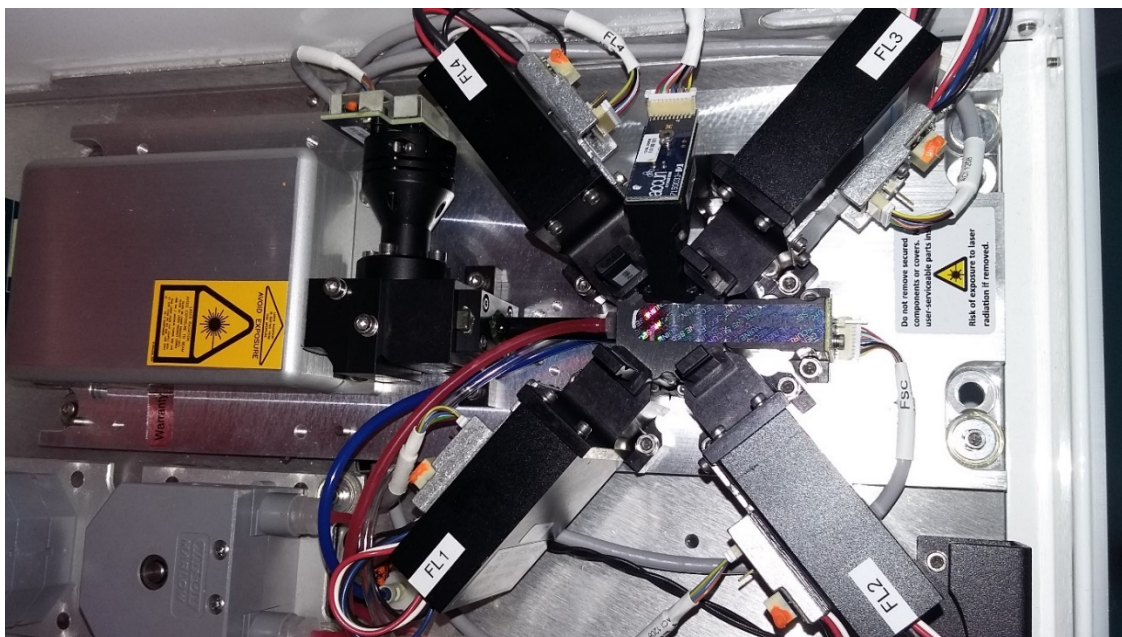
In this Master's thesis a new methodology to measure genome size was developed and tested. The methodology assures that one intact nuclei is measured only once and there are no repeat measurements of the same nuclei. Size, DNA content, autofluorescence and genome size were measured from intact nuclei of spores from 20 *Pleurotus* specimens. It was found that a correlation between *Pleurotus* species genome size and nucleus volume exists. The correlation coefficient was 0,75 and P-value was 0,01. No correlation between genome size and spore size was found. Although this method is useful, it is important to use microscopy as well to determine what really is in the sample measured, because flow cytometry only gives graphs and numbers. Also, it is useful to check what parts of the spore are colored, because only the nucleus should be dyed.

It was showed that it is problematic to measure *Phellinus* species genome size because of thick-walled spores and intensive autofluorescence. *Phellinus* species that were used in this study have quite round spores and these are ideal to measure using flow cytometry. Even correction coefficients are usually not necessary. For *Pleurotus* species spore size measuring is more problematic because of their very elliptic shape, but measuring intact nuclei and genome size was found suitable. It is important to take into account that every genus needs a modified methodology to suit a specific genus.

This thesis showed that autofluorescence, which has been criticized a lot because of giving false results measuring genome size, could be useful when measuring spore sizes. Grouping by substrate, autofluorescence and by geographical region could help differentiate species or at least genus. Using only spore width and length, different groups are not revealed. Excluding autofluorescence is important if genome size is measured and it was determined that even intact nuclei have autofluorescence. Further studies would be needed to determine what causes and what part of nuclei exactly have autofluorescence.

LISAD

Lisa 1. Töös kasutatud tsütomeetr ja selle sisu



Lisa 2. Perekond taelik (*Phellinus*) algandmed

Jrk. Nr	Sporoteegi nr.	Perek.	liik	Substraat	Asukoht	Pindala FC	CV %	Fluoresents (FL3 kanal)	CV%
1	151918	P.	<i>igniarius</i>	<i>Betula pendula</i>	Eesti	1 195 081,82	11%	41 790,53	46%
2	151909	P.	<i>igniarius</i>	<i>Betula pendula</i>	Eesti	1 191 044,63	10%	58 549,71	32%
3	K87	P.	<i>igniarius</i>	<i>Betula pendula</i>	Eesti	1 228 894,05	13%	85 505,68	25%
4	15191	P.	<i>igniarius</i>	<i>Betula pendula</i>	Eesti	1 068 032,03	12%	51 330,67	36%
5	K77	P.	<i>igniarius</i>	<i>Betula verucosa</i>	Kardla,Eesti	1 272 478,29	16%	74 270,47	35%
6	K110	P.	<i>igniarius</i>	<i>Betula verucosa</i>	Kardla,Eesti	1 253 078,43	15%	74 480,59	37%
7	P10	P.	<i>igniarius</i>	<i>Betula verucosa</i>	Puurmani (lodumets)	1 290 681,69	13%	51 723,21	48%
8	115	P.	<i>igniarius</i>	<i>Betula kusm (Betula pubescens ssp. tortuosa)</i>	Polaar-Uraal	1 102 638,52	13%	80 457,70	29%
9	102	P.	<i>igniarius</i>	<i>Betula kusm (Betula pubescens ssp. tortuosa)</i>	Polaar-Uraal	1 106 491,70	13%	70 374,90	30%
10	110	P.	<i>igniarius</i>	<i>Betula kusm (Betula pubescens ssp. tortuosa)</i>	Polaar-Uraal	1 074 826,65	14%	72 366,87	28%
11	108	P.	<i>igniarius</i>	<i>Betula kusm (Betula pubescens ssp. tortuosa)</i>	Polaar-Uraal	939 791,90	14%	80 489,01	40%
12	128	P.	<i>igniarius</i>	<i>Alnus fruticosa</i>	Polaar-Uraal	977 536,14	14%	62 497,08	25%
13	126	P.	<i>igniarius</i>	<i>Alnus fruticosa</i>	Polaar-Uraal	898 882,09	13%	70 366,71	20%
14	118	P.	<i>igniarius</i>	<i>Alnus fruticosa</i>	Polaar-Uraal	942 870,03	12%	65 335,60	25%
15	117	P.	<i>igniarius</i>	<i>Alnus fruticosa</i>	Polaar-Uraal	903 975,71	15%	59 281,63	29%
16	125	P.	<i>igniarius</i>	<i>Alnus fruticosa</i>	Polaar-Uraal	938 252,97	12%	54 546,69	25%
17	127	P.	<i>igniarius</i>	<i>Alnus fruticosa</i>	Polaar-Uraal	841 827,32	17%	51 053,34	48%
18	124	P.	<i>igniarius</i>	<i>Alnus fruticosa</i>	Polaar-Uraal	956 826,62	14%	52 308,69	36%
19	119	P.	<i>igniarius</i>	<i>Alnus fruticosa</i>	Polaar-Uraal	924 291,08	16%	55 895,48	51%
20	P58	P.	<i>igniarius</i>	<i>Alnus fruticosa</i>	Polaar-Uraal	844 201,80	17%	33 347,29	58%
21	P22	P.	<i>igniarius</i>	<i>Alnus glutinosa</i>	Puurmani	844 903,21	14%	22 845,52	75%
22	K86	P.	<i>igniarius</i>	<i>Alnus incana</i>	Kardla	934 834,14	17%	34 455,55	61%
23	Ko18	P.	<i>igniarius</i>	<i>Salix fragilis</i>	Kolomõja	1 007 276,24	13%	54 868,92	30%
24	Ko19	P.	<i>igniarius</i>	<i>Salix fragilis</i>	Kolomõja	932 946,89	17%	52 380,26	36%
25	Ko	P.	<i>igniarius</i>	<i>Salix fragilis</i>	Kolomõja	945 375,18	14%	69 902,58	30%
26	K85	P.	<i>igniarius</i>	<i>Salix caprea</i>	Kardla	929 071,39	17%	60 579,33	33%
27	56-1	P.	<i>igniarius</i>	<i>Salix caprea</i>	Jõgevamaa, Puurmani	975 294,96	15%	28 865,80	48%
28	56-2	P.	<i>igniarius</i>	<i>Salix caprea</i>	Jõgevamaa, Puurmani	1 000 054,44	16%	18 291,10	47%
29	325	P.	<i>igniarius</i>	<i>Salix caprea</i>	Jõgevamaa,Puurmani	951 356,61	18%	48 489,90	41%
30	313	P.	<i>igniarius</i>	<i>Salix caprea</i>	Jõgevamaa,Puurmani	928 990,99	19%	41 712,80	38%
31	E37	P.	<i>igniarius</i>	<i>Salix caprea</i>	-	1 014 201,73	16%	12 204,52	43%
32	E39	P.	<i>igniarius</i>	<i>Salix caprea</i>	-	944 029,73	14%	15 624,62	43%
33	E38	P.	<i>igniarius</i>	<i>Salix caprea</i>	-	1 064 950,24	13%	15 906,43	32%
34	E9	P.	<i>igniarius</i>	<i>Salix caprea</i>	-	929 276,90	15%	16 556,94	61%
35	125904	P.	<i>igniarius</i>	<i>Juglans</i>	Habarovski	1 059 071,66	12%	17 968,22	58%
36	125905	P.	<i>igniarius</i>	<i>Juglans</i>	Habarovski	1 069 990,17	12%	15 526,12	62%
37	104849	P.	<i>igniarius</i>	<i>Juglans</i>	Habarovski	965 829,12	19%	13 542,98	57%
38	76-3	P.	<i>igniarius</i>	<i>Juglans</i>	Suputinka	1 015 275,99	13%	17 038,25	37%
39	76-4	P.	<i>igniarius</i>	<i>Juglans</i>	Suputinka	1 053 171,36	13%	52 473,45	29%
40	76-5	P.	<i>igniarius</i>	<i>Juglans</i>	Suputinka	933 386,04	14%	15 475,08	47%
41	76-9	P.	<i>igniarius</i>	<i>Juglans</i>	Suputinka	1 110 304,99	12%	34 137,42	43%
42	PHIQ-19	P.	<i>igniarius</i>	<i>Quercus petracea</i>	Bel. Puštša	968 763,42	15%	26 872,13	66%
43	157	P.	<i>igniarius</i>	<i>Quercus petracea</i>	Bel. Puštša	1 031 934,18	14%	22 578,23	49%
44	165	P.	<i>igniarius</i>	<i>Quercus petracea</i>	Bel. Puštša	1 107 595,45	14%	8 982,11	63%
45	PHIQ-2	P.	<i>igniarius</i>	<i>Quercus petracea</i>	Bel. Puštša	1 028 582,19	13%	57 935,20	20%
46	16	P.	<i>igniarius</i>	<i>Quercus petracea</i>	Bel. Puštša	1 073 143,32	13%	17 356,79	67%
47	PHIQ1	P.	<i>igniarius</i>	<i>Quercus</i>	Bel. Puštša	1 054 358,01	14%	58 460,85	35%
48	Ko13	P.	<i>igniarius</i>	<i>Malus domestica</i>	Koloma	1 098 180,02	16%	20 682,63	50%
49	Ko12	P.	<i>igniarius</i>	<i>Malus domestica</i>	Koloma	949 464,73	14%	30 508,53	78%
50	Ko11	P.	<i>igniarius</i>	<i>Malus domestica</i>	Koloma	1 001 242,63	13%	22 541,02	89%
51	PN3	P.	<i>nigricans</i>	-	Habarovsk Terr.	1 231 672,31	9%	46 777,07	48%

Lisa 2. järg

Jrk. Nr	Pindala (FC) (µm ²)	Pindala (par) (µm ²)	Raadius (µm)	Raadius (par) (µm)	Ruumala (µm ³)	Ruumala (par) (µm ³)	Q	Laius (µm)	Pikkus (µm)	Laius (par) (µm)	Pikkus (par) (µm)
1	27,75	29,93	2,97	3,09	120,94	135,50	1,10	5,67	6,23	5,89	6,47
2	27,65	29,83	2,97	3,08	120,32	134,81	1,10	5,66	6,22	5,88	6,46
3	28,53	30,78	3,01	3,13	126,10	141,29	1,10	5,75	6,32	5,97	6,57
4	24,80	26,75	2,81	2,92	102,17	114,48	1,10	5,36	5,89	5,56	6,12
5	28,57	30,82	3,02	3,13	126,37	141,59	1,10	5,75	6,33	5,97	6,57
6	28,14	30,35	2,99	3,11	123,49	138,36	1,10	5,71	6,28	5,93	6,52
7	28,98	31,26	3,04	3,15	129,09	144,64	1,10	5,79	6,37	6,02	6,62
8	25,60	27,62	2,85	2,96	107,18	120,09	1,10	5,44	5,99	5,65	6,22
9	25,69	27,71	2,86	2,97	107,74	120,72	1,10	5,45	6,00	5,66	6,23
10	24,95	26,92	2,82	2,93	103,15	115,57	1,10	5,37	5,91	5,58	6,14
11	21,82	23,54	2,64	2,74	84,33	94,49	1,10	5,03	5,53	5,22	5,74
12	22,70	24,48	2,69	2,79	89,47	100,24	1,10	5,13	5,64	5,32	5,86
13	20,87	22,51	2,58	2,68	78,89	88,39	1,10	4,91	5,41	5,10	5,62
14	21,89	23,61	2,64	2,74	84,75	94,95	1,10	5,03	5,54	5,23	5,75
15	20,99	22,64	2,58	2,68	79,56	89,14	1,10	4,93	5,42	5,12	5,63
16	21,78	23,50	2,63	2,73	84,13	94,26	1,10	5,02	5,52	5,22	5,74
17	19,54	21,08	2,49	2,59	71,50	80,11	1,10	4,76	5,23	4,94	5,43
18	22,21	23,96	2,66	2,76	86,64	97,07	1,10	5,07	5,58	5,27	5,79
19	21,46	23,15	2,61	2,71	82,26	92,16	1,10	4,98	5,48	5,18	5,69
20	18,96	20,45	2,46	2,55	68,29	76,51	1,10	4,68	5,15	4,86	5,35
21	18,97	20,46	2,46	2,55	68,37	76,61	1,10	4,69	5,15	4,87	5,35
22	20,99	22,64	2,58	2,68	79,58	89,16	1,10	4,93	5,42	5,12	5,63
23	22,62	24,40	2,68	2,79	89,00	99,72	1,10	5,12	5,63	5,31	5,85
24	20,95	22,60	2,58	2,68	79,33	88,89	1,10	4,92	5,42	5,11	5,63
25	21,23	22,90	2,60	2,70	80,92	90,67	1,10	4,96	5,45	5,15	5,66
26	20,86	22,50	2,58	2,68	78,84	88,33	1,10	4,91	5,41	5,10	5,61
27	22,64	24,43	2,68	2,79	89,16	99,90	1,10	5,12	5,63	5,32	5,85
28	23,22	25,05	2,72	2,82	92,58	103,72	1,10	5,18	5,70	5,38	5,92
29	22,09	23,83	2,65	2,75	85,90	96,24	1,10	5,06	5,56	5,25	5,78
30	21,57	23,27	2,62	2,72	82,89	92,87	1,10	5,00	5,50	5,19	5,71
31	23,55	25,40	2,74	2,84	94,55	105,93	1,10	5,22	5,74	5,42	5,96
32	21,92	23,64	2,64	2,74	84,91	95,13	1,10	5,04	5,54	5,23	5,75
33	24,72	26,67	2,81	2,91	101,73	113,98	1,10	5,35	5,88	5,56	6,11
34	21,57	23,27	2,62	2,72	82,92	92,91	1,10	5,00	5,50	5,19	5,71
35	23,19	25,02	2,72	2,82	92,43	103,57	1,10	5,18	5,70	5,38	5,92
36	23,43	25,28	2,73	2,84	93,87	105,17	1,10	5,21	5,73	5,41	5,95
37	21,15	22,82	2,59	2,70	80,50	90,19	1,10	4,95	5,44	5,14	5,65
38	22,24	23,99	2,66	2,76	86,76	97,21	1,10	5,07	5,58	5,27	5,80
39	23,07	24,88	2,71	2,81	91,66	102,70	1,10	5,17	5,68	5,37	5,90
40	20,44	22,05	2,55	2,65	76,48	85,69	1,10	4,86	5,35	5,05	5,56
41	24,32	26,23	2,78	2,89	99,22	111,17	1,10	5,31	5,84	5,51	6,06
42	21,22	22,89	2,60	2,70	80,87	90,61	1,10	4,96	5,45	5,15	5,66
43	22,60	24,38	2,68	2,79	88,90	99,61	1,10	5,11	5,63	5,31	5,84
44	24,26	26,17	2,78	2,89	98,86	110,76	1,10	5,30	5,83	5,50	6,05
45	22,53	24,30	2,68	2,78	88,47	99,13	1,10	5,11	5,62	5,30	5,83
46	23,50	25,35	2,74	2,84	94,28	105,64	1,10	5,22	5,74	5,42	5,96
47	24,95	26,92	2,82	2,93	103,13	115,55	1,10	5,37	5,91	5,58	6,14
48	24,66	26,60	2,80	2,91	101,32	113,52	1,10	5,34	5,88	5,55	6,10
49	21,32	23,00	2,60	2,71	81,45	91,26	1,10	4,97	5,46	5,16	5,68
50	22,48	24,25	2,68	2,78	88,20	98,82	1,10	5,10	5,61	5,30	5,83
51	29,15	31,44	3,05	3,16	130,21	145,90	1,10	5,81	6,39	6,03	6,64

Lisa 2. järg

Jrk. Nr	Sporoteegi nr.	Perek.	liik	Substraat	Asukoht	Pindala FC	CV %	Fluorents (FL3 kanal)	CV%
52	PN1	P.	<i>nigricans</i>	-	Habarovski krai	1 105 949,42	21%	36 088,81	86%
53	PJ1	P.	<i>nigricans</i>	<i>Juglans</i>	Habarovsk Terr.	960 086,01	15%	6 906,74	76%
54	PN-2	P.	<i>nigricans</i>	<i>Populus tremula</i>	Sihhote-Alin	1 129 998,08	15%	13 633,19	49%
55	13	P.	<i>pini</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	Valgamaa,Hargla	1 163 171,63	17%	51 811,27	44%
56	14	P.	<i>pini</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	Valgamaa,Hargla	1 072 455,94	16%	59 539,71	31%
57	15	P.	<i>pini</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	Valgamaa,Hargla	1 153 742,25	13%	78 556,63	19%
58	12	P.	<i>pini</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	Valgamaa,Hargla	1 212 302,43	18%	42 282,42	40%
59	4	P.	<i>pini</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	Valgamaa,Hargla	1 170 250,52	18%	60 370,40	41%
60	5	P.	<i>pini</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	Valgamaa,Hargla	1 152 182,09	14%	61 380,70	33%
61	6	P.	<i>pini</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	Valgamaa,Hargla	1 090 376,45	13%	68 652,13	23%
62	18	P.	<i>pini</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	Valgamaa,Hargla	1 081 193,34	14%	68 474,00	27%
63	19	P.	<i>pini</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	Valgamaa,Hargla	1 051 903,22	13%	74 293,61	26%
64	22	P.	<i>pini</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	Valgamaa,Hargla	1 213 500,54	16%	47 187,43	39%
65	23	P.	<i>pini</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	Valgamaa,Hargla	1 188 826,07	19%	47 792,00	45%
66	332	P.	<i>alni</i>	<i>Alnus incana</i>	Jõgevamaa,Levala	1 004 884,33	21%	42 235,97	44%
67	310	P.	<i>alni</i>	<i>Alnus incana</i>	Jõgevamaa,Levala	1 000 145,38	19%	39 527,29	52%
68	309	P.	<i>alni</i>	<i>Alnus incana</i>	Jõgevamaa,Levala	1 008 038,05	18%	33 292,28	37%
69	101	P.	<i>alni</i>	<i>Alnus incana</i>	Tartumaa, Valg metsa	1 040 931,97	18%	39 757,24	48%
70	104	P.	<i>alni</i>	<i>Alnus incana</i>	Tartumaa, Valg metsa	1 067 345,60	17%	30 357,48	53%
71	107	P.	<i>alni</i>	<i>Alnus incana</i>	Tartumaa, Valg metsa	947 723,77	19%	18 732,37	35%
72	327	P.	<i>alni</i>	<i>Corylus avellana</i>	Levala	1 130 500,26	14%	24 860,63	38%
73	329	P.	<i>alni</i>	<i>Corylus avellana</i>	Levala	1 149 264,54	15%	23 291,76	37%
74	336	P.	<i>alni</i>	<i>Corylus avellana</i>	-	1 057 394,55	18%	51 191,34	37%
75	151449	P.	<i>alni</i>	-	Sihhote-Alin	1 203 149,82	12%	16 997,88	53%
76	151450	P.	<i>alni</i>	-	Sihhote-Alin	1 247 784,91	11%	21 593,74	50%
77	151447	P.	<i>alni</i>	-	Sihhote-Alin	1 208 980,19	11%	20 176,48	56%
78	52519	P.	<i>hartigii</i>	-	Sihhote-Alin	1 246 267,11	10%	103 428,54	31%
79	52721	P.	<i>hartigii</i>	-	Sihhote-Alin	1 085 960,52	10%	88 177,24	51%
80	150121	P.	<i>hartigii</i>	-	Sihhote-Alin	1 198 266,62	11%	10 177,74	22%
81	52717	P.	<i>hartigii</i>	-	Sihhote-Alin	1 174 216,32	12%	94 467,21	29%
82	K58	P.	<i>rius (populica)</i>	<i>Populus tremula</i>	Kardla	893 530,29	18%	20 524,31	55%
83	Nr3 26.06.81	P.	<i>populicola</i>	<i>pop tremula</i>	Järvelja	826 273,03	22%	30 425,88	48%
84	Nr4Ppo-2	P.	<i>populicola</i>	<i>Populus sp.</i>	Järvelja	884 613,33	20%	30 545,39	49%
85	322	P.	<i>populicola</i>	<i>Pupulus tremula</i>	Jõgevamaa	907 539,62	24%	12 392,11	57%
86	151959	P.	<i>populicola</i>	<i>Populus sp</i>	Eesti	954 610,13	17%	10 076,25	65%
87	PPO-1	P.	<i>populicola</i>	<i>Populus sp</i>	Eesti	1 026 897,14	15%	22 322,38	104%
88	870	P.	<i>populicola</i>	<i>Populus tremula</i>	Beloviža Puštša	958 537,13	23%	8 728,60	109%
89	11-24.9.69	P.	<i>populicola</i>	<i>Pupulus tremula</i>	Beloviža Puštša	1 004 856,41	16%	9 162,07	28%
90	103968	P.	<i>chrysoloma</i>	<i>Pinus koraiensis</i>	a, Primorje, Vladivast	969 692,17	13%	27 707,99	38%
91	59627	P.	<i>chrysoloma</i>	<i>Pinus koraiensis</i>	Ussuurimaa, Primorje	864 089,73	16%	33 613,08	33%
92	102611	P.	<i>chrysoloma</i>	<i>Larix dahurica</i>	Sihhote-Alin	1 009 560,97	12%	36680,13	22%
93	102713	P.	<i>chrysoloma</i>	<i>Larix dahurica</i>	Sihhote-Alin	828 099,27	25%	61954,99	43%
94	52764	P.	<i>chrysoloma</i>	<i>Larix ochotensis</i>	Sihhote-Alin	877 377,07	25%	30554,15	72%
95	52751	P.	<i>chrysoloma</i>	<i>Larix sp.</i>	Sihhote-alin	779 853,78	21%	53908,8	42%
96	151482	P.	<i>chrysoloma</i>	<i>Larix sp.</i>	Sihhote-Alin	929 883,41	20%	40565,22	34%
97	151400	P.	<i>chrysoloma</i>	<i>Larix sp.</i>	Sihhote-Alin	961 154,12	19%	37699,92	41%
98	97207	P.	<i>punctatus</i>	<i>Tilia sp.</i>	Raadi	863 094,42	35%	43643,29	67%
99	97203	P.	<i>punctatus</i>	<i>Tilia sp</i>	Raadi	916 907,74	32%	35448,97	96%
100	152336	P.	<i>punctatus</i>	-	Eesti, Raadi	1 184 280,27	27%	114624,7	65%
101	51824	P.	<i>punctatus</i>	<i>Quercus mongolica</i>	Sihhote-Alin	1 212 979,48	13%	99986,48	27%
102	52823	P.	<i>punctatus</i>	<i>Quercus mongolica</i>	Sihhote-Alin	1 200 212,07	6%	98272,58	26%

Lisa 2. järg

Jrk. Nr	Pindala (FC) (µm ²)	Pindala (par) (µm ²)	Raadius (µm)	Raadius (par) (µm)	Ruumala (µm ³)	Ruumala (par) (µm ³)	Q	Laius (µm)	Pikkus (µm)	Laius (par) (µm)	Pikkus (par) (µm)
52	26,17	28,23	2,89	3,00	110,80	124,14	1,10	5,50	6,05	5,72	6,29
53	22,72	24,51	2,69	2,79	89,62	100,41	1,10	5,13	5,64	5,33	5,86
54	26,74	28,85	2,92	3,03	114,43	128,21	1,10	5,56	6,12	5,78	6,36
55	25,47	27,48	2,85	2,96	116,06	130,04	1,20	5,20	6,24	5,40	6,48
56	23,49	25,34	2,73	2,84	102,76	115,13	1,20	4,99	5,99	5,18	6,22
57	25,27	27,26	2,84	2,95	114,66	128,46	1,20	5,18	6,21	5,38	6,45
58	26,55	28,64	2,91	3,02	123,50	138,37	1,20	5,31	6,37	5,51	6,62
59	25,63	27,65	2,86	2,97	117,13	131,23	1,20	5,21	6,26	5,42	6,50
60	25,23	27,22	2,83	2,94	114,42	128,20	1,20	5,17	6,21	5,37	6,45
61	23,88	25,76	2,76	2,86	105,34	118,03	1,20	5,03	6,04	5,23	6,27
62	23,68	25,54	2,75	2,85	104,01	116,54	1,20	5,01	6,01	5,21	6,25
63	23,04	24,85	2,71	2,81	99,82	111,84	1,20	4,94	5,93	5,14	6,16
64	26,58	28,67	2,91	3,02	123,68	138,57	1,20	5,31	6,37	5,52	6,62
65	26,04	28,09	2,88	2,99	119,93	134,37	1,20	5,26	6,31	5,46	6,55
66	22,01	23,74	2,65	2,75	85,43	95,72	1,10	5,05	5,55	5,24	5,77
67	21,90	23,63	2,64	2,74	84,83	95,04	1,10	5,04	5,54	5,23	5,75
68	22,08	23,82	2,65	2,75	85,83	96,17	1,10	5,06	5,56	5,25	5,78
69	22,80	24,59	2,69	2,80	90,07	100,92	1,10	5,14	5,65	5,34	5,87
70	23,38	25,22	2,73	2,83	93,52	104,78	1,10	5,20	5,72	5,40	5,94
71	20,76	22,39	2,57	2,67	78,25	87,67	1,10	4,90	5,39	5,09	5,60
72	24,76	26,71	2,81	2,92	101,94	114,22	1,10	5,35	5,89	5,56	6,12
73	25,17	27,15	2,83	2,94	104,49	117,07	1,10	5,40	5,94	5,61	6,17
74	23,16	24,98	2,72	2,82	92,22	103,32	1,10	5,18	5,70	5,38	5,92
75	26,35	28,42	2,90	3,01	111,92	125,40	1,10	5,52	6,07	5,74	6,31
76	27,33	29,48	2,95	3,06	118,21	132,45	1,10	5,62	6,19	5,84	6,43
77	26,48	28,56	2,90	3,02	112,74	126,32	1,10	5,54	6,09	5,75	6,32
78	28,93	31,21	3,03	3,15	128,79	144,30	1,10	5,79	6,37	6,01	6,61
79	25,21	27,20	2,83	2,94	104,76	117,37	1,10	5,40	5,94	5,61	6,17
80	27,82	30,01	2,98	3,09	121,42	136,04	1,10	5,67	6,24	5,89	6,48
81	27,26	29,41	2,95	3,06	117,78	131,97	1,10	5,62	6,18	5,83	6,42
82	20,06	21,64	2,53	2,62	74,36	83,31	1,10	4,82	5,30	5,01	5,51
83	19,18	21,90	2,47	2,64	75,85	92,51	1,20	4,51	5,41	4,82	5,78
84	20,54	23,45	2,56	2,73	84,02	102,48	1,20	4,67	5,60	4,99	5,99
85	21,07	24,05	2,59	2,77	87,31	106,49	1,20	4,73	5,67	5,05	6,06
86	22,16	25,30	2,66	2,84	94,19	114,88	1,20	4,85	5,82	5,18	6,22
87	24,30	26,22	2,78	2,89	108,14	121,16	1,20	5,08	6,09	5,27	6,33
88	22,25	25,40	2,66	2,84	94,77	115,59	1,20	4,86	5,83	5,19	6,23
89	23,33	26,63	2,73	2,91	101,72	124,06	1,20	4,98	5,97	5,32	6,38
90	22,51	25,70	2,68	2,86	96,43	117,61	1,20	4,89	5,86	5,22	6,27
91	20,06	22,90	2,53	2,70	81,11	98,93	1,20	4,61	5,54	4,93	5,92
92	23,44	26,76	2,73	2,92	102,43	124,94	1,20	4,99	5,98	5,33	6,39
93	19,23	21,95	2,47	2,64	76,10	92,81	1,20	4,52	5,42	4,83	5,79
94	20,37	23,25	2,55	2,72	82,99	101,22	1,20	4,65	5,58	4,97	5,96
95	18,11	20,67	2,40	2,56	69,55	84,82	1,20	4,38	5,26	4,68	5,62
96	21,59	24,64	2,62	2,80	90,55	110,44	1,20	4,79	5,74	5,11	6,14
97	22,31	25,47	2,67	2,85	95,16	116,06	1,20	4,87	5,84	5,20	6,24
98	20,04	21,62	2,53	2,62	74,22	83,16	1,10	4,82	5,30	5,00	5,50
99	21,29	22,96	2,60	2,70	81,27	91,06	1,10	4,96	5,46	5,16	5,67
100	27,50	30,38	2,96	3,11	119,30	138,55	1,10	5,64	6,21	5,93	6,52
101	28,16	30,06	2,99	3,09	123,66	136,37	1,10	5,71	6,28	5,90	6,49
102	27,87	29,66	2,98	3,07	121,72	133,67	1,10	5,68	6,25	5,86	6,45

Lisa 3. Perekond servik (*Pleurotus*) algandmed

Jrk. Nr	Sporoteegi nr.	perek.	liik	Pindala (FC)	CV %	Fluoresents (FL3 kanalil)	CV%	Pindala (μm^2)	Pindala (par) (μm^2)	r (par) (μm)	r (μm)
1	179250	P.	<i>pulmonarius</i>	794673,46	36%	3482,91	29%	19,22	28,37	3,01	2,47
2	157788	P.	<i>pulmonarius</i>	701163,73	40%	35894,73	57%	16,96	25,03	2,82	2,32
3	179795	P.	<i>pulmonarius</i>	745016,44	40%	6812,24	34%	18,02	26,60	2,91	2,40
4	93854	P.	<i>pulmonarius</i>	814609,11	41%	3425,69	19%	19,71	29,08	3,04	2,50
5	107504	P.	<i>pulmonarius</i>	629255,14	45%	3301,54	60%	15,22	22,46	2,67	2,20
6	106162	P.	<i>pulmonarius</i>	691250,93	32%	4032,05	33%	16,72	24,68	2,80	2,31
7	179857	P.	<i>pulmonarius</i>	772674,71	40%	5458,8	29%	18,69	27,58	2,96	2,44
8	178231	P.	<i>pulmonarius</i>	717684,58	41%	1955,33	41%	17,36	25,62	2,86	2,35
9	107453	P.	<i>pulmonarius</i>	530102,46	45%	3822,21	40%	12,82	18,92	2,45	2,02
10	107664	P.	<i>citrinopileatus</i>	560605,39	41%	2832,71	58%	13,56	20,01	2,52	2,08
11	107472	P.	<i>citrinopileatus</i>	586634,28	40%	4071,73	54%	14,19	20,94	2,58	2,13
12	107666	P.	<i>citrinopileatus</i>	749031,32	35%	2914,06	26%	18,12	26,74	2,92	2,40
13	107660	P.	<i>citrinopileatus</i>	518911,14	44%	2100,68	69%	12,55	18,53	2,43	2,00
14	107665	P.	<i>citrinopileatus</i>	774060,99	34%	4187,81	39%	18,72	27,63	2,97	2,44
15	107503	P.	<i>citrinopileatus</i>	514832,66	39%	2504,78	58%	12,45	18,38	2,42	1,99
16	107542	P.	<i>citrinopileatus</i>	751329,23	33%	3602,99	38%	18,18	26,82	2,92	2,41
17	107451	P.	<i>citrinopileatus</i>	724505,23	37%	2670,85	27%	17,53	25,87	2,87	2,36
18	157982	P.	<i>dryinus</i>	1121632,12	20%	7043,35	30%	27,13	40,04	3,57	2,94
19	157732	P.	<i>dryinus</i>	1161614,20	19%	8735,39	23%	28,10	41,47	3,63	2,99
20	157981	P.	<i>dryinus</i>	1193501,70	17%	11750,72	30%	28,87	42,61	3,68	3,03
21	157982	P.	<i>dryinus</i>	1004432,12	20%	1739,46	147%	24,30	35,86	3,38	2,78
22	147333	P.	<i>dryinus</i>	1104862,31	20%	7793,37	27%	26,73	39,44	3,54	2,92
23	157719	P.	<i>dryinus</i>	1106540,09	20%	7597,23	56%	26,77	39,50	3,55	2,92
24	9135	P.	<i>ostreatus</i>	867709,24	32%	1776,41	156%	20,66	30,50	3,12	2,56
25	107777	P.	<i>ostreatus</i>	702670,00	36%	11315,4	222%	16,73	24,69	2,80	2,31
26	151033	P.	<i>ostreatus</i>	799263,54	33%	15522,85	534%	19,03	28,09	2,99	2,46
27	175016	P.	<i>ostreatus</i>	813788,55	40%	4052,83	99%	19,38	28,60	3,02	2,48
28	159565	P.	<i>ostreatus</i>	815385,68	41%	2842,62	211%	19,42	28,66	3,02	2,49
29	151089	P.	<i>ostreatus</i>	745952,67	43%	2267,07	364%	17,76	26,22	2,89	2,38
30	125925	P.	<i>ostreatus</i>	776937,85	38%	2993,1	305%	18,50	27,31	2,95	2,43
31	77603	P.	<i>ostreatus</i>	954294,87	31%	3105,11	123%	22,73	33,54	3,27	2,69
32	150933	P.	<i>ostreatus</i>	784703,94	34%	4230,15	185%	18,69	27,58	2,96	2,44
33	179856	P.	<i>ostreatus</i>	861290,55	36%	4599,81	88%	20,51	30,27	3,10	2,56
34	150066	P.	<i>ostreatus</i>	829749,97	33%	7411,26	229%	19,76	29,16	3,05	2,51
35	126992	P.	<i>ostreatus</i>	769841,49	38%	8453,42	61%	18,33	27,06	2,93	2,42
36	142824-PV	P.	<i>ostreatus</i>	833743,24	39%	12216,91	119%	19,85	29,30	3,05	2,51
37	104386	P.	<i>eryngi</i>	1183771,35	41%	45773,47	70%	28,19	40,51	3,59	3,00
38	C01x	P.	<i>eryngi</i>	1039937,37	45%	8106,69	60%	24,76	35,59	3,37	2,81
39	141163	P.	<i>calyptratus</i>	982164,66	32%	22616,61	32%	23,39	34,07	3,29	2,73
40	157761	P.	<i>calyptratus</i>	981832,16	24%	37395,83	82%	23,38	34,05	3,29	2,73

Lisa 3. järg

Jrk. Nr	D (par) (μm)	D (μm)	Q (Hilber 1982)	Ruumala (μm^3)	Ruumala (par) (μm^3)	Laius (μm)	Pikkus (μm)	Laius (par) (μm)	Pikkus (par) (μm)
1	6,01	4,95	2,53	160,41	287,59	3,11	7,87	3,78	9,56
2	5,65	4,65	2,53	132,95	238,35	2,92	7,39	3,55	8,98
3	5,82	4,79	2,53	145,61	261,06	3,01	7,62	3,66	9,26
4	6,09	5,01	2,53	166,49	298,48	3,15	7,97	3,83	9,68
5	5,35	4,40	2,53	113,03	202,64	2,77	7,00	3,36	8,51
6	5,61	4,61	2,53	130,14	233,32	2,90	7,34	3,52	8,92
7	5,93	4,88	2,53	153,80	275,73	3,07	7,76	3,73	9,43
8	5,71	4,70	2,53	137,67	246,83	2,96	7,48	3,59	9,08
9	4,91	4,04	2,53	87,40	156,69	2,54	6,43	3,09	7,81
10	5,05	4,16	2,43	91,29	163,67	2,67	6,48	3,24	7,87
11	5,16	4,25	2,43	97,72	175,20	2,73	6,63	3,31	8,05
12	5,83	4,80	2,43	140,99	252,77	3,08	7,49	3,74	9,10
13	4,86	4,00	2,43	81,30	145,75	2,56	6,23	3,12	7,57
14	5,93	4,88	2,43	148,12	265,55	3,13	7,61	3,81	9,25
15	4,84	3,98	2,43	80,34	144,04	2,55	6,21	3,10	7,54
16	5,84	4,81	2,43	141,64	253,94	3,09	7,50	3,75	9,11
17	5,74	4,72	2,43	134,12	240,46	3,03	7,36	3,68	8,95
18	7,14	5,88	2,95	313,64	562,30	3,42	10,10	4,16	12,26
19	7,27	5,98	2,95	330,56	592,63	3,48	10,27	4,23	12,48
20	7,37	6,06	2,95	344,26	617,20	3,53	10,41	4,29	12,65
21	6,76	5,56	2,95	265,79	476,51	3,24	9,55	3,93	11,61
22	7,09	5,83	2,95	306,63	549,74	3,40	10,02	4,13	12,17
23	7,09	5,84	2,95	307,33	550,99	3,40	10,03	4,13	12,18
24	6,23	5,13	2,71	191,49	343,30	3,12	8,44	3,79	10,26
25	5,61	4,62	2,71	139,54	250,18	2,80	7,60	3,41	9,23
26	5,98	4,92	2,71	169,28	303,50	2,99	8,10	3,63	9,84
27	6,03	4,97	2,71	173,92	311,81	3,02	8,18	3,67	9,93
28	6,04	4,97	2,71	174,43	312,73	3,02	8,19	3,67	9,94
29	5,78	4,76	2,71	152,63	273,64	2,89	7,83	3,51	9,51
30	5,90	4,85	2,71	162,24	290,87	2,95	7,99	3,58	9,71
31	6,53	5,38	2,71	220,85	395,95	3,27	8,86	3,97	10,76
32	5,93	4,88	2,71	164,68	295,24	2,96	8,03	3,60	9,75
33	6,21	5,11	2,71	189,37	339,50	3,10	8,41	3,77	10,22
34	6,09	5,02	2,71	179,06	321,03	3,05	8,26	3,70	10,03
35	5,87	4,83	2,71	160,02	286,89	2,93	7,95	3,57	9,66
36	6,11	5,03	2,71	180,35	323,35	3,05	8,28	3,71	10,06
37	7,18	5,99	2,35	264,59	455,88	3,91	9,18	4,69	11,01
38	6,73	5,62	2,35	217,87	375,37	3,66	8,61	4,39	10,32
39	6,59	5,46	2,54	216,13	379,91	3,42	8,70	4,13	10,50
40	6,58	5,46	2,54	216,02	379,72	3,42	8,70	4,13	10,49

Lisa 4. Paranduskoefitsientide arvutused kasutades Q (Carl Kullman 2015)

90°	Q	1,00	1,05	1,100	1,15	1,20	1,25	1,30	1,35	1,40
Jaotus	Alph									
1	0	0,79	0,82	0,86	0,90	0,94	0,98	1,02	1,06	1,10
2	3	0,79	0,82	0,86	0,90	0,94	0,98	1,02	1,06	1,10
3	6	0,79	0,82	0,86	0,90	0,94	0,98	1,02	1,05	1,09
4	9	0,79	0,81	0,85	0,89	0,93	0,97	1,01	1,05	1,09
5	12	0,79	0,81	0,85	0,88	0,92	0,96	1,00	1,04	1,08
6	15	0,79	0,80	0,83	0,87	0,91	0,95	0,99	1,02	1,06
7	18	0,79	0,79	0,82	0,86	0,90	0,93	0,97	1,01	1,05
8	21	0,79	0,79	0,81	0,84	0,88	0,92	0,95	0,99	1,03
9	24	0,79	0,79	0,79	0,83	0,86	0,90	0,93	0,97	1,00
10	27	0,79	0,79	0,79	0,80	0,84	0,87	0,91	0,94	0,98
11	30	0,79	0,79	0,79	0,79	0,82	0,85	0,88	0,92	0,95
12	33	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,82	0,86	0,89	0,92
13	36	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,83	0,86	0,89
14	39	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,82	0,85
15	42	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,82
16	45	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
17	48	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
18	51	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
19	54	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
20	57	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
21	60	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
22	63	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
23	66	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
24	69	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
25	72	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
26	75	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
27	78	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
28	81	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
29	84	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
30	87	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
31	90	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
	Sv	0,79	0,79	0,80	0,81	0,83	0,84	0,86	0,87	0,89
	TF	1,00	0,96	0,93	0,90	0,88	0,86	0,84	0,82	0,81
	Smik	1,00	1,04	1,08	1,11	1,14	1,17	1,19	1,22	1,24
	S Lp	0,00	0,01	0,03	0,04	0,06	0,08	0,09	0,11	0,13
	Telg	1,00	1,00	1,01	1,02	1,03	1,03	1,04	1,05	1,06
	Vk	0,52	0,53	0,54	0,55	0,56	0,58	0,60	0,61	0,63
	Ve	0,52	0,55	0,58	0,60	0,63	0,65	0,68	0,71	0,73
	Viga	1,00	1,04	1,07	1,09	1,11	1,13	1,14	1,15	1,16

Lisa 4. järg

90°	Q	1,45	1,50	1,55	1,60	1,65	1,70	1,75	1,80	1,85	1,90
Jaotus	Alph										
1	0	1,14	1,18	1,22	1,26	1,30	1,34	1,37	1,41	1,45	1,49
2	3	1,14	1,18	1,22	1,25	1,29	1,33	1,37	1,41	1,45	1,49
3	6	1,13	1,17	1,21	1,25	1,29	1,33	1,37	1,41	1,45	1,48
4	9	1,12	1,16	1,20	1,24	1,28	1,32	1,36	1,40	1,44	1,47
5	12	1,11	1,15	1,19	1,23	1,27	1,31	1,34	1,38	1,42	1,46
6	15	1,10	1,14	1,18	1,21	1,25	1,29	1,33	1,37	1,40	1,44
7	18	1,08	1,12	1,16	1,20	1,23	1,27	1,31	1,34	1,38	1,42
8	21	1,06	1,10	1,14	1,17	1,21	1,25	1,28	1,32	1,36	1,39
9	24	1,04	1,08	1,11	1,15	1,18	1,22	1,26	1,29	1,33	1,36
10	27	1,01	1,05	1,08	1,12	1,15	1,19	1,22	1,26	1,29	1,33
11	30	0,99	1,02	1,05	1,09	1,12	1,16	1,19	1,22	1,26	1,29
12	33	0,96	0,99	1,02	1,05	1,09	1,12	1,15	1,19	1,22	1,25
13	36	0,92	0,95	0,98	1,02	1,05	1,08	1,11	1,14	1,18	1,21
14	39	0,89	0,92	0,95	0,98	1,01	1,04	1,07	1,10	1,13	1,16
15	42	0,85	0,88	0,90	0,93	0,96	0,99	1,02	1,05	1,08	1,11
16	45	0,81	0,83	0,86	0,89	0,92	0,94	0,97	1,00	1,03	1,06
17	48	0,79	0,79	0,81	0,84	0,87	0,89	0,92	0,95	0,97	1,00
18	51	0,79	0,79	0,79	0,79	0,82	0,84	0,86	0,89	0,91	0,94
19	54	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,81	0,83	0,85	0,88
20	57	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,81
21	60	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
22	63	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
23	66	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
24	69	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
25	72	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
26	75	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
27	78	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
28	81	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
29	84	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
30	87	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
31	90	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
	Sv	0,91	0,93	0,94	0,96	0,98	1,00	1,02	1,04	1,07	1,09
	TF	0,80	0,79	0,78	0,77	0,76	0,75	0,75	0,74	0,73	0,73
	Smik	1,26	1,27	1,29	1,30	1,32	1,33	1,34	1,35	1,36	1,37
	S Lp	0,14	0,16	0,18	0,19	0,21	0,22	0,24	0,26	0,27	0,29
	Telg	1,07	1,09	1,10	1,11	1,12	1,13	1,14	1,15	1,16	1,18
	Vk	0,65	0,67	0,69	0,71	0,73	0,76	0,78	0,80	0,83	0,85
	Ve	0,76	0,79	0,81	0,84	0,86	0,89	0,92	0,94	0,97	0,99
	Viga	1,17	1,17	1,17	1,18	1,18	1,18	1,18	1,17	1,17	1,17

Lisa 4. järg

90°	Q	1,95	2,00	2,05	2,10	2,15	2,20	2,25	2,30	2,35	2,40	2,45
Jaotus	Alph											
1	0	1,53	1,57	1,61	1,65	1,69	1,73	1,77	1,81	1,85	1,88	1,92
2	3	1,53	1,57	1,61	1,65	1,69	1,73	1,76	1,80	1,84	1,88	1,92
3	6	1,52	1,56	1,60	1,64	1,68	1,72	1,76	1,80	1,84	1,87	1,91
4	9	1,51	1,55	1,59	1,63	1,67	1,71	1,75	1,78	1,82	1,86	1,90
5	12	1,50	1,54	1,57	1,61	1,65	1,69	1,73	1,77	1,81	1,84	1,88
6	15	1,48	1,52	1,56	1,59	1,63	1,67	1,71	1,74	1,78	1,82	1,86
7	18	1,46	1,49	1,53	1,57	1,61	1,64	1,68	1,72	1,76	1,79	1,83
8	21	1,43	1,47	1,50	1,54	1,58	1,61	1,65	1,69	1,72	1,76	1,80
9	24	1,40	1,43	1,47	1,51	1,54	1,58	1,61	1,65	1,69	1,72	1,76
10	27	1,36	1,40	1,43	1,47	1,50	1,54	1,57	1,61	1,64	1,68	1,71
11	30	1,33	1,36	1,39	1,43	1,46	1,50	1,53	1,56	1,60	1,63	1,67
12	33	1,28	1,32	1,35	1,38	1,42	1,45	1,48	1,51	1,55	1,58	1,61
13	36	1,24	1,27	1,30	1,33	1,37	1,40	1,43	1,46	1,49	1,52	1,56
14	39	1,19	1,22	1,25	1,28	1,31	1,34	1,37	1,40	1,43	1,46	1,50
15	42	1,14	1,17	1,20	1,23	1,25	1,28	1,31	1,34	1,37	1,40	1,43
16	45	1,08	1,11	1,14	1,17	1,19	1,22	1,25	1,28	1,31	1,33	1,36
17	48	1,02	1,05	1,08	1,10	1,13	1,16	1,18	1,21	1,24	1,26	1,29
18	51	0,96	0,99	1,01	1,04	1,06	1,09	1,11	1,14	1,16	1,19	1,21
19	54	0,90	0,92	0,95	0,97	0,99	1,02	1,04	1,06	1,08	1,11	1,13
20	57	0,83	0,86	0,88	0,90	0,92	0,94	0,96	0,98	1,01	1,03	1,05
21	60	0,79	0,79	0,81	0,82	0,84	0,86	0,88	0,90	0,92	0,94	0,96
22	63	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,80	0,82	0,84	0,86	0,87
23	66	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
24	69	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
25	72	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
26	75	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
27	78	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
28	81	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
29	84	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
30	87	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
31	90	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
	Sv	1,11	1,13	1,15	1,17	1,19	1,22	1,24	1,26	1,28	1,31	1,33
	TF	0,72	0,72	0,71	0,71	0,71	0,70	0,70	0,70	0,70	0,69	0,69
	Smik	1,38	1,39	1,40	1,41	1,41	1,42	1,43	1,43	1,44	1,44	1,45
	S Lp	0,30	0,32	0,33	0,35	0,36	0,38	0,39	0,41	0,42	0,44	0,45
	Telg	1,19	1,20	1,21	1,22	1,23	1,24	1,26	1,27	1,28	1,29	1,30
	Vk	0,88	0,90	0,93	0,96	0,98	1,01	1,04	1,07	1,09	1,12	1,15
	Ve	1,02	1,05	1,07	1,10	1,13	1,15	1,18	1,20	1,23	1,26	1,28
	Viga	1,16	1,16	1,16	1,15	1,15	1,14	1,14	1,13	1,12	1,12	1,11

Lisa 4. järg

90°	Q	2,50	2,55	2,60	2,65	2,70	2,75	2,80	2,85	2,90	2,95
Jaotus	Alph										
1	0	1,96	2,00	2,04	2,08	2,12	2,16	2,20	2,24	2,28	2,32
2	3	1,96	2,00	2,04	2,08	2,12	2,16	2,20	2,24	2,27	2,31
3	6	1,95	1,99	2,03	2,07	2,11	2,15	2,19	2,23	2,27	2,30
4	9	1,94	1,98	2,02	2,06	2,09	2,13	2,17	2,21	2,25	2,29
5	12	1,92	1,96	2,00	2,04	2,07	2,11	2,15	2,19	2,23	2,27
6	15	1,90	1,93	1,97	2,01	2,05	2,09	2,12	2,16	2,20	2,24
7	18	1,87	1,90	1,94	1,98	2,02	2,05	2,09	2,13	2,17	2,20
8	21	1,83	1,87	1,91	1,94	1,98	2,02	2,05	2,09	2,13	2,16
9	24	1,79	1,83	1,87	1,90	1,94	1,97	2,01	2,04	2,08	2,12
10	27	1,75	1,78	1,82	1,85	1,89	1,92	1,96	1,99	2,03	2,06
11	30	1,70	1,73	1,77	1,80	1,84	1,87	1,90	1,94	1,97	2,01
12	33	1,65	1,68	1,71	1,75	1,78	1,81	1,84	1,88	1,91	1,94
13	36	1,59	1,62	1,65	1,68	1,72	1,75	1,78	1,81	1,84	1,87
14	39	1,53	1,56	1,59	1,62	1,65	1,68	1,71	1,74	1,77	1,80
15	42	1,46	1,49	1,52	1,55	1,58	1,61	1,63	1,66	1,69	1,72
16	45	1,39	1,42	1,44	1,47	1,50	1,53	1,56	1,58	1,61	1,64
17	48	1,31	1,34	1,37	1,39	1,42	1,45	1,47	1,50	1,52	1,55
18	51	1,24	1,26	1,29	1,31	1,33	1,36	1,38	1,41	1,43	1,46
19	54	1,15	1,18	1,20	1,22	1,25	1,27	1,29	1,32	1,34	1,36
20	57	1,07	1,09	1,11	1,13	1,15	1,18	1,20	1,22	1,24	1,26
21	60	0,98	1,00	1,02	1,04	1,06	1,08	1,10	1,12	1,14	1,16
22	63	0,89	0,91	0,93	0,94	0,96	0,98	1,00	1,02	1,03	1,05
23	66	0,80	0,81	0,83	0,85	0,86	0,88	0,89	0,91	0,93	0,94
24	69	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,80	0,82	0,83
25	72	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
26	75	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
27	78	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
28	81	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
29	84	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
30	87	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
31	90	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79	0,79
	Sv	1,35	1,38	1,40	1,42	1,44	1,47	1,49	1,51	1,54	1,56
	TF	0,69	0,69	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,67	0,67
	Smik	1,45	1,46	1,46	1,46	1,47	1,47	1,48	1,48	1,48	1,48
	S Lp	0,47	0,48	0,50	0,51	0,53	0,54	0,56	0,57	0,58	0,60
	Telg	1,31	1,32	1,33	1,35	1,36	1,37	1,38	1,39	1,40	1,41
	Vk	1,18	1,21	1,24	1,27	1,31	1,34	1,37	1,40	1,43	1,47
	Ve	1,31	1,34	1,36	1,39	1,41	1,44	1,47	1,49	1,52	1,54
	Viga	1,11	1,10	1,09	1,09	1,08	1,08	1,07	1,07	1,06	1,05

Lisa 4. järg

Lisa 4 lühendite selgitused:

S_v – keskmine varjupindala

TF – keskmise varjupindala (mõõdetuna tsütomeetris) suhe külgvaates eose pindalasse (mõõdetuna mikroskoobis)

S_{mik} – pikema külje projektsiooni suhe keskmise varjupindalaga (mõõdetuna tsütomeetris) vastavalt Q väärtusele

S_{Lp} – lapikuse aste

telg Q - varju suurusest lähtuvalt Q kaudu saadud teljed (pikem telg).

V_k - ruumala arvestades, et tegu on kera varjuga

V_e – ruumala teades Q

Viga - süstemaatiline viga ruumala arvutamisel

Lisa 5. Intaktsete tuumade DNA- sisaldus ja genoomi suurus (perekond servik)

Tuuma DNA sisaldus	Sporoteegi number	PI fluoresents (FL3 kanalis) (sü)	Tsütomeetris saadud pindala FSC kanalis (sü)
Kogusisaldus	126992	5116,73	128058,32
G1	126992	3126,06	83055,81
Kogusisaldus	77603	3426,53	120566,35
G1	77603	2076,71	84571,48
Kogusisaldus	179856	5821,34	115376,41
G1	179856	4712,38	81696,47
Kogusisaldus	151089	2908,78	100783,11
G1	151089	2392,5	77036,61
Kogusisaldus	107777	4818,61	159978,13
S-faas	107777	5316,57	134290,81
Kogusisaldus	175016	4884,93	163912,43
Sfaas domin	175016	5143,99	109449,02
Kogusisaldus	151033	2937,3	121062,42
G1	151033	2176,96	70147,92
Kogusisaldus	125925	3483,61	144490,15
G1	125925	2876,06	94068,42
Kogusisaldus	150066	3074,43	140246,56
G1	150066	2491,15	94443,52
Kogusisaldus	150933	2937,3	121062,42
G1	150933	2176,96	70147,92
G1	179798	5854,73	103548,41
Kogusisaldus	179798	7280,89	166553,73
G1	106162	3470,2	125063,53
Kogusisaldus	106162	3341,06	154514,33
G1	107504	3267,12	120441,42
Kogusisaldus	107504	3596,44	168844,88
G1	179231	5293,19	114693,45
Kogusisaldus	179231	6120,99	170532,66
G1	157788	3361,29	97659,37
Kogusisaldus	157788	3481,9	125493,29
g1	93854	3121,15	106145,64
Kogusisaldus	93854	3441,47	135220,18

Lisa 6. F-test ja Studenti t-test mikroskoobi ja tsütomeetri pindalade võrdlemiseks (perekond taelik)

F-test	Pindala(mik)	Pindala FC
Keskmine	26,0788	25,4646
Dispersioon	19,4729	13,9084
Valimi maht	19	19
Vabadusastmete arv	18	18
F-statistik	1,4001	
Olulisuse tõenäosus	0,2412	
F-statistiku kriitiline väärtus	2,2172	

Studenti t-test	Pindala(mik)	Pindala FC
Keskmine	26,0788	25,4646
Dispersioon	19,4729	13,9084
Vaatluste arv	19	19
Pearsoni korrelatsioon	0,8915	
Oletatav keskväärtuste erinevus	0,0000	
Vabadusastmete arv	18,0000	
t-statistik	1,3323	
Olulisuse tõenäosus ühepoolse hüpoteesi korral	0,0997	
t-statistiku kriitiline väärtus olulisuse nivoo 0,05 korral	1,7341	
Olulisuse tõenäosus kahepoolse hüpoteesi korral	0,1994	
t-statistiku kriitiline väärtus olulisuse nivoo 0,05 korral	2,1009	

Lisa 7. F-test ja Studenti t-test parandatud ja parandamata pindalade võrdlemiseks (perekond servik)

F-test	Parandatud piundala	Parandamata
Keskmine	29,1849	19,8256
Dispersioon	41,1166	19,4434
Valimi maht	40	40
Vabadusastmete arv	39	39
F-statistik	2,1147	
Olulisuse tõenäosus	0,0108	
F-statistiku kriitiline väärtus	1,7045	

Studenti t-test	Parandatud pindala	Parandamata
Keskmine	29,1849	19,8256
Dispersioon	41,1166	19,4434
Vaatluste arv	40	40
Pearsoni korrelatsioon	0,9994	
Oletatav keskväärtuste erinevus	0	
Vabadusastmete arv	39	
t-statistik	29,4329	
Olulisuse tõenäosus ühepoolse hüpoteesi korral	0,0000	
t-statistiku kriitiline väärtus olulisuse nivoo 0,05 korral	1,6849	
Olulisuse tõenäosus kahepoolse hüpoteesi korral	0,0000	
t-statistiku kriitiline väärtus olulisuse nivoo 0,05 korral	2,0227	

Lisa 8. *P. ostreatus* ja *P. pulmonarius* tuumade ruumala ja genoomi suuruse vaheline regressioonanalüüs

Regressiooni statistikud						
Korrelatsioonikordaja r	0,7545					
Derminatsioonikordaja r ²	0,5693					
r ² nihutamata hinnang	0,5214					
Jääkstandardhälve	0,4930					
Vaatluste arv	11					

	Vabadusastmete arv	Hälvete ruutude summa	Keskruut	F-statistik	Mudeli olulisuse tõenäosus
Regressioonsirge	1	2,8912	2,8912	11,8959	0,0073
Prognoosijäägid	9	2,1874	0,2430		
Kokku	10	5,0786			

	Parameetri hinnang	Hinnangu standardviga	t-statistik	Olulisuse tõenäosus	Alumine 95%-usaldusapiir	Ülemine 95%-usalduspiir
Vabaliige b ₀	-0,3544	0,8822	-0,4018	0,6972	-2,3501	1,6412
Sirge tõus b ₁	0,1047	0,0304	3,4490	0,0073	0,0360	0,1734

Märkus: Tuuma ruumala ja genoomi suuruse (G1) vaheline seos, kus tuuma ruumala on funktsioontunnus ja genoomisuurus on argumenttunnus

Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Mina, Kati Kungas, sünniaeg 29.04.1992,

1. annan Eesti Maaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud lõputöö „Voolutsütomeetria rakendamine genoomi ja eose suuruste mõõtmiseks valitud kandseente gruppides“,

mille juhendaja on Bellis Kullman,

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 Kati Kungas

Tartu, 18.05.2016

Juhendaja kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Luban lõputöö kaitsmisele.

(juhendaja nimi ja allkiri) (kuupäev)