

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ –ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ,
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»**

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΜΥΚΗΤΩΝ ΚΑΙ
ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕ ΒΙΟΑΛΛΟΙΩΣΗ ΙΣΤΟΡΙΚΩΝ
ΧΕΙΡΟΓΡΑΦΩΝ»**

ΚΑΡΑΚΑΣΙΔΟΥ ΚΥΡΙΑΚΗ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ, ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2011

«Μελέτη της ποικιλότητας μυκήτων και συσχέτιση της με βιοαλλοίωση ιστορικών χειρόγραφων»

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Μόσιαλος Δημήτριος,

Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων
τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

Μαρκουλάτος Παναγιώτης,

Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη
Βιοτεχνολογία
τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

Καρπούζας Δημήτριος,

Επίκουρος Καθηγητής Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας &
Βιοτεχνολογίας
τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας το χρονικό διάστημα Μάρτιος 2011 – Ιανουάριος 2012.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Μόσιαλο Δημήτριο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση αυτής της διπλωματικής και για την ευκαιρία που μου έδωσε να βιώσω αυτή τη μοναδική εργαστηριακή εμπειρία.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη και κ Καρπούζα Δημήτριο.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τη βιοχημικό-βιοτεχνολόγο κα Νικολούλη Αικατερίνη για την πολύτιμη βοήθεια της κατά την εκπόνηση του εργαστηριακού πειράματος, για το χρόνο που μου διέθεσε και για την ευχάριστη, φιλική συνεργασία.

Ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Μικροβιολογίας-Ιολογίας για την ευχάριστη συνεργασία.

Το πιο μεγάλο ευχαριστώ δικαιωματικά το αφιερώνω στην οικογένειά μου. Θα ήθελα να τους ευχαριστήσω για τη δυνατότητα που μου δίνουν να ασχοληθώ με την αναζήτηση της γνώσης σε δύσκολες οικονομικά συγκυρίες και για την ψυχολογική, ηθική, συναισθηματική συμπαράσταση τους.

*Στους γονείς μου, Χρήστο και Μαρία
Στον ιερομόναχο, πατέρα Αιμιλιανό*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	7
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	8
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	9
ABSTRACT.....	10
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1 Πολιτιστική κληρονομιά και φθορά.....	11
1.2 Ορισμός της βιοαλλοίωσης.....	12
1.3 Ταξινόμηση της βιοαλλοίωσης.....	13
1.4 Υλικά που υφίστανται βιοαλλοίωση.....	14
1.5 Μικροβιακή Ποικιλότητα.....	14
1.6 Βιοφίλμ.....	15
1.7 Scripta manent..... τα γραπτά μένουν.....	16
1.8 Βιοαλλοίωση του χαρτιού.....	16
1.9 Το φαινόμενο “foxing”.....	17
1.10 Μύκητες: παράγοντες βιοαλλοίωσης.....	20
1.11 Μύκητες και βιοαλλοίωση του χαρτιού.....	22
1.12 Η κυτταρίνη και η αποικοδόμηση της.....	25
1.13 Μοριακή ανίχνευση μικροοργανισμών.....	27
1.14 ITS περιοχές.....	29
1.15 Συντήρηση του βιοαλλοιωμένου χαρτιού.....	30
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	32
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
3.1 Χειρόγραφα.....	33
3.1.1 Δειγματοληψία.....	35
3.2 Καλλιέργεια μυκήτων.....	35
3.2.1 Θρεπτικό υλικό.....	35
3.2.2 Στρεπτομυκίνη (stm).....	36
3.2.3 Stock γλυκερόλης των μυκήτων.....	37
3.2.4 Ανακαλλιέργεια μυκήτων από stock γλυκερόλης.....	37
3.3 Μοριακή ταυτοποίηση μυκήτων.....	38
3.3.1 Απομόνωση DNA από τις αποικίες των μυκήτων.....	38
3.3.2 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 0.8% w/v.....	38

3.3.3 Ενίσχυση της περιοχής ITS των μυκήτων με PCR χρησιμοποιώντας τα ζεύγη εκκινητών ITS1- ITS4 (για 15 μύκητες) και ITS1F-NLB4 (για 2 μύκητες).....	40
3.3.4 Καθαρισμός των προϊόντων PCR.....	42
3.3.5 Αλληλούχιση και ανάλυση των αλληλουχιών με προγράμματα βιοληροφορικής.....	42
3.4 Απομόνωση DNA απευθείας από το χαρτί.....	42
3.4.1 Ενίσχυση με PCR του DNA που απομονώνεται από τα χειρόγραφα.....	43
3.4.2. Καθαρισμός των προϊόντων PCR.....	44
3.5 Κλωνοποίηση.....	44
3.5.1 Ligation.....	44
3.5.2 Μετασηματισμός.....	45
3.5.2.1 Τα στάδια του μετασηματισμού.....	45
3.5.2.2 Προετοιμασία Δεκτικών Κυττάρων <i>E. coli</i> στέλεχος JM109.....	46
3.5.2.3 Προετοιμασία τρυβλίων Petri με LB άγαρ, Αμπικιλίνη, IPTG και X-gal.....	48
3.5.3 Έλεγχος Αποικιών.....	48
3.5.4 Έλεγχος των λευκών αποικιών.....	49
3.5.5 Συλλογή λευκών αποικιών.....	52
3.5.6 Απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA.....	53
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
4.1 Καλλιέργεια μυκήτων.....	55
4.2 Απομόνωση DNA από τους καλλιεργήσιμους μύκητες και ενίσχυση της περιοχής ITS των μυκήτων.....	57
4.3 Ανάλυση των αλληλουχιών.....	59
4.4 Απομόνωση DNA απευθείας από το χαρτί.....	71
4.5 Δημιουργία βιβλιοθήκης.....	72
4. 6 Χειρόγραφο Δείγμα 1.....	72
4. 7 Χειρόγραφο Δείγμα 4.....	74
4. 8 Κάλυψη κλώνων βιβλιοθήκης.....	76
4.8.1. Υπολογισμός κάλυψης της βιβλιοθήκης του χειρόγραφου Δείγμα 1.....	76
4.8.2. Υπολογισμός κάλυψης της βιβλιοθήκης του χειρόγραφου Δείγμα 4.....	77
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	78
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	83
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	96

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Φυλογενετικό δέντρο, δείχνει τις τρεις επικράτειες των ζωντανών οργανισμών: Βακτήρια, Αρχαία, Ευκάρυα.

Εικόνα 2: Χρωματικές κηλίδες σε χειρόγραφο του 18^{ου} αιώνα

Εικόνα 3: Μερικά από τα ονόματα των πρώτων ειδών μυκήτων που ανακαλύφθηκαν και αναφέρονται σε χαρτί το 19^ο αιώνα.

Εικόνα 4: Σύνοψη της περιοχής ITS των μυκήτων. Η ITS1 βρίσκεται μεταξύ του 3' άκρου του nSSU(18S) γονιδίου και του 5' άκρου του 5.8S γονιδίου. Η ITS2 βρίσκεται μεταξύ του 3' άκρου του 5.8S γονιδίου του nSSU(18S) γονιδίου και του 5' άκρου του nLSU(28S).

Εικόνα 5 : Χειρόγραφο Δείγμα 1

Εικόνα 6 : Χειρόγραφο Δείγμα 3

Εικόνα 7: ο χάρτης του φορέα pGEM T-Easy

Εικόνα 8: Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης ολικού DNA μυκήτων

Εικόνα 9 α, β: Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR (primers: ITS1-ITS4)

Εικόνα 10 : Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR (primers: ITS1-F –NLB4)

Εικόνα 11: Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης καθαρισμένων προϊόντων PCR

Εικόνα 12: Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR (primers: ITS1-F –NLB4) για το χειρόγραφο Δείγμα 4

Εικόνα 13: Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης προϊόντων πέψης.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Τα 5 χειρόγραφα που μελετήθηκαν.

Πίνακας 2: Σύσταση θρεπτικού υλικού

Πίνακας 3: Τα συστατικά της αντίδρασης PCR με το ζεύγος εκκινητών ITS1-ITS4

Πίνακας 4: Τα συστατικά της αντίδρασης PCR με το ζεύγος εκκινητών ITS1-F-NLB4

Πίνακας 5: Τα στάδια της PCR.

Πίνακας 6: Οι εκκινητές και οι αλληλουχίες τους.

Πίνακας 7: Τα συστατικά της αντίδρασης PCR για τα χειρόγραφα Δείγμα 1 και 4.

Πίνακας 8: Τα συστατικά της αντίδρασης PCR για το χειρόγραφο Δείγμα 2.

Πίνακας 9 : Η αντίδραση του Ligation.

Πίνακας 10: Τα συστατικά του TfbI.

Πίνακας 11: Τα συστατικά του TfbII.

Πίνακας 12: Το master mix για το χειρόγραφο Δείγμα 1.

Πίνακας 13: Το master mix για το χειρόγραφο Δείγμα 2.

Πίνακας 14: Το master mix για το χειρόγραφο Δείγμα 4.

Πίνακας 15: Τα στάδια της αντίδρασης της Colony PCR.

Πίνακας 16: Η κατανομή των μυκήτων με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά σε καθένα από τα 5 χειρόγραφα που μελετήθηκαν.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σε όλο τον κόσμο, υλικό αρχείων και μουσείων με πρώτη ύλη το χαρτί υφίσταται βιοαλλοίωση από μικροοργανισμούς, κυρίως από μύκητες. Η επίδραση των μικροοργανισμών στο χαρτί προκαλεί διαφορετικές μορφές αλλοίωσης ανάλογα με τον υπεύθυνο κάθε φορά οργανισμό. Μύκητες οι οποίοι, συχνά, σχετίζονται με την αλλοίωση του χαρτιού είναι ικανοί να αποικοδομούν την κυτταρίνη παράγοντας κυτταρινολυτικά ένζυμα ή εκκρίνουν χρωστικές και/ή οργανικά οξέα που αποχρωματίζουν το χαρτί και καταστρέφουν αντικείμενα πολιτιστικής κληρονομιάς από χαρτί.

Στην παρούσα εργασία προσπαθήσαμε, για πρώτη φορά, να καθορίσουμε την ποικιλότητα των μυκήτων σε Ελληνικά ιστορικά χειρόγραφα προερχόμενα από το Γενικό Αρχείο του Κράτους (Αθήνα). Αναλύθηκαν 5 χειρόγραφα του 19^{ου} και 20^{ου} αιώνα. Η ανάπτυξη των μυκήτων πραγματοποιήθηκε με κλασσικές τεχνικές που βασίζονται στις καλλιέργειες μυκήτων σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα. Με τις καλλιέργειες μόνο ένας μικρός αριθμός μυκήτων εντοπίζονται. Μοριακές τεχνικές που στοχεύουν στις περιοχές ITS οι οποίες βρίσκονται στις επαναλήψεις του πυρηνικού rDNA χρησιμοποιήθηκαν, επίσης, για την εκτίμηση της ποικιλότητας των μυκήτων στο χαρτί. Οι περιοχές ITS χαρακτηρίζονται από μεγάλη ποικιλότητα μεταξύ ταξινομικά διακριτών ειδών μυκήτων.

Σε επίπεδο γένους απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν οι ακόλουθοι μύκητες: *Penicillium sp.*, *Cladosporium sp.* και *Alternaria sp.*. Σε επίπεδο είδους, 9 διαφορετικά είδη μυκήτων αναγνωρίστηκαν: *Penicillium citrinum*, *Penicillium chrysogenum*, *Syncephalastrum racemosum*, *Alternaria alternata*, *Trametes ochracea*, *Talaromyces flavus*, *Lewia infectoria*, *Chalastospora gossypii* και *Candida sake*. Σε προγενέστερες αντίστοιχες μελέτες, οι περισσότεροι από τους παραπάνω μύκητες απομονώθηκαν από αντικείμενα με πρώτη ύλη το χαρτί. Εξαιρεση αποτελούν οι μύκητες *Talaromyces flavus*, *Chalastospora gossypii* και *Trametes ochracea* οι οποίοι δεν έχουν ταυτοποιηθεί σε αντίστοιχες προηγούμενες μελέτες. Τέλος, η ικανότητα της πλειοψηφίας αυτών να παράγουν κυτταρινολυτικά ένζυμα (σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα) που διασπών το βασικό συστατικό του χαρτιού, τους καθιστά πιθανούς παράγοντες βιοαλλοίωσης του.

ABSTRACT

Archives and libraries all over the world suffer from biodeterioration of paper materials caused by microorganisms, especially fungi. Microbial degradation of paper causes different kinds of damage depending on the organisms responsible for the attack. Some fungi frequently associated with paper degradation are capable of dissolving cellulose fibres through the action of cellulolytic enzymes, or produce pigments or organic acids which discolour paper and cause serious damage to materials of cultural inheritance made from paper.

In this study we tried, for first time, to assess the diversity of fungi, in Greek historical manuscripts from the National General Archive (Athens). Five manuscripts originated from 19th and 20th centuries were analyzed. Culture-dependent methods, were applied to identify fungal communities colonising paper. With culture-dependent methods, only a small fraction of colonising organisms is detected. Molecular strategies targeting the internally transcribed spacer (ITS) regions, which are nested in the nuclear rDNA repeats, were selected to investigate the fungal diversity on paper. The ITS regions possess a high variation among taxonomically distinct fungal species and even within the species.

According to genus taxonomy the fungi that were isolated and identified were: *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp. and *Alternaria* sp.. According to species taxonomy, 9 different species were identified: *Penicillium citrinum*, *Penicillium chrysogenum*, *Syncephalastrum racemosum*, *Alternaria alternata*, *Trametes ochracea*, *Talaromyces flavus*, *Lewia infectoria*, *Chalastospora gossypii* and *Candida sake*. In earlier related studies, most of these fungi were isolated from manuscripts or books. Conversely, the fungi *Talaromyces flavus*, *Chalastospora gossypii* and *Trametes ochracea* have not been identified in similar previous studies. Finally, most of them produce cellulolytic enzymes (according to literature) thus they can be considered potential biodeteriogens within the microbial community of paper.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Πολιτιστική κληρονομιά και φθορά

Ο όρος “πολιτιστική κληρονομιά” αναφέρεται στο απόθεμα προϊόντων της τέχνης που έχει προκύψει στο φάσμα της ιστορίας της τέχνης και τα οποία αποτελούν υλικά μέρη του πολιτισμού του κάθε λαού. Ο όρος αποδόθηκε το 1972, στο γενικό συνέδριο που διεξήγαγε ο Οργανισμός της Εκπαίδευσης, της Επιστήμης και του Πολιτισμού των Ενωμένων Εθνών (UNESCO, United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization). Ως πολιτιστική κληρονομιά ορίστηκαν τα μνημεία, οι ομάδες οικοδομημάτων και οι τοποθεσίες όπου αυτά εντοπίζονται. Με τον όρο μνημεία γίνεται αναφορά σε έργα αρχιτεκτονικής, έργα μνημειώδους γλυπτικής και ζωγραφικής, στοιχεία ή κατασκευές αρχαιολογικής φύσεως, επιγραφές που είναι καθολικής αξίας από την οπτική της τέχνης, της ιστορίας και της επιστήμης. Μετά το 1972, ο όρος “πολιτιστική κληρονομιά” επεκτάθηκε και καλύπτει εκτός από μνημειακά αντικείμενα και κινητά αντικείμενα, όπως συλλογές μουσείων, έργα τέχνης και κινητά αρχαιολογικά ευρήματα. (Jokilehto, 1999)

Η πολιτιστική κληρονομιά βρίσκεται σε κίνδυνο. Η φθορά των υλικών, που απαρτίζουν τα πολιτιστικής αξίας αντικείμενα, είναι το αποτέλεσμα διαφορετικών φυσικών, χημικών και βιολογικών επιδράσεων. Η διαδικασία της αλλοίωσης από εξωτερικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες είναι μία πολύπλοκη αλληλεπίδραση του κλίματος, των τοπικών μετεωρολογικών χαρακτηριστικών, των βιολογικών διαδικασιών και, συχνά, πολύπλοκων χημικών διαδικασιών που προκύπτουν από την επίδραση ρύπων και φυσικών συστατικών του περιβάλλοντος χώρου. (Moncmanova, 1993; Koch *et al.*, 2001)

Στους φυσικούς παράγοντες περιλαμβάνονται η υγρασία, η θερμοκρασία, η ηλιακή ακτινοβολία, η κίνηση και πίεση του αέρα, οι κατακρημνίσεις, οι χημικές και βιοχημικές αντιδράσεις. Οι φυσικοί παράγοντες σε συνδυασμό με τους βιομηχανικούς, αγροτικούς και αστικούς ρύπους επάγουν την αλλοίωση των υλικών. Οι μετεωρολογικές συνθήκες επηρεάζουν τις διαδικασίες μεταφοράς, μετασχηματισμού, διασποράς και εναπόθεσης των ρύπων. Από την πλευρά τους, οι κύκλοι των ρύπων μπορούν να επηρεάσουν τις φυσικές διαδικασίες στην ατμόσφαιρα. Οι αυξανόμενες συγκεντρώσεις διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) και άλλων αερίων στην ατμόσφαιρα αλλάζουν τη χημεία του αέρα και επηρεάζουν τις χημικές αντιδράσεις στην επιφάνεια των αντικειμένων. Οι εκπομπές CO₂

μεταβάλλουν τη θερμοκρασία μέσω του φαινομένου του θερμοκηπίου, επιταχύνονται οι αντιδράσεις και προκαλούνται χημικές αλλαγές στις επιφάνειες των υλικών. Διαμέσου ατελούς καύσης απελευθερώνεται στην ατμόσφαιρα διοξείδιο του θείου το οποίο ευθύνεται για τη δημιουργία του φαινομένου της όξινης βροχής. Η όξινη βροχή προκαλεί διάβρωση, αποσάθρωση των υλικών ενώ επιδρά και στις υαλογραφίες, αποχρωματίζοντας και θαμπώνοντας το γυαλί. (Camuffo, 1986 ; 1992 ; 1994; McNamara and Mitchell, 2005)

Τα χαρακτηριστικά και οι ιδιότητες των υλικών (υφή της επιφάνειας, το πορώδες αν πρόκειται για πέτρα, οι επιφανειακοί ηλεκτρολύτες αν πρόκειται για μέταλλο κ.ό.κ.) είναι τόσο σημαντικά όσο και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες στη διαδικασία της φθοράς και στην επέκτασή της. Η επέκταση της φθοράς εξαρτάται από την ποιότητα της πρωτογενούς ύλης που χρησιμοποιείται και από τον τρόπο χειρισμού της για την κατασκευή του τελικού αντικειμένου. Σχετίζεται με τον τρόπο διατήρησης και συντήρησης του τελικού αντικειμένου και με τον τρόπο που χρησιμοποιείται. (Koch *et al.*, 2001 ; Camuffo, 1986 ; 1992 ; 1994)

Επίσης αρκετά αντικείμενα πολιτιστικής κληρονομιάς βρίσκονται σε κίνδυνο βιοαλλοίωσης λόγω της παρουσίας και της δράσης ζωντανών οργανισμών.

Η γνώση της επίδρασης του φυσικού περιβάλλοντος, των βιολογικών παραγόντων, των ανθρωπογενών ρύπων και των χαρακτηριστικών του υλικού είναι σημαντική για την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που προκαλούν φθορά, τη βέλτιστη επιλογή υλικών και αποτελεί, επίσης, τη βάση για την επιλογή κατάλληλων μεθόδων προστασίας και διατήρησης.

1.2 Ορισμός της βιοαλλοίωσης

Η αλλοίωση αναφέρεται σε αλλαγή της κατάστασης οποιουδήποτε υλικού από την αρχική του μορφή που προκαλείται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αντικειμένου και των εξωτερικών παραγόντων. Έχει πολλές διαστάσεις και εξαρτάται, μεταξύ άλλων, από τον τύπο της δομής, τα συστατικά στοιχεία, τα λειτουργικά χαρακτηριστικά του αντικειμένου και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Ένας ευρέως αποδεκτός ορισμός της βιοαλλοίωσης προτάθηκε από τον Hueck το 1968: «κάθε μη επιθυμητή αλλαγή στις ιδιότητες ενός υλικού που προκαλείται από τις ζωτικές δραστηριότητες των οργανισμών». Ομοίως, ο Rose, το 1981, ορίζει τη βιοαλλοίωση ως τη διαδικασία μέσω της οποίας «βιολογικοί παράγοντες, δηλαδή ζωντανοί οργανισμοί, είναι η αιτία της μείωσης στην ποιότητα ή στην αξία».

Είναι σημαντικό να γίνει διάκριση μεταξύ της βιολογικής καταστροφής - βιοαλλοίωσης (biodegradation) και της βιοαποικοδόμησης (biodegradation) καθώς οι δύο όροι μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως ισοδύναμοι. Σύμφωνα με τους Allsopp *et al.*, η βιοαποικοδόμηση σχετίζεται με τη χρήση των μικροοργανισμών στην τροποποίηση των υλικών με θετικό ή ωφέλιμο σκοπό ενώ η βιολογική καταστροφή - βιοαλλοίωση αφορά στην αρνητική επίδραση των δραστηριοτήτων των ζωντανών οργανισμών. (Allsopp *et al.*, 2006)

Οι πιο κοινοί ζωντανοί οργανισμοί που ευθύνονται για τη βιοαλλοίωση είναι οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί, τα έντομα όπως τερμίτες, οι μύκητες (soft rots, white and brown rots), τα άλγη, οι λειχήνες και τα βακτήρια.

1.3 Ταξινόμηση της βιοαλλοίωσης

Σύμφωνα με τους Gaylarde *et al.* (Gaylarde *et al.*, 2003) η βιοαλλοίωση μπορεί να ταξινομηθεί σε:

1. Φυσική ή μηχανική
2. Αισθητική
3. Χημική

Η φυσική ή μηχανική βιοαλλοίωση αναφέρεται σε όλες τις δραστηριότητες που άμεσα επηρεάζουν τα υλικά συστατικά και τις μηχανικές ιδιότητες. Αυτό συχνά σχετίζεται με τη διαδικασία μέσω της οποίας οι ζωντανοί οργανισμοί διαταράσσουν τη δομή λόγω της ανάπτυξης τους ή της κίνησης τους αλλά δε χρησιμοποιούν τα υλικά ως θρεπτική πηγή. Η αισθητική βιοαλλοίωση προκαλείται από την παρουσία των οργανισμών, των νεκρών τους σωμάτων, των απεκκρίσεων ή των μεταβολικών τους προϊόντων σχηματίζοντας ένα μικροβιακό στρώμα στην επιφάνεια της δομής, το βιοφίλμ. Η παρουσία των μικροοργανισμών δεν επηρεάζει τη λειτουργία του υλικού αλλά μόνο την εικόνα του, την αισθητική του εμφάνιση.

Τέλος, η χημική βιοαλλοίωση μπορεί να διαιρεθεί σε δύο περιπτώσεις. Στην πρώτη περίπτωση, οι οργανισμοί χρησιμοποιούν τα δομικά συστατικά ως θρεπτική πηγή, πηγή άνθρακα και/ή πηγή ενέργειας τροποποιώντας με αυτό τον τρόπο τις ιδιότητες των υλικών. Η αποικοδόμηση υλικών από κυτταρίνη, όπως τα χειρόγραφα από κυτταρινολυτικούς μύκητες αποτελεί ένα παράδειγμα. Στη δεύτερη περίπτωση, οι ζωντανοί οργανισμοί απεκκρίνουν τα προϊόντα – απόβλητα τους ή άλλες ουσίες (όπως H₂S, FeS) και επηρεάζουν αρνητικά τα υλικά.

1.4 Υλικά που υφίστανται βιοαλλοίωση

Στα υλικά που αποτελούν αντικείμενο βιοαλλοίωσης συμπεριλαμβάνονται (Bousher *et al.* 1995; Allsopp *et al.*, 2003 ; Koestler *et al.* 2003):

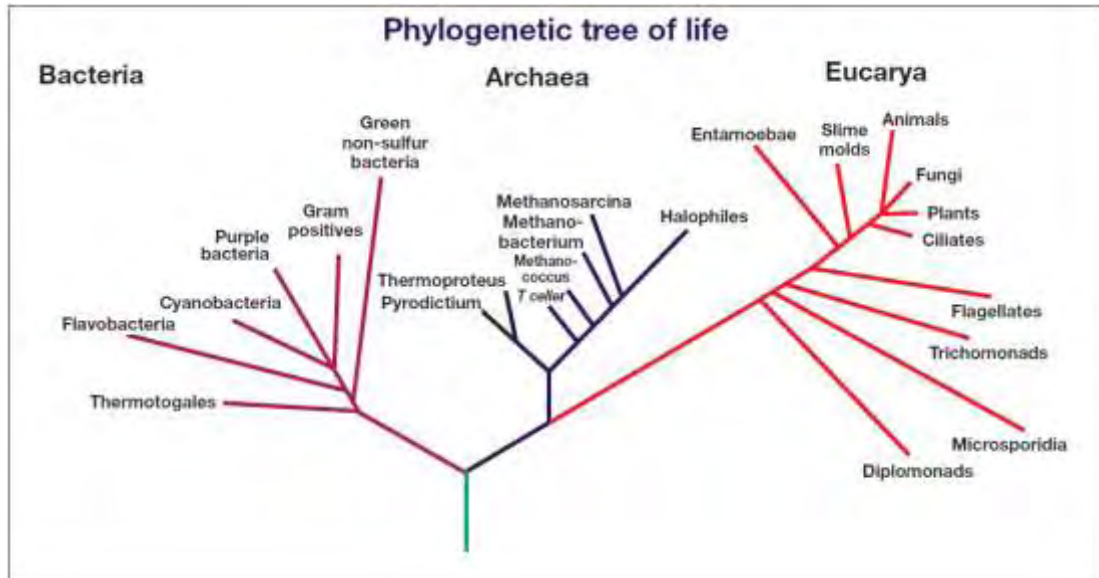
- Αποθηκευμένα γεωργικά προϊόντα
- Φάρμακα και καλλυντικά
- Πολυμερή, λάστιχα και πλαστικά
- Γυαλί
- Ξύλο
- Αρχαιακό υλικό
- Χαρτοπολτός
- Δέρματα και Κλωστοϋφαντουργικά προϊόντα
- Καύσιμα και Λιπαντικά
- Μέταλλα
- Χρώματα
- Πέτρα, σκυρόδεμα και κτήρια
- Κόλλες και στεγανωτικά υλικά

Η γενετική και μεταβολική ποικιλότητα των μικροοργανισμών καθώς και η ικανότητά τους να σχηματίζουν βιοφίλμ είναι δύο παράγοντες που εξηγούν την ικανότητα τους να προκαλούν βιοαλλοίωση στα προαναφερθέντα υλικά.

1.5 Μικροβιακή Ποικιλότητα

Το μεγαλύτερο μέρος της βιοποικιλότητας και βιομάζας στον πλανήτη είναι μικροβιακό. (Hammond,1995;Whitman *et al.*,1998) Οι φυτικοί και ζωικοί οργανισμοί αποτελούν ελάχιστα μόνο από τα κλαδιά στο δέντρο της ζωής (εικόνα 1). Η ποικιλότητα των μικροοργανισμών σχετίζεται όχι μόνο με την μορφολογία αλλά κυρίως με τον μεταβολισμό. Οι φυτικοί και ζωικοί οργανισμοί χρησιμοποιούν ηλιακή ενέργεια ή οργανικό άνθρακα ως πηγές ενέργειας και οξυγόνο ως δέκτη ηλεκτρονίων. Οι μικροοργανισμοί είναι ικανοί να χρησιμοποιούν πολλούς άλλους δότες και δέκτες ηλεκτρονίων όπως ο σίδηρος, το μαγνήσιο, οι ενώσεις του θείου και του αζώτου. Η ποικιλότητα των μικροσκοπικών μορφών ζωής σε συνδυασμό με την ικανότητά τους να επιβιώνουν σε ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες χρησιμοποιώντας διάφορες πηγές ενέργειας, ευνοεί την ικανότητα τους να

προκαλούν βιοαλλοίωση. Η παραγωγή οξέος από νιτροποιητικά βακτήρια, για παράδειγμα, προκαλεί φθορά σε πέτρινα αντικείμενα. (Sand and Bock, 1991)



Εικόνα 1: Φυλογενετικό δέντρο, δείχνει τις τρεις επικράτειες των ζωντανών οργανισμών: Βακτήρια, Αρχαία, Ευκάρυα. (Woese, 1994)

1.6 Βιοφίλμ

Η μικροβιακή αλλοίωση των αντικειμένων πολιτιστικής κληρονομιάς λαμβάνει χώρα, αρχικά, μέσω του σχηματισμού και ανάπτυξης των βιοφίλμ, τα οποία είναι σύνθετες κοινότητες μικροοργανισμών προσκολλημένες σε μία επιφάνεια. Ο σχηματισμός βιοφίλμ ξεκινά με την αρχική προσκόλληση των μικροοργανισμών σε μια επιφάνεια. Υπό ευνοϊκές συνθήκες, η κυτταρική διαίρεση παράγει μάζες κυττάρων τις μικροαποικίες. (Costerton *et al.*, 1999) Όταν το μέγεθος του πληθυσμού είναι επαρκές ξεκινά η διακυτταρική επικοινωνία και η ωρίμανση του βιοφίλμ. Τα βακτηριακά βιοφίλμ παράγουν μεγάλα ποσά εξωπολυμερών (EPS) τα οποία αποτελούνται κυρίως από πολυσακχαρίτες καθώς και από χρωστικές, λιπίδια και πρωτεΐνες. (Christensen and Characklis, 1990) Τα εξωπολυμερή εξυπηρετούν πολλές λειτουργίες συμπεριλαμβανομένου την προστασία των μικροοργανισμών από ξήρανση, αντιβιοτικά και απολυμαντικά ενώ συμβάλλουν και ως αποθήκες θρεπτικών συστατικών και ενέργειας. (Costerton *et al.*, 1995)

1.7 Scripta manent.....τα γραπτά μένουv

Από την αρχή της ανθρωπότητας, οι άνθρωποι προσπάθησαν να ανταλλάξουν τις ιδέες και τις γνώσεις τους και να τις μεταλαμπαδεύσουν και στις μελλοντικές γενιές. Από αυτή την άποψη, ο πολιτιστικός ρόλος που έπαιξε το χαρτί είναι εξαιρετικά σημαντικός. Το χαρτί χρησιμοποιήθηκε για ζωγραφιές, για βιβλία, για αρχαιακά έγγραφα, φωτογραφίες, εκτυπώσεις κ.ό.κ. Το χαρτί για πρώτη φορά κατασκευάστηκε στην Κίνα το 105 μ.Χ. από τον υπουργό Γεωργίας Τσάι-Λουέν και η ιστορία του μπορεί να διαιρεθεί σε δύο κύριες περιόδους. Η πρώτη περίοδος, πριν το 19^ο αιώνα, όπου το χαρτί ήταν χειροποίητο και η κυτταρίνη από λινάρι και βαμβάκι χρησιμοποιούνταν ως πρώτη ύλη. Η δεύτερη περίοδος, από το 19^ο αιώνα και μετά, όπου το χαρτί κατασκευάζεται μηχανικά από ξυλοπολτό. Σε αυτή την περίπτωση, το χαρτί περιέχει διάφορα άλλα συστατικά εκτός από κυτταρίνη: λιγνίνη, ημικυτταρίνη και πηκτίνη. Επιπλέον, το χαρτί συχνά καλύπτεται με κόλλα όπως ζελατίνη (gelatin) (η διαδικασία κάλυψης του χαρτιού με κόλλα είναι μία διαδικασία που το καθιστά αδιαπέραστο από μελάνι) ή με ανόργανα άλατα, χρωστικές και άλλες ουσίες για να προσδώσουν επιθυμητές ιδιότητες. Το χαρτί είναι ένα από τα υλικά που υφίστανται βιοαλλοίωση. (Carpitelli *et al.*, 2010)

1.8 Βιοαλλοίωση του χαρτιού

Σε έργα τέχνης που η πρώτη ύλη είναι το χαρτί (χειρόγραφα, βιβλία κ.ά.) πολλοί παράγοντες συνυπάρχουν και συμβάλλουν στην βιοαλλοίωση. Σε επίπεδο σχετικής υγρασίας (RH) μεγαλύτερο του 65% και σε θερμοκρασία υψηλότερη των 20 °C, η περιεκτικότητα του χαρτιού σε υγρασία αγγίζει το 8-10% με συνακόλουθη ενεργότητα νερού (όπου a_w , ο λόγος της τάσης ατμών του νερού στο υπόστρωμα και της τάσης ατμών του καθαρού νερού στην ίδια θερμοκρασία και σχετική υγρασία) μεγαλύτερη του 0.65. (Pinzari *et al.*, 2006) Στις συνθήκες αυτές τα σπόρια των μυκήτων μπορούν να βλαστήσουν και να αναπτυχθούν χρησιμοποιώντας το χαρτί ως μέσο ανάπτυξης, επηρεάζοντας άμεσα την δομική συνοχή του χαρτιού.

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών μπορεί να κατασταλεί ελέγχοντας σε πρώτο στάδιο τη θερμοκρασία και τη σχετική υγρασία του περιβάλλοντος όπου είναι τοποθετημένα ή φυλάσσονται αντικείμενα ιστορικής αξίας από χαρτί. Η παραπάνω θέση υποστηρίχτηκε από την ερευνητική ομάδα των Jurado *et al.* (Jurado *et al.*, 2010) η οποία απέδειξε τη διατήρηση ιστορικών χειρόγραφων του 15^{ου}-16^{ου}

αιώνα σε περιβάλλον με θερμοκρασία 16° C και σχετική υγρασία κάτω από 60%. Κατά την επισκευή αποκατάστασης του ναού του “San Esteban” στο Cuéllar της Ισπανίας ερευνήθηκαν ορισμένοι τάφοι. Ανάμεσα τους αυτός της Doña Isabel de Zuazo από το 16° αιώνα όπου βρέθηκαν μία σειρά από έγγραφα του 15^{ου}-16^{ου} αιώνα τα περισσότερα από τα οποία ήταν παπικά συγχωροχάρτια. Έχοντας κατά νου ότι αυτά τα κείμενα χρονολογούνται το 15°-16° αιώνα, η διατήρησή τους ήταν εκπληκτική. Η ερευνητική ομάδα των Jurado *et al.* πραγματοποίησε μικροβιολογική μελέτη των ιστορικών χειρόγραφων χρησιμοποιώντας τεχνικές απομόνωσης και μοριακής μικροβιολογίας σε συνδυασμό με SEM (scanning electron microscopy). Δεδομένου ότι οι συνθήκες που επικρατούσαν στον τάφο ήταν 16 °C θερμοκρασία και σχετική υγρασία μικρότερη του 60% (Montemartini *et al.* 2003) προτάθηκε ότι οι συνθήκες αυτές παρεμποδίζουν τη βιοαλλοίωση και καθιστούν ικανή τη διατήρηση των εγγράφων στην τρέχουσα κατάσταση τους.

Το χαρτί αποτελείται κυρίως από κυτταρίνη και άλλες ουσίες που το καθιστούν ένα πολύπλοκο και ετερογενές μέσο. Η κυτταρίνη από χημικής άποψης, είναι ένα γραμμικό πολυμερές γλυκόζης, μία υγροσκοπική ένωση η οποία επηρεάζεται από πολλούς χημικούς και βιολογικούς παράγοντες καθώς αποτελεί θρεπτικό υπόστρωμα που ευνοεί την ανάπτυξη μικροοργανισμών.

Περισσότερα από 200 είδη μυκήτων είναι η κύρια αιτία καταστροφής των αντικειμένων πολιτιστικής κληρονομιάς που αποτελούνται εξ’ ολοκλήρου ή μερικώς από χαρτί. Πολλά από αυτά τα είδη έχουν, τουλάχιστον, μερική κυτταρινολυτική δράση. (Florjan, 1997) Σε χειρόγραφα, βιβλία κ.ό.κ. ο αποικισμός του υποστρώματος κυτταρίνης από ειδικές ομάδες μικροοργανισμών δε δημιουργεί μόνο αισθητικά προβλήματα με τη μορφή χρωματικών αλλοιώσεων και λεκέδων αλλά προκαλεί τροποποίηση της φυσικής και χημικής δομής.

1.9 Το φαινόμενο “foxing”

Καφέ-κόκκινες ή κίτρινο-καφέ κηλίδες συχνά εμφανίζονται σε βιβλία (εικόνα 2). Είναι κοινές σε αντικείμενα από χαρτί του 16^{ου} έως 19^{ου} αιώνα. Ωστόσο, είναι γνωστό πως ακόμη και σύγχρονα έγγραφα μπορούν να εμφανίσουν αυτό το φαινόμενο. (Arai, 2000; Montemartini, 2003) Αυτές οι χρωματιστές κηλίδες ονομάζονται “foxing” καθώς έχουν το χρώμα της γούνας της αλεπούς και αποτελούν σοβαρό πρόβλημα για τη συντήρηση του χαρτιού. Ο όρος

χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά το 1848. (Meynell and Newsam, 1979 & Carter, 1980) Στην Ιαπωνία, το “foxing” είναι γνωστό ως *hoshi* που κυριολεκτικά σημαίνει αστέρια.

Οι χρωματικοί λεκέδες μεταναστεύουν μέσω των διαδοχικών σελίδων προκαλώντας μη αναστρέψιμη φθορά και καθιστούν μακροπρόθεσμα τα έγγραφα μη ευανάγνωστα. Επιπλέον, ο αριθμός των περιοχών με κηλίδες αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου και μπορεί, τελικά, να προκληθεί μεγάλου βαθμού αλλοίωση. Το φαινόμενο του “foxing” συνήθως εντοπίζεται σε έγγραφα αποθηκευμένα σε θερμό περιβάλλον με υγρασία. (Arai, 2000) Ωστόσο, παρά το μεγάλο αριθμό δημοσιεύσεων για την προέλευση και το χαρακτηρισμό του φαινομένου, δεν υπάρχουν πειστικά αποτελέσματα. Σύμφωνα με τους Derow και Choi (Derow and Owen, 1992 ; Choi, 2007), η κύρια δυσκολία εντοπίζεται στον ασαφή ορισμό του foxing. Ο όρος αναφέρεται, γενικά, σε μικρές καφέ-κόκκινες ή κίτρινο-καφέ κηλίδες μικρών διαστάσεων με ακανόνιστα άκρα. Ασαφώς, δηλαδή, περιγράφει το μέγεθος, το σχήμα και το χρώμα των λεκέδων των οποίων η ερμηνεία εξαρτάται από την υποκειμενικότητα κάθε θεατή. Εξαιτίας της έλλειψης ειδικών κριτηρίων για τον ορισμό, κάποιες φορές επικρατεί σύγχυση για το αν μία χρωματική κηλίδα μπορεί ή όχι να χαρακτηριστεί foxing.

Αν και οι αιτίες του foxing δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητές, συνήθως αποδίδονται στην παρουσία μυκήτων και/ή στην επαγόμενη από μέταλλα αποικοδόμηση της κυτταρίνης. Νέες υποθέσεις συμπεριλαμβάνουν την οξειδωση της κυτταρίνης και τη συμπύκνωση της υγρασίας που σχετίζονται με τη μη ομοιογένεια του χαρτιού. (Bichieri *et al.*, 2001)

Το foxing από μέταλλα θεωρείται μία από τις κύριες αιτίες και μπορεί να προκληθεί είτε κατά τη διαδικασία παραγωγής του χαρτιού ή από αερομεταφερόμενη σκόνη. (Bichieri *et al.*, 2002) Στα μέταλλα που εντοπίζονται στις κηλίδες συμπεριλαμβάνονται ο σίδηρος, ο χαλκός, ο κασσίτερος, ο ορείχαλκος. Η οξειδωση των μετάλλων σχηματίζει λεκέδες σκουριάς στο χαρτί οι οποίοι έχουν, συνήθως, ένα διακριτό σκούρο κέντρο και ανοιχτόχρωμο δακτύλιο. Ο γύρω αποχρωματισμός προκαλείται από τη μετανάστευση των διαλυτών προϊόντων αποικοδόμησης από το κέντρο των μετάλλων. (Daniels and Meeks 1994 ; Bichieri *et al.*, 2001) Κάποιοι ερευνητές υποστήριξαν την εξαίρεση αυτών των κηλίδων από το φαινόμενο foxing (Florian, 1997), αλλά υπερίσχυσε η αντίθετη άποψη.

Η σχέση του foxing και της μόλυνσης από μύκητες πρωτοαναφέρθηκε το 1917. (Meynell and Newsam 1978) Διάφορες μελέτες μέσω μικροσκοπικών παρατηρήσεων επιβεβαιώνουν την παρουσία μυκήτων και των σπόρων τους. Τα πιο συχνά γένη που εντοπίζονται είναι: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* και *Penicillium*. (Florian, 1996 ; Florian and Manning 1999, 2000 ; Rakotonirainy *et al.*, 2008) Λίγες είναι οι περιπτώσεις παρουσίας βακτηριακών ειδών σε κηλίδες foxing. (Strzelczyk and Pronobis-Bobowska, 1993 & Montemartini Corte *et al.*, 2003) Η μόλυνση από τους μύκητες μπορεί να συμβεί στο στάδιο δημιουργίας του χαρτιού ή κατά τη χρήση του. (Florian and Manning 1999, 2000 & Florian 2000) Διαπιστώθηκε ότι η ένταση του χρώματος των κηλίδων δε σχετίζεται πάντα με υψηλές συγκεντρώσεις μυκήτων. (Daniels and Meeks, 1988) Οι λεκέδες foxing διαφοροποιούνται από τους λεκέδες που προκαλούν οι αποικίες μούχλας στο χαρτί καθώς οι δεύτερες είναι ευρέως χρωματικού φάσματος και προκαλούν φθορά στη δομή του χαρτιού. Ωστόσο, υπάρχει η άποψη ότι και το foxing ευθύνεται για τη δομική φθορά του χαρτιού. (Rebrikova and Manturovskaya, 2000)

Επί του παρόντος, το μόνο κοινό χαρακτηριστικό που εντοπίζεται σε κηλίδες foxing είναι η οξειδωση της κυτταρίνης. (Bichieri *et al.*, 2001) Η οξειδωση συμβαίνει μέσω της αντίδρασης ενός μορίου κυτταρίνης και του οξυγόνου με αποτέλεσμα το σχηματισμό ριζών υπεροξειδίου του υδρογόνου ως δραστικό ενδιάμεσο. Τα μέταλλα και τα οξέα διαφορετικής προέλευσης, όπως μεταβολίτες μυκήτων και προϊόντα αποικοδόμησης κυτταρίνης, επιταχύνουν τη διαδικασία της οξειδωσης. (Choisy *et al.*, 1997; Bichieri *et al.*, 2001) Η διαδικασία της οξειδωσης εισάγει διπλούς δεσμούς στην κυτταρίνη σχηματίζοντας ένα σύστημα σύζευξης ικανό να απορροφήσει φως. Αρχικά, το σύστημα σύζευξης απορροφά στο υπεριώδες φάσμα και φθορίζει σε UV φως. Με επιπλέον οξειδωση της κυτταρίνης, το σύστημα σύζευξης επεκτείνεται και απορροφά μεγαλύτερα μήκη κύματος. Τελικά, το σύστημα ξεκινά να απορροφά ορατό φως προκαλώντας την εμφάνιση της χρωματικής αλλοίωσης στο κανονικό φως. (Choi, 2007 ; Eusman, 1995)

Πολλοί ερευνητές έχουν προτείνει ότι ο UV φθορισμός σχετίζεται με την ανάπτυξη του φαινομένου foxing. (Choisy *et al.*, 1997 ; Pedersoli *et al.*, 2000 ; Peters, 2000) Στα πολύ πρώιμα στάδια, οι κηλίδες ή “πρόδρομοι του foxing” παρουσιάζουν έντονο φθορισμό σε λάμπα UV, αλλά καθώς αναπτύσσονται μέσα στο χρόνο, ο φθορισμός μειώνεται όσο η χρωματική αλλοίωση, η οποία είναι ορατή στο κανονικό φως, επεκτείνεται. Οι Choisy *et al.* (1997) παρατηρώντας τις αλλαγές

αυτές πρότειναν τη μελέτη της έντασης του φθορισμού με σκοπό την ανίχνευση των σταδίων του φαινομένου foxing, στα πλαίσια της συντήρησης του χαρτιού.



Εικόνα 2: Χρωματικές κηλίδες σε χειρόγραφο του 19^{ου} αιώνα. (Πηγή: Γενικό Αρχείο του Κράτους, Αθήνα)

1.10 Μύκητες: παράγοντες βιοαλλοίωσης

Οι μύκητες είναι ευκαρυωτικοί οργανισμοί, μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι (Moore 1980). Πριν τη χρήση μοριακών τεχνικών στη φυλογενετική ανάλυση οι μύκητες θεωρούνταν μέρος του φυτικού βασιλείου καθώς μύκητες και φυτά είναι κατά κανόνα ακίνητοι οργανισμοί και αναπτύσσονται σε παρόμοιο περιβάλλον. (Bruns, 2006) Οι μύκητες είναι ετερότροφοι οργανισμοί, για να επιβιώσουν παρασιτούν σε ζωντανούς οργανισμούς ή σαπροφυτούν πάνω σε νεκρούς απορροφώντας μόρια τροφής από τον ξενιστή. Σε αντίθεση με τα φυτά, τα κυτταρικά τοιχώματα των περισσότερων μυκήτων αποτελούνται από χιτίνη και γλυκάνες και όχι από κυτταρίνη. (Bowman and Free, 2006) Οι πολυκύτταροι

μύκητες αποτελούνται από νηματοειδείς δομές, τις υφές. Τα συμπλέγματα των υφών σχηματίζουν τα μυκήλια.

Το βασίλειο των μυκήτων σύμφωνα με φυλογενετικές μελέτες υποδιαιρείται σε πέντε διαιρέσεις : (James *et al.*, 2006):

1. *Chytridiomycota*,
2. *Glomeromycota*
3. *Zygomycota*
4. *Basidiomycota*
5. *Ascomycetes*

Οι *Chytridiomycota* είναι εκπρόσωποι πολλών υδρόβιων δευτερευόντων μυκήτων. Οι *Glomeromycota* ζουν συμβιωτικά στις ρίζες των φυτών και η συμμετοχή τους στη βιοαλλοίωση των έργων τέχνης είναι μικρή ή μηδενική. Οι *Zygomycota* περιλαμβάνουν πολλούς σημαντικούς παράγοντες βιοαλλοίωσης των σιτηρών, των φρούτων και λαχανικών. Μερικές φορές εντοπίζονται ευκαιριακά σε μουσειακά υλικά. Οι *Basidiomycota* περιλαμβάνουν τα περισσότερα από τα μανιτάρια και τα δηλητηριώδη μανιτάρια. Ο πιο σημαντικός αποικοδομητής ξύλου εσωτερικού χώρου είναι ο μύκητας *Serpula lacrymans* ο οποίος ανήκει στους βασιδιομύκητες και προκαλεί καταστροφές σε εκκλησίες και ξύλινα ιστορικά κτήρια. (Bech-Andersen and Elborne, 2004) Τα περισσότερα από τα είδη μούχλας που συμμετέχουν στην αλλοίωση της πολιτιστικής κληρονομιάς ανήκουν στους Ασκομύκητες. Η «μούχλα» είναι ένας όρος που αναφέρεται σε μορφές αγενούς αναπαραγωγής, τις Αναμορφές, σε αντίθεση με τους μύκητες που παράγουν σπόρια με εγγενή αναπαραγωγή, τις Τελομορφές.

Η ποικιλότητα των μυκήτων σε χώρους μουσείων και αρχειοφυλάκιων εμφανίζει μεγάλη ομοιότητα με των μυκήτων που αναπτύσσονται σε τρόφιμα και σε εξωτερικούς χώρους. (Samson *et al.*, 2010) Τα πιο σημαντικά γένη μυκήτων που βρέθηκαν σε μουσεία είναι *Alternaria*, *Aspergillus*, *Absidia*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Chrysosporium*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Epicoccum*, *Phoma*, *Cunninghamella*, *Emericella*, *Scopulariopsis*, *Stachybotrys*, *Trichoderma* και το γένος ζύμης *Rhodotorula*. Μερικοί μύκητες που αποκαλούνται “Black yeasts” και μικροαποικιακοί μύκητες όπως *Exophiala*, *Aureobasidium*, *Coniosporium* και *Wallemia* συχνά εντοπίζονται σε τοιχογραφίες ή σε υλικά που περιέχουν υδρογονάνθρακες, σιλικόνη ή παραφίνη.

Από την οπτική της βιοαλλοίωσης των αντικειμένων πολιτιστικής κληρονομιάς οι μύκητες μπορούν να διαιρεθούν σε δύο κύριες λειτουργικές ομάδες. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι ευκαιριακοί μύκητες οι οποίοι αναπτύσσονται σε όλους τους τύπους υλικών εάν υπάρχει επαρκής υγρασία. Αυτοί οι μύκητες δεν είναι ικανοί να αποικοδομήσουν ενζυμικά τα υλικά και να τα χρησιμοποιήσουν ως κύρια πηγή άνθρακα. Στη δεύτερη ομάδα ανήκουν αυτοί οι μύκητες, οι οποίοι αποτελούν πραγματικά «παθογόνα των υλικών». Είναι ειδικοί για το υπόστρωμα και ικανοί να αποικοδομήσουν ειδικά υλικά στα έργα τέχνης. Οι κυτταρινολυτικοί μύκητες στο χαρτί και οι κερατινολυτικοί στις τρίχες, στο δέρμα, στα φτερά ανήκουν στη δεύτερη ομάδα. (Meier and Petersen, 2006 ; Blyskal, 2009) Και οι δύο ομάδες μπορούν να προκαλέσουν σοβαρή αλλοίωση αλλά μόνο οι μύκητες της δεύτερης ομάδας μπορούν να καταστρέψουν το ίδιο το υλικό.

1.11 Μύκητες και βιοαλλοίωση του χαρτιού

Η συστηματική μελέτη των μυκήτων που προκαλούν χρωματικούς λεκέδες και αποδυναμώνουν το χαρτί ξεκίνησε το 19^ο αιώνα. Τα ονόματα μυκήτων που αναγράφονται στον ακόλουθο πίνακα (εικόνα 3) χρονολογούνται από τις πρώτες δεκαετίες του 1800.

Fungal species	Year of description
<i>Chaetomium chartarum</i> Ehrenb.	1818
<i>Stilbospora chartarum</i> Ehrenb.	1818
<i>Myxotrichum chartarum</i> Kunze	1823
<i>Oidium chartarum</i> Link	1824
<i>Ascotricha chartarum</i> Berk.	1838
<i>Torula chartarum</i> (Link) Corda	1840
<i>Alternaria chartarum</i> Preuss	1851
<i>Actinospira chartarum</i> (Nees) Corda;	1854
<i>Myxotrichaceae</i>	
<i>Agyrium chartarum</i> Peyl; <i>Agyriaceae</i>	1858
<i>Pleospora chartarum</i> Fuckel,	1870
<i>Macrosporium chartarum</i> Peck; Anamorphic <i>Lewia</i>	1873
<i>Phoma chartarum</i> Berk. & M.A. Curtis;	1873
Anamorphic <i>Didymella</i>	
<i>Humaria chartarum</i> Quéél.; <i>Pyronemataceae</i>	1879
<i>Pyronema chartarum</i> (Quéél.) Sacc.; <i>Pyronemataceae</i>	1889

Εικόνα 3: Μερικά από τα ονόματα των πρώτων ειδών μυκήτων που ανακαλύφθηκαν και αναφέρονται σε χαρτί το 19^ο αιώνα. (Sterflinger and Pinzari, 2011)

Ο πρώτος που μελέτησε τη βιοαλλοίωση του χαρτιού ήταν ο Christian Gottfried Ehrenberg. Το 1818, ολοκλήρωσε τη διδακτορική του διατριβή στους μύκητες, “*Sylvae mycologicae Berolinenses*”, όπου περιέγραψε τα πρώτα είδη τα οποία ονομάζονταν ‘chartarum’. Το 1903, ο Van Iterson δημοσίευσε μία σχετική εργασία αλλά η πρώτη ολοκληρωμένη εργασία αφιερωμένη στη βιοαλλοίωση του χαρτιού από τους μύκητες πραγματοποιήθηκε από τον Pierre Sée, ο οποίος το 1917 δημοσίευσε το άρθρο ‘*Sur les moisissures causant l’altération du papier*’ για την αλλοίωση που προκαλεί η μούχλα στο χαρτί. Στο παρελθόν η έρευνα στράφηκε και προς τους κινδύνους που προκαλούν τα βιβλία ως όχημα μόλυνσεων στον άνθρωπο. Το 1911, ο W. R. Reinick έγραψε το άρθρο ‘*Transmission of Disease by Books*’ για περιπτώσεις μόλυνσεων του ανθρώπου όπου η πηγή αυτών είναι τα βιβλία ή άλλα χειρόγραφα. (Sterflinger and Pinzari, 2011)

Το 1938, ο Alfonso Gallo ίδρυσε το ‘*Regio Istituto di Patologia del Libro*’ (Gallo, 1940), σήμερα γνωστό ως “*Istituto Centrale per il Restauro e la Conservazione del Patrimonio Archivistico e Librario*” το οποίο ήταν το πρώτο ακαδημαϊκό ίδρυμα στον κόσμο αφιερωμένο αποκλειστικά στη μελέτη της βιοαλλοίωσης των υλικών της βιβλιοθήκης.

Η αποικοδόμηση που προκαλούν οι μύκητες στα υλικά μιας βιβλιοθήκης αντιστοιχεί σε διάφορα είδη φθοράς ανάλογα με τα είδη που την προκαλούν και τα χαρακτηριστικά του υποστρώματος. Η φθορά μπορεί να συμβεί εξαιτίας μηχανικού στρες, παραγωγής χρωστικών ενώσεων ή ενζυμικής δράσης. (Sterflinger, 2010 ; Pinzari *et al.*, 2010a) Οι περισσότεροι από τους νηματώδεις μύκητες που σχετίζονται με την καταστροφή του χαρτιού μπορούν να διαλύσουν τις ίνες της κυτταρίνης με τη δράση ειδικών ενζύμων ή τις κόλλες και τα μελάνια. Αν και υπάρχουν κάποιες ενδείξεις για περιπτώσεις μόλυνσης του χαρτιού κατά τη διαδικασία παρασκευής του χαρτιού ή του βιβλίου (Florian, 2002), οι περισσότεροι μύκητες που προσβάλλουν τα υλικά αυτά προέρχονται από τη σκόνη.

Οι έρευνες που βασίστηκαν σε μοριακές τεχνικές και επικεντρώθηκαν στην ανακάλυψη των μυκήτων που ευθύνονται για τη βιοαλλοίωση του χαρτιού (Di Bonaventura *et al.*, 2003 ; Michaelsen *et al.*, 2006 ; Rakotonirainy *et al.*, 2007 ;

Pangallo *et al.*, 2009 ; Michaelsen *et al.*, 2009; 2010) δείχνουν ότι τα αποτελέσματα που αποκτήθηκαν με μεθόδους καλλιέργειας καλύπτουν μόνο λίγους βιώσιμους και καλλιεργήσιμους οργανισμούς, περίπου το 5% του συνόλου των μικροοργανισμών που είναι πραγματικά παρόντες στα υλικά. Η πολυπλοκότητα της δομής της κοινότητας των μυκήτων στο βιοαλλοιωμένο χαρτί είναι υψηλότερη από αυτή που είχε εκτιμηθεί πριν τη χρήση μοριακών μεθόδων. Η συνύπαρξη βακτηρίων και μυκήτων και ο ρόλος της σχέσης τους στην εκμετάλλευση του υποστρώματος είναι υποτιμημένος.

Μία πολύ διαφορετική διαδοχή πρέπει να αναμένεται σε βιβλιοθήκες και αρχεία όταν το νερό γίνεται ξαφνικά διαθέσιμο σε περιπτώσεις, για παράδειγμα, πλημμύρας ή διαρροής σωλήνα νερού. Οι αρχειονόμοι και οι βιβλιοθηκονόμοι είναι εξοικειωμένοι με τέτοιες καταστάσεις και ενήμεροι ότι όταν το χαρτί εμποτιστεί με νερό, οι μύκητες μπορούν πολύ γρήγορα να αναπτυχθούν σε αυτό. Οι μύκητες που σχετίζονται με την καταστροφή από το νερό (Nielsen, 2003) αποτελούνται από είδη τα οποία απαιτούν υψηλή ενεργότητα νερού. Τέτοια είδη μπορούν να παράγουν έντονες οσμές (*Trichoderma spp.*), χρωματισμένους λεκέδες (*Chaetomium spp.* και *Epicoccum spp.*), ή τοξικές ενώσεις (*Stachybotrys spp.*).

Μερικά είδη μυκήτων παράγουν σπόρια τα οποία σε φυσικά περιβάλλοντα διασπείρονται κυρίως μέσω εντόμων και ακάρεων. (Deacon, 1997; 2005) Οι μύκητες που προσβάλλουν υλικά αρχείων και μουσείων (Zyska, 1997) μπορούν να παρουσιάσουν διάφορους τύπους αλληλεπιδράσεων με τα έντομα τα οποία τρέφονται από τα υλικά της κληρονομιάς. Η διασπορά των μυκήτων μέσω των εντόμων σε φυσικά περιβάλλοντα είναι καλά τεκμηριωμένη (Ingold, 1965), αλλά μπορεί να συμβεί και σε εσωτερικούς χώρους. Τα *Psocoptera* και τα ακάρεια συχνά σχετίζονται άμεσα με την παρουσία μούχλας. (Green, 2008) Αντιστρόφως, ο παρασιτισμός των εντόμων στις βιβλιοθήκες και τα αρχεία μπορεί συχνά να συσχετιστεί με μολυσμένα από μύκητες υλικά. Το νερό, τα κατακερματισμένα υλικά και τα περιττώματα των εντόμων αποτελούν ένα τέλειο μέσο για τη βλάστηση και ανάπτυξη των μυκήτων. Μερικοί μύκητες παράγουν σπόρια τα οποία μπορούν να περάσουν μέσω των εντερικών τμημάτων των εντόμων και ακάρεων χωρίς παρενέργειες ενώ κάποια από τα αρθρόποδα μπορούν να τραφούν άμεσα σε δομές μυκήτων. (Green, 2008)

Επιπλέον, η δραστηριότητα των μυκήτων μπορεί να έχει ορατές συνέπειες στα μεταλλικά στοιχεία των υλικών. Το χαρτί περιέχει σε διαφορετικό εύρος τιμών

ανόργανες ενώσεις. Τα άλατα που προκύπτουν από τις διαδικασίες παρασκευής του χαρτιού (π.χ. CaCO_3) ή τα μέταλλα από τα μελάνια (Cu, Fe) είναι παρόντα στα περισσότερα υλικά μιας βιβλιοθήκης. Η αλληλεπίδραση των μυκήτων με ανθρακικά υποστρώματα, για παράδειγμα, προκαλεί σε μικρομετρική κλίμακα μία σαφή αντικατάσταση των αρχικών μεταλλικών στοιχείων με νεοσύστατους κρυστάλλους που αναφέρονται ως «μυκόλιθου». Αυτά τα βιογενή μεταλλικά στοιχεία παράγονται στο χαρτί από εκείνα τα στελέχη μυκήτων που είναι ικανά να χρησιμοποιούν το ασβέστιο που περιέχεται στο CaCO_3 για να παράγουν κρυστάλλους οξαλικού που καθιζάνουν στις ίνες της κυτταρίνης και στις υφές των μυκήτων σαν επικαθίσεις και οργανωμένα συμπλέγματα. (Pinzari *et al.*, 2010b)

1.12 Η κυτταρίνη και η αποικοδόμηση της

Η κυτταρίνη είναι το κύριο πολυμερικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών, ο πιο άφθονος πολυσακχαρίτης στη γη και μία σημαντική ανανεώσιμη πηγή. Οι φυτικοί ιστοί αποτελούνται εκτός της κυτταρίνης, από ημικυτταρίνη, λιγνίνη (πολυμερές φαινυλοπροπανίου), άλλους πολυσακχαρίτες και γλυκοπρωτεΐνες. Αυτά τα πολυμερή συνδέονται μεταξύ τους και ο ειδικός συνδυασμός όμορων συστατικών επηρεάζει την ενζυμική αποικοδόμηση της κυτταρίνης από τους μικροοργανισμούς.

Σε ένα τυπικό οικοσύστημα, μία ποικιλία βακτηρίων και μυκήτων αποικοδομούν την κυτταρίνη και μετατρέπουν αδιάλυτα υποστρώματα κυτταρίνης σε διαλυτά σάκχαρα, cellobiose και γλυκόζη τα οποία στη συνέχεια αφομοιώνονται από το κύτταρο. Οι βασιδιομύκητες είναι οι πιο ισχυροί αποικοδομητές της καθώς πολλά είδη αναπτύσσονται σε νεκρό ξύλο ή σε απορρίμματα ξύλου σε περιβάλλον πλούσιο σε κυτταρίνη. Τα κυτταρινολυτικά συστήματα των μυκήτων διαφέρουν από τα πολύπλοκα των βακτηρίων ενώ οι διαφορές μεταξύ ατομικών ταξινομικών ομάδων δεν είναι τόσο διακριτές. (Lynd *et al.*, 2002)

Η χημική σύσταση είναι απλή, αποτελείται από D κατάλοιπα γλυκόζης ενωμένα με β -1,4-γλυκοσιδικούς δεσμούς και σχηματίζουν γραμμικές πολυμερικές αλυσίδες με περισσότερα από 10.000 κατάλοιπα γλυκόζης. (Zhang and Lynd, 2004b) Η διαμόρφωση β επιτρέπει στην κυτταρίνη να σχηματίσει μακριές ίσες αλυσίδες. Ινίδια σχηματίζονται από παράλληλες αλυσίδες οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μέσω δεσμών υδρογόνου. Το μόριο της κυτταρίνης είναι ένα πολύ

σταθερό μόριο με χρόνο ημίσειας ζωής 5-8 εκατομμύρια χρόνια για διάσπαση β-γλυκοσιδικού δεσμού στους 25 °C (Wolfenden and Snider, 2001) ενώ η γρήγορη ενζυμική αποικοδόμηση της κυτταρίνης είναι απαραίτητη για την επιστροφή του άνθρακα στην ατμόσφαιρα. (Berner, 2003)

Για να καταλύσουν αυτή την αντίδραση οι μικροοργανισμοί παράγουν ένζυμα γνωστά ως κυτταρινάσες. Η αποικοδόμηση των ινιδίων κυτταρίνης περιλαμβάνει τις συνεργιστικές δράσεις της ενδογλυκανάσης (EC 3.2.1.4), της εξωγλυκανάσης ή κυτταρινοϋδρολάσης (EC 3.2.1.91) και της β-γλυκοσιδάσης (EC 3.2.1.21). (Lynd et al., 2002 & Zhang and Lynd, 2004b) Οι ενδογλυκανάσες υδρολύουν τυχαία ενδομοριακούς β-1,4-γλυκοσιδικούς δεσμούς των αλυσίδων κυτταρίνης για να παράγουν νέα άκρα της αλυσίδας. Οι εξωγλυκανάσες, διαδοχικά, κόβουν τις αλυσίδες της κυτταρίνης στα άκρα για να απελευθερώσουν διαλυτή cellobiose ή γλυκόζη. Οι β-γλυκοσιδάσες υδρολύουν τη cellobiose σε γλυκόζη. Με αυτό τον τρόπο η γλυκόζη απελευθερώνεται από τα ινίδια της κυτταρίνης και μπορεί να απορροφηθεί από τις υφές του μύκητα. (Saloheimo et al., 2002 & Wang et al., 2003) Οι κυτταρινάσες παράγονται από τους μύκητες ως απόκριση στην παρουσία του δισακχαρίτη cellobiose που αρχικά λειτουργεί ως επαγωγέας αν και υψηλότερα επίπεδα του καταστέλλουν την ενζυμική ενεργότητα.

Η κυτταρίνη δεν είναι πάντοτε διαθέσιμη στους μύκητες καθώς σε μεγάλο ποσοστό είναι συνδεδεμένη με λιγνίνη. Σχετικά λίγοι μύκητες είναι ικανοί να αποικοδομούν τη λιγνίνη. Κάποια είδη όπως *Phanerochaete chrysosporium*, *Rigidoporus ulmarius*, *Trametes spp.* που ανήκουν στους white rot μύκητες αποικοδομούν αποτελεσματικά τη λιγνίνη και την απομακρύνουν από την κυτταρίνη. (Kunamneni et al., 2007) Τα ένζυμα που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της λιγνίνης είναι η υπεροξειδάση της λιγνίνης, η Mn-εξαρτώμενη υπεροξειδάση, η λακκάση, η οξειδάση της γλυκόζης για την παραγωγή H₂O₂, η οξειδοαναγωγή της cellobiose-κινόνης. Έχει αποδειχτεί ότι δεν υπάρχει μοναδικός μηχανισμός αποικοδόμησης της λιγνίνης και ότι η ενζυμική μηχανή των διάφορων μικροοργανισμών διαφέρει.

Οι λακκάσες των μυκήτων που όπως προαναφέρθηκε συμμετέχουν στην αποικοδόμηση της λιγνίνης χρησιμοποιούνται στον τομέα της βιοτεχνολογίας στον αποχρωματισμό και λεύκανση του ξυλοπολτού. Η προεπεξεργασία με λακκάσες παρέχει ηπιότερες και καθαρότερες στρατηγικές απολιγνινοποίησης που εξασφαλίζουν την ακεραιότητα της κυτταρίνης. (Bourdonais et al., 1997)

1.13 Μοριακή ανίχνευση μικροοργανισμών

Σε αρχεία και βιβλιοθήκες σε όλο τον κόσμο, όπως προαναφέρθηκε παρατηρούνται φαινόμενα βιοαλλοίωσης αλλά οι κλασικές τεχνικές καλλιέργειας των μικροοργανισμών αποδίδουν ένα περιορισμένο αριθμό της υφιστάμενης μικροβιακής ποικιλότητας. Ένα μεγάλο ποσοστό αυτών δεν μπορεί να καλλιεργηθεί (Mueller and Schmit, 2007) ενώ απαιτείται σχετικά μεγάλη ποσότητα δείγματος. Η αποκατάσταση και διατήρηση της πολιτιστικής κληρονομιάς με πρώτη ύλη το χαρτί είναι, συνεπώς, προβληματική εξαιτίας της ανεπαρκούς γνώσης των μικροοργανισμών ή παραγόντων που προκαλούν αλλοίωση.

Ωστόσο, συντρέχουν και άλλοι λόγοι για την αναγκαιότητα αναγνώρισης και ταυτοποίησης των μικροοργανισμών. Ο πρώτος λόγος αφορά στον κίνδυνο που ελλοχεύει για το ίδιο το χαρτί, ο δεύτερος στο δυνητικό κίνδυνο της υγείας του προσωπικού συντήρησης και των χρηστών. Η ταυτοποίηση μικροοργανισμών της μικροχλωρίδας του δέρματος δείχνει ακατάλληλο χειρισμό και τα εντομοπαθογόνα μικρόβια επισημαίνουν το ρόλο των εντόμων στη μόλυνση του εγγράφου. Η αναγνώριση των μικροοργανισμών είναι σημαντική καθώς η έκθεση σε ορισμένους μύκητες και στα προϊόντα αυτών ίσως να ευθύνεται για μη ειδικά συμπτώματα όπως πονοκεφάλους, ερεθισμός των οφθαλμών, της μύτης κ.ό.κ. (Gorny *et al.*, 2002) Ειδικές μελέτες για τον αέρα εσωτερικού περιβάλλοντος έχουν πραγματοποιηθεί για να ερευνηθούν αυτές τις επιδράσεις στην υγεία του προσωπικού και των χρηστών μουσείων και αρχείων αλλά δεν έχουν παγιωθεί επίσημες κοινές οδηγίες (Micali *et al.*, 2003).

Περισσότερα από 200 είδη μυκήτων έχουν απομονωθεί από χαρτί. (Pinzari *et al.*, 2006) Ωστόσο, μόνο το 5-10% των συνολικών ειδών έχει περιγραφεί με ακρίβεια λόγω των πολιτιστικών περιορισμών, των εσφαλμένων ταυτοποιήσεων σε συλλογές καλλιέργειών και των ανεξερεύνητων οικοτόπων. (Hawksworth and Rossman, 1997) Τεχνικές που δε βασίζονται στην καλλιέργεια είναι χρήσιμες για την αναγνώριση και αξιολόγηση των παραγόντων που προκαλούν αλλοίωση στο χαρτί.

Με τις κλασικές μεθόδους καλλιέργειας ή μικροσκοπίας, είδη όπως τα κυτταρινολυτικά *Chaetomium spp.*, *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Eurotium spp.* ή *Trichoderma spp.* (Szczerpanowska and Cavaliere, 2000; Corte *et al.*, 2003) έχουν ανιχνευθεί σε χαρτί. Άλλα στελέχη που συχνά εντοπίζονται σε βιβλιοθήκες

και αρχεία είναι *Paecilomyces variotii*, *Myrothecium verrucaria*, *Stachybotrys atra*, και ατελείς μύκητες (Deuteromycetes) (Florian and Manning, 2000).

Μοριακές τεχνικές έχουν αναπτυχθεί για την αποτίμηση της μικροβιακής ποικιλότητας σε σύνθετες κοινότητες. (Gonzalez and Saiz-Jimenez, 2005) Μέθοδοι που βασίζονται στην ανάλυση του DNA αποκαλύπτουν ποικιλότητα μυκήτων στα οικοσυστήματα και παρέχουν υψηλή ευαισθησία και γρήγορη ανίχνευση. (Saad *et al.*, 2004) Οι μοριακές τεχνικές θα μπορούσαν να αποκαλύψουν τάξεις που δεν είχαν προηγουμένως ενοχοποιηθεί για βιοαλλοίωση του χαρτιού. Συνολικά, είναι περιορισμένη η έρευνα που έχει βασιστεί σε μοριακά εργαλεία για την ανίχνευση μικροβιακών αποικιών σε υλικά με κυτταρίνη. Η πρώτη έρευνα για το θέμα αυτό είναι πολύ πιθανό να πραγματοποιήθηκε από τους Di Bonaventura *et al.* (Di Bonaventura *et al.*, 2003). Πρόσφατα, ένα πρωτόκολλο απομόνωσης DNA, επίσης κατάλληλο για σπόρια μυκήτων, από διάφορα είδη χαρτιού αναφέρθηκε από τους Michaelsen *et al.* (Michaelsen *et al.*, 2006) Οι Michaelsen *et al.* (Michaelsen *et al.*, 2006) ενίσχυσαν τις περιοχές ITS (internally transcribed spacer) των μυκήτων και τις μελέτησαν με τη βοήθεια της τεχνικής DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) και απέδειξαν ότι ο τύπος του χαρτιού επηρεάζει την ποιότητα του ενισχυμένου DNA που έχει εξαχθεί.

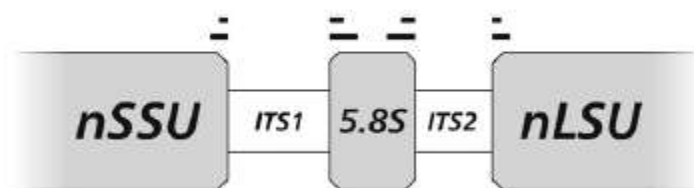
Η μέθοδος που χρησιμοποιείται πιο συχνά για την ανάλυση του χαρτιού είναι η Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). Οι ενισχυμένες ITS αλληλουχίες (Michaelsen *et al.*, 2009; 2010) από διαφορετικά είδη μυκήτων αποκαλύπτουν διαφορετικά ηλεκτροφορητικά μοντέλα μετακίνησης. Συνεπώς, η κοινότητα των μυκήτων σε ένα δείγμα μπορεί να οπτικοποιηθεί μέσω του προφίλ ηλεκτροφόρησης του. Αυτό επιτρέπει την ανάλυση της μικροβιακής ποικιλότητας ενός συγκεκριμένου δείγματος και τη σύγκρισή της με άλλων δειγμάτων.

Η Real-time PCR, επιτρέπει την ποσοτικοποίηση των μονών ειδών ή υψηλότερων τάξεων στα δείγματα. Πρόσφατα, η εφαρμογή της reverse transcriptase PCR έχει βελτιστοποιηθεί για τη χρήση της στη μέτρηση της δραστηριότητας των μυκήτων στο χαρτί καθώς και για τον έλεγχο της έκφρασης γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την αλλοίωση του χαρτιού, όπως τα γονίδια που κωδικοποιούν την κυτταρίνη. Αυτό θα βοηθήσει στην κατανόηση των διαδικασιών της βιοαλλοίωσης από τους μύκητες ως μία σημαντική βάση για την εκπόνηση και βελτιστοποίηση των μεθόδων πρόληψης και θεραπείας.

Η ανερχόμενη ανάπτυξη των υψηλής απόδοσης μοριακών εργαλείων όπως οι μικροσυστοιχίες ολιγονουκλεοτιδίων θα οδηγήσουν αναπόφευκτα σε μεγαλύτερης κλίμακας έρευνες των μυκήτων από αυτές που επιτρέπει η DGGE. (Michaelsen *et al.*, 2006) Μέχρι σήμερα, έχουν χρησιμοποιηθεί phylochips (Microarrays που ανιχνεύουν τάξεις) για την αναγνώριση βακτηρίων και κάποιων μυκήτων (ectomycorrhizal fungal species) (Reich *et al.*, 2009) καθώς και μικροσυστοιχίες ITS με ITS ανιχνευτές για ανίχνευση σε επίπεδο γένους μυκήτων σε σύνθετα δείγματα. (Izzo and Mazzola, 2009)

1.14 ITS περιοχές

Η μοριακή αναγνώριση σε επίπεδο είδους βασίζεται κυρίως στις περιοχές ITS (internally transcribed spacer) του ριβοσωμικού DNA (r-DNA). Η μη κωδική ITS περιοχή (εικόνα 4) που αποτελείται από τις: ITS1, 5.8S rDNA και ITS2 παράγει με μεγάλη ευαισθησία την προς ενίσχυση αλληλουχία-στόχο εξαιτίας του μεγάλου αριθμού αντιγράφων της στο γονιδίωμα του μύκητα. Οι περιοχές αυτές χαρακτηρίζονται από ένα γρήγορο ρυθμό εξέλιξης με αποτελέσματα μεγάλη μεταβλητότητα της αλληλουχίας ανάμεσα σε στενά συγγενικά είδη συγκριτικά με τις πιο συντηρημένες κωδικές περιοχές των rRNA γονιδίων. Η ITS1 είναι εξαιρετικά μεταβλητή με μήκος περίπου 180 ζεύγη βάσεων (bp). Η ITS2 είναι σχεδόν το ίδιο μεταβλητή αν και λίγο μικρότερη 170 bp. Ωστόσο, το μήκος και των δύο ποικίλει ουσιαστικά μεταξύ των τάξεων. (Nilsson *et al.* 2008) Το εμβόλιμο 5.8S γονίδιο, μήκους 160 bp είναι πολύ συντηρημένο. Κατά συνέπεια, οι αλληλουχίες DNA στην ITS περιοχή γενικά προσφέρουν μεγαλύτερη ταξινομική ανάλυση από αυτές των κωδικών περιοχών. (Anderson *et al.*, 2003; Lord *et al.*, 2002) Επιπροσθέτως, οι αλληλουχίες DNA σε αυτές τις περιοχές λόγω της μεγάλης μεταβλητότητας εξυπηρετούν ως μάρτυρες για πιο μακρινές ομάδες σε επίπεδο ταξινόμησης.



Εικόνα 4: Σύνοψη της περιοχής ITS των μυκήτων. Η ITS1 βρίσκεται μεταξύ του 3΄ άκρου του nSSU(18S) γονιδίου και του 5΄ άκρου του 5.8S γονιδίου. Η ITS2 βρίσκεται μεταξύ του 3΄ άκρου του 5.8S γονιδίου του nSSU(18S) γονιδίου και του 5΄ άκρου του nLSU(28S).

1.15 Συντήρηση του βιοαλλοιωμένου χαρτιού

Διάφορες τεχνικές έχουν αναπτυχθεί για τη συντήρηση βιβλίων και εγγράφων μειώνοντας την απειλή των παραγόντων βιοαλλοίωσης όπως οι μύκητες. Ο έλεγχος της θερμοκρασίας και της σχετικής υγρασίας είναι το πρώτο βήμα για τον περιβαλλοντικό έλεγχο των αρχείων και των συλλογών. Οι χαμηλές θερμοκρασίες, τα αδρανή αέρια και οι μέθοδοι εξαερισμού μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αποφευχθεί η μικροβιακή βλάστηση και ο αποικισμός των οργανικών υλικών.

Η ανάλυση της κοινότητας των μυκήτων του χαρτιού καθώς και η κατανόηση των λειτουργιών τους είναι σημαντική βάση για την ανάπτυξη μεθόδων καθαρισμού και αποκατάστασης. Αν και όπως προαναφέρθηκε η μικροσκοπία δε συμβάλλει στην αναγνώριση όλων των μυκήτων αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο στον καθορισμό της κατάστασης της μόλυνσης από μύκητες. Καθορίζεται ειδικά η θέση και το βάθος της μόλυνσης στο υλικό. Είναι δυνατό με τη SEM (Scanning electron microscopy) να οπτικοποιηθεί εάν η μόλυνση είναι επιφανειακή ή εάν οι μυκητιακές υφές έχουν ήδη αναμιχθεί με τις ίνες του χαρτιού. (Michaelsen *et al.*, 2010; Pinzari *et al.*, 2010b; Guiamet *et al.*, 2011) Τα αποτελέσματα των μικροσκοπικών αναλύσεων είναι σημαντικά στη λήψη αποφάσεων για τον τρόπο καθαρισμού και αποκατάστασης. Οι επιφανειακές αποικίες μπορούν, για παράδειγμα, να απομακρυνθούν από το χαρτί με στεγνά σφουγγάρια και μπατονέτες. Σε αντίθεση μία βαθιά μυκητιακή μόλυνση μπορεί να χρειαστεί μια σοβαρή επεξεργασία με βιοκτόνα.

Η χρήση πολύ τοξικών χημικών για τη συντήρηση του χαρτιού, συμπεριλαμβανομένου του οξειδίου του αιθυλενίου, το οποίο έχει καρκινογόνες ιδιότητες, απαγορεύεται σε αρκετές χώρες εκτός του ότι είναι ακριβή. (Flieder *et al.*, 1994; Adamo *et al.*, 2001; Gonzalez *et al.*, 2002)

Μία εναλλακτική είναι η χρήση της ακτινοβολίας των γ ακτινών, μία πολλά υποσχόμενη μέθοδος στο πεδίο της συντήρησης. Η ακτινοβολία γ ως θεραπεία

αποστείρωσης καταστρέφει άμεσα το κυτταρικό DNA μέσω του ιονισμού προκαλώντας μετάλλαξη και θανάτωση του κυττάρου. Επίσης, έχει ως έμμεσο αποτέλεσμα τη ραδιόλυση του κυτταρικού νερού και το σχηματισμό ενεργών ειδών οξυγόνου, ελευθέρων ριζών και υπεροξειδίων διασπώντας με αυτό τον τρόπο τις αλυσίδες του DNA. (McNamara *et al.*, 2003)

Οι γάμμα ακτίνες, τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα με υψηλή διεισδυτική δύναμη περνούν μέσω των υλικών χωρίς να αφήνουν κανένα κατάλοιπο, ένα πλεονέκτημα συγκριτικά με άλλες μεθόδους απολύμανσης. Αμέσως μετά την εφαρμογή της ακτινοβολίας είναι δυνατός ο χειρισμός των βιβλίων και των εγγράφων με ασφάλεια. (Adamo *et al.*, 1998, 2001) Μελέτες έχουν δείξει ότι η καταστροφή των μηχανικών-φυσικών ικανοτήτων από τις ακτίνες γάμμα είναι αμελητέα. (Adamo *et al.*, 1998, 2001; Gonzalez *et al.*, 2002) Επιπλέον, αποδείχτηκε ότι τα μελάνια του χαρτιού είναι ανθεκτικά στις ακτίνες. (Rocchetti *et al.*, 2002)

Οι μύκητες από διαφορετικά υλικά έχουν αδρανοποιηθεί επιτυχώς με δόσεις ακτινοβολίας της κλίμακας 6 έως 15 kGy. (Hanus, 1985; Jorg *et al.*, 1992; Pointing *et al.*, 1998; McNamara *et al.*, 2003) Ωστόσο, υπήρξε περίπτωση όπου ακτινοβολία των 20 kGy δεν ήταν ικανή να εξαλείψει μύκητες από κάποια βιβλία. (Tomazello and Wiendl, 1995) 16 kGy ήταν η απαιτούμενη δόση για την αδρανοποίηση διαφορετικών ειδών μυκήτων σε χαρτί, ακόμη και των πιο ανθεκτικών όπως *Cladosporium spp.* των οποίων οι μαύρες χρωστικές (και η μελανίνη) που παράγονται και συσσωρεύονται στο μυκήλιο τους θα μπορούσαν να τους προστατεύσουν από ακραία περιβάλλοντα. (Saleh *et al.*, 1988; Freitag and Morrell, 1998)

Σε περιπτώσεις που ο ρυθμός της δόσης ήταν χαμηλός (2.8 Gy/h), παρατηρήθηκε μείωση του πολυμερισμού των ινιδίων της κυτταρίνης. Αυτό οφείλεται στο ότι η περίοδος της ακτινοβολίας ήταν αρκετός να προκαλέσει οξειδωτική αποικοδόμηση. (Adamo *et al.*, 1998) Συνεπώς, όσο μεγαλύτερη είναι η περίοδος ακτινοβολίας λόγω της χαμηλής δόσης, τόσο μεγαλύτερη η πιθανότητα το οξυγόνο να αλληλεπιδράσει μέσω χημικής τροποποίησης με τα πολυμερή της κυτταρίνης και τόσο μεγαλύτερη η έμμεση καταστροφή. (Magaudda, 2004) Το επίπεδο αποπολυμερισμού δεν αλλάζει σημαντικά τις μηχανικές ιδιότητες του χαρτιού. (Adamo *et al.*, 1998; Gonzalez *et al.*, 2002)

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι ο καθορισμός της ποικιλότητας των μυκήτων σε Ελληνικά ιστορικά χειρόγραφα του 19^{ου}-20^{ου} αιώνα για πρώτη φορά. Η ταυτοποίηση των μυκήτων πραγματοποιήθηκε με κλασικές τεχνικές που βασίζονται στις καλλιέργειες μυκήτων σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα και με μοριακές τεχνικές. Με τις καλλιέργειες μόνο ένας μικρός αριθμός μυκήτων εντοπίζονται. Οι μοριακές τεχνικές δίνουν τη δυνατότητα να ανιχνευτούν όχι μόνο οι βιώσιμοι μύκητες που εντοπίζονται στο χαρτί αλλά και οι παλαιότερα ενεργοί στους οποίους πιθανόν οφείλεται η βιοαλλοίωση του. Οι μοριακές τεχνικές στοχεύουν στις περιοχές ITS οι οποίες βρίσκονται στις επαναλήψεις του πυρηνικού rDNA και χαρακτηρίζονται από μεγάλη ποικιλότητα μεταξύ ταξινομικά διακριτών ειδών μυκήτων.

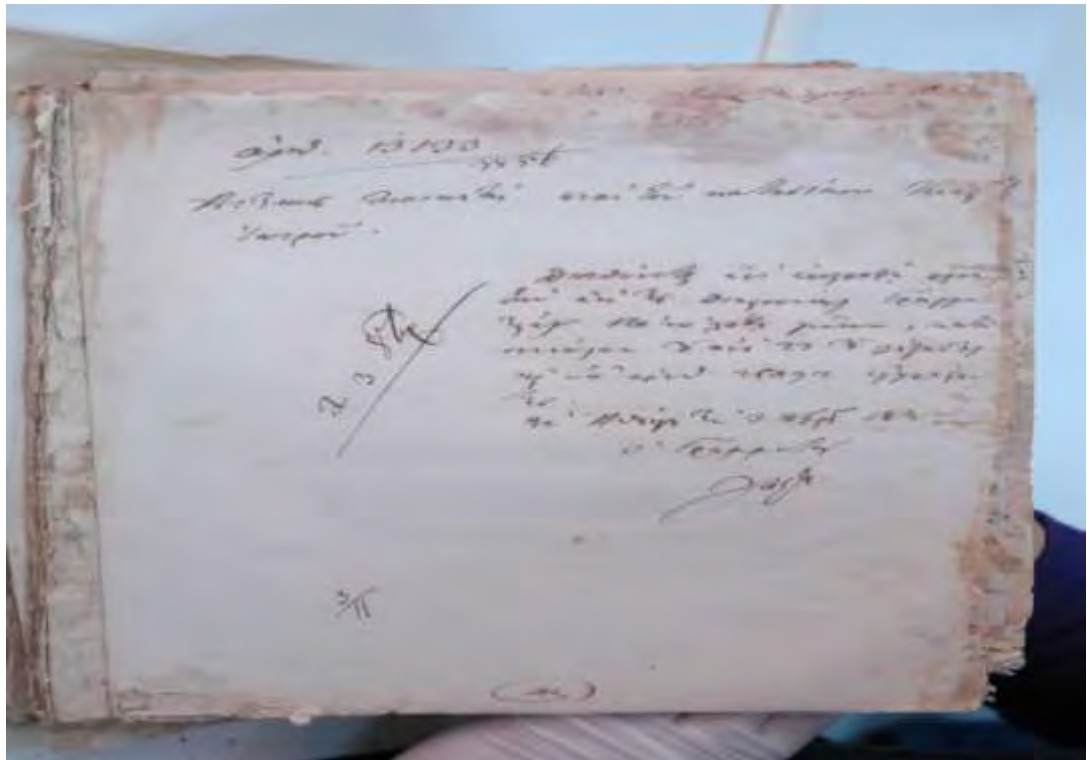
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Χειρόγραφα

Για την πραγματοποίηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από 5 χειρόγραφα προερχόμενα από το Γενικό Αρχείο του Κράτους (Αθήνα) , τα οποία παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΧΡΟΝΟΛΟΓΙΑ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ
Δείγμα 1 (εικόνα 5)	1842	ΟΘΩΝ ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ ΥΠΟΥΡΓΕΙΟΥ ΕΣΩΤΕΡΙΚΩΝ 1833-1862 ΦΥΛΑΚΕΣ ΘΥΡ. 3/11 ΦΑΚΕΛΟΣ Α
Δείγμα 2	1919-1943	ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΓΕΩΡΓΙΑΣ ΑΡΧΕΙΟ ΕΚΤΙΜΗΤΙΚΩΝ ΕΠΙΤΡΟΠΩΝ ΤΩΝ ΑΝΤΑΛΛΑΞΙΜΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΣ ΚΑΝΛΙΚΑ ΤΡΑΠΕΖΟΥΝΤΟΣ ΔΙΕΥΘΥΝΣΕΙΣ ΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ 1919-1943
Δείγμα 3 (εικόνα 6)	1840	ΟΘΩΝ ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ ΥΠΟΥΡΓΕΙΟΥ ΕΣΩΤΕΡΙΚΩΝ ΕΣΩΤΕΡΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΔΙΟΙΚΗΣΕΩΝ ΣΤΕΡΕΑΣ ΕΛΛΑΔΑΣ ΘΥΡ. 1/1 (ΔΕΜΕΝΟ)
Δείγμα 4	1843	ΕΘΝΟΣΥΝΕΛΕΥΣΗ ΔΙΟΙΚΗΣΙΣ ΑΚΑΡΝΑΝΙΑΣ ΘΥΡ. 6/10 ΦΑΚΕΛΟΣ 3 ΥΠΟΦΑΚΕΛΟΣ 2
Δείγμα 5	1840	ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ ΤΗΣ ΕΠΙΚΡΑΤΕΙΑΣ ΕΠΙ ΤΩΝ ΕΣΩΤΕΡΙΚΩΝ ΓΕΝΙΚΟΝ ΑΡΧΕΙΟΝ ΕΣΩΤΕΡΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΔΙΟΙΚΗΣΕΩΣ ΣΥΡΟΥ – ΜΗΛΟΥ ΘΥΡ. 1/10 ΦΑΚΕΛΟΣ 2

Πίνακας 1: Τα 5 χειρόγραφα που μελετήθηκαν.



Εικόνα 5 : Χειρόγραφο Δείγμα 1



Εικόνα 6 : Χειρόγραφο Δείγμα 3

3.1.1 Δειγματοληψία

Αποστειρωμένες μπατονέτες χρησιμοποιήθηκαν για την απόκτηση δειγμάτων, κατάλληλων για καλλιέργεια και αναγνώριση μυκήτων και βακτηρίων, από περιοχές με ορατή την αλλοίωση του υλικού. Η χρήση μπατονέτας θεωρείται «μη επιθετική» μέθοδος συλλογής δείγματος. (Michaelson *et al.*, 2009) Τμήμα του βιοαλλοιωμένου χαρτιού συλλέχτηκε, επίσης, με τη χρήση αποστειρωμένων νυστεριών. Στη συνέχεια, οι μπατονέτες και τα κομμάτια χαρτιού φυλάχθηκαν σε αποστειρωμένα vials (γυάλινα μπουκαλάκια με πώμα) και falcons αντίστοιχα στους 4°C.

3.2 Καλλιέργεια μυκήτων

Η βιωσιμότητα των μυκήτων, που απομακρύνθηκαν από το χαρτί με τη χρήση αποστειρωμένων μπατονέτων, δοκιμάστηκε σε στέρες καλλιέργειες. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των μυκήτων είναι το Malt Extract Yeast με στρεπτομυκίνη (stm 0.5g/L) για την παρεμπόδιση ανάπτυξης βακτηρίων.

3.2.1 Θρεπτικό υλικό

Το Malt Extract Yeast άγαρ είναι ένα όξινο μέσο το οποίο εξυπηρετεί την ανάπτυξη των μυκήτων ενώ εμποδίζει των βακτηρίων. Περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1926 από τους Thom and Church σε μία μελέτη για τον *Aspergillus spp.*, υποστηρίζοντας ότι η υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες εξασφάλιζε ταχεία ανάπτυξη.

Η σύστασή του παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 2):

Συστατικά	g/L
Malt Extract	30.0
Mycological Peptone	5.0
Agar No.2	15.0

Πίνακας 2: Σύσταση θρεπτικού υλικού

Παρασκευή: Για την παρασκευή 1L θρεπτικού υλικού, ζυγίζονται 50g Malt Extract Yeast σε μορφή σκόνης και διαλύονται με ανάδευση σε 1L απιονισμένο νερό (dH₂O). Ακολουθεί αποστείρωση για 23 min.

Προετοιμασία τρυβλίων με θεραπευτικό υλικό: Μετά την ολοκλήρωση της αποστείρωσης το θεραπευτικό υλικό παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να ψυχθεί. (Απαιτείται προσοχή ώστε να μην πήξει πριν προστεθεί στα τρυβλία Petri.) Όταν η θερμοκρασία του θεραπευτικού υλικού προσεγγίσει τους 45-50 °C προστίθεται το αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη σε συγκέντρωση 0.5μg/mL (Carχική= 25 mg/mL). Αναδεύονται με προσοχή ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία αφρού. Το θεραπευτικό υλικό με τη στρεπτομυκίνη μοιράζεται σε τρυβλία με σταθερή ροή μέχρι να καλυφτεί η επιφάνειά τους. Ακολουθεί η σταθεροποίηση του θεραπευτικού υλικού παρουσία λύχνου για την αποφυγή επιμόλυνσης.

Όταν σταθεροποιηθεί, το υλικό της αποστειρωμένης μπατονέτας επιστρέφεται στο θεραπευτικό υλικό. Τα τρυβλία τοποθετούνται σε επωαστήρα σε θερμοκρασία 30 °C για περίπου 5 με 6 μέρες.

ΠΡΟΣΟΧΗ!!! Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται κάτω από στείρες συνθήκες που εξασφαλίζονται με τη φλόγα του λύχνου.

3.2.2 Στρεπτομυκίνη (stm)

Η στρεπτομυκίνη αποτελεί το αντιβιοτικό το οποίο προστίθεται στο θεραπευτικό υλικό της καλλιέργειας ώστε να αποφευχθεί η βακτηριακή μόλυνση αυτής. Απομονώθηκε από το μικροοργανισμό *Streptomyces griseus*. Ανήκει στις αμινογλυκοσίδες. Εμποδίζει την ανάπτυξη Gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων. Συγκεκριμένα, αναστέλλει τη βακτηριακή πρωτεϊνοσύνθεση. Προσδένεται στην 30S υπομονάδα του βακτηριακού ριβοσώματος εμποδίζοντας τη δέσμευση του N-formylmethionyl-tRNA στην υπομονάδα 30S. (Sharma *et al.*, 2007)

Παρασκευή αντιβιοτικού: Σε 1ml H₂O (water for injection) προστίθενται 25mg σκόνη αντιβιοτικού. Ακολουθεί ανάδευση με vortex για πλήρη ομογενοποίηση.

Το αντιβιοτικό ετοιμάζεται στην απαιτούμενη για το πείραμα ποσότητα σε αποστειρωμένο falcon. Εφόσον αναδευτεί, με μία σύριγγα απομακρύνεται από το falcon το υγρό περιεχόμενο του. Στην άκρη της σύριγγας τοποθετείται ένα φίλτρο και, κατόπιν, το αντιβιοτικό μοιράζεται με αργό, σταθερό ρυθμό σε erpendorfs των 1.5 ml. Στα erpendorfs αναγράφεται η ημερομηνία παρασκευής και η συγκέντρωση του αντιβιοτικού. Αποθηκεύονται και συντηρούνται στους -20°C.

3.2.3 Stock γλυκερόλης των μυκήτων

Για την αποθήκευση και συντήρηση των μυκήτων έχουν προταθεί διάφορες μέθοδοι. Η πιο αποτελεσματική σύμφωνα με συστηματικές μελέτες είναι η αποθήκευση στους -80°C για μακροχρόνια διατήρηση. (Mikata and Banno, 1987 ; Ito and Yokoyama, 1983 ; Juarros *et al.*, 1993)

Στην παρούσα ερευνητική εργασία η πειραματική διαδικασία βασίστηκε στο πρωτόκολλο των Juarros *et al.* . (Juarros *et al.*, 1993)

Οι μύκητες αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό στους 30°C για περίπου 5 με 6 μέρες. Σε κάθε μύκητα που αναπτύχθηκε δόθηκε ένα κωδικό όνομα F1 ως F17.

- Περίπου 5 μικρά κομμάτια μυκήτων κόβονται με αποστειρωμένο νυστέρι, σε στείρες συνθήκες που εξασφαλίζονται από τη φλόγα του λύχνου.
- Τα κομμάτια των μυκήτων μεταφέρονται σε cryovials. Για κάθε μύκητα προετοιμάστηκαν 2 cryovials.
- Σε κάθε cryovial προστίθεται 1mL αποστειρωμένης 10% v/v γλυκερόλης (900 mL water for injection και 100 mL γλυκερόλη – Απαιτείται vortex για την ομογενοποίηση τους)
- Pre-cooling: Επώαση στους 4°C για 1 ώρα. }
- Αποθήκευση στους -80°C . }

Η μέθοδος παγώματος των μυκήτων που χρησιμοποιείται καλείται “medium freezing” και περιλαμβάνει αρχικά επώαση στους 4°C για 1 ώρα και στη συνέχεια αποθήκευση στους -80°C . (Juarros *et al.*, 1993)

3.2.4. Ανακαλλιέργεια μυκήτων από stock γλυκερόλης

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται είναι “fast warming”. (Juarros *et al.*, 1993)
Το “medium freezing” σε συνδυασμό με το “fast warming” είναι πολύ πιθανό να είναι ο καλύτερος τρόπος διατήρησης των καλλιεργείων.

- Τα cryovials με τους μύκητες από τους -80°C επωάζονται στους 37°C για 15 min.
- Με αποστειρωμένη λαβίδα και σε στείρες συνθήκες αφαιρείται από το cryovial ένα κομμάτι μύκητα και τοποθετείται σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό και στρεπτομυκίνη.
- Οι μύκητες επωάζονται στους 30°C για περίπου 5 με 6 μέρες.

3.3 Μοριακή ταυτοποίηση μυκήτων

Η ταυτοποίηση των μυκήτων που απομονώθηκαν από το χαρτί πραγματοποιήθηκε με μια σειρά πειραματικών διαδικασιών:

1. Απομόνωση DNA από τις αποικίες των μυκήτων
2. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0.8% w/v
3. Ενίσχυση της περιοχής ITS των μυκήτων με PCR χρησιμοποιώντας τα ζεύγη εκκινητών ITS1- ITS4 (για 15 μύκητες) και ITS1F-NLB4 (για 2 μύκητες)
4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0.8% w/v
5. Καθαρισμός των προϊόντων PCR
6. Αλληλούχιση και ανάλυση των αλληλουχιών με προγράμματα βιοληροφορικής

3.3.1. Απομόνωση DNA από τις αποικίες των μυκήτων

Μετά την καλλιέργεια των μυκήτων σε Malt Extract Yeast άγαρ, πραγματοποιήθηκε η απομόνωση DNA από τις 17 διαφορετικές αποικίες που αναπτύχθηκαν. Η απομόνωση του DNA έγινε με το κιτ “NucleoSpin Plant II” της MACHEREY-NAGEL ενώ σε κάποιες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε και το κιτ “NucleoSpin Soil” της ίδιας εταιρείας. Συγκεκριμένα το κιτ “NucleoSpin Soil” χρησιμοποιήθηκε για τους μύκητες F4 και F16.

Οι μύκητες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν «φρέσκοι», δηλαδή η απομόνωση πραγματοποιήθηκε αμέσως μετά το πέρας της επώασης. Το κιτ “NucleoSpin Plant II” για την απομόνωση DNA από τους 15 μύκητες τροποποιήθηκε στο στάδιο της ομογενοποίησης. Η ποσότητα του μύκητα που χρησιμοποιήθηκε ήταν 250mg και ο χρόνος επώασης στους 65 °C για όλους 1 ώρα. Διαφορά υπήρξε στη διάρκεια επεξεργασία τους με αιθανόλη. Για τους μύκητες F2, F3, F5, F7, F8, F13, F15, F17 η επεξεργασία στην αιθανόλη διήρκησε 40 λεπτά ενώ για τους υπόλοιπους 10.

3.3.2. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0.8% w/v

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης βασίζεται στο διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθος τους. Πραγματοποιήθηκε για να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα της απομόνωσης του DNA. Το μέγεθος των τμημάτων εκτιμάται με βάση το μάρτυρα μοριακών μεγεθών τμημάτων DNA. Ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε είναι ο 2-Log DNA Ladder της BioLabs (0.1 – 10.0 kb).

Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 0.8 % w/v

- Σε κωνική φιάλη προστίθενται 0.8 gr αγαρόζης και 100mL TBE 1X (τελική συγκέντρωση 0.8 % w/v). Το αρχικό διάλυμα TBE 10X είχε προηγουμένως αραιωθεί (10mL TBE+90mL H₂O).
 - Το διάλυμα αναδεύεται και κατόπιν θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων για 2 λεπτά μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη.
 - Η κωνική φιάλη απομακρύνεται από το φούρνο μικροκυμάτων και προστίθεται TBE 1X σε περίπτωση που έχει εξατμιστεί ώστε ο όγκος να παραμένει 100mL.
 - Προστίθενται στο διάλυμα 10μL (10mg/mL) βρωμιούχο αιθίδιο για να είναι εμφανείς οι ζώνες του DNA κατά την παρατήρηση του πηκτώματος σε λάμπα UV και αναδεύεται.
 - Σε plate με χτενάκι για το σχηματισμό πηγαδιών μεταφέρεται το διάλυμα της αγαρόζης για να πήξει. Η μεταφορά γίνεται προσεχτικά για να μη δημιουργηθούν φουσκάλες.
 - Ο χρόνος πήξης είναι περίπου 20 min.
 - Μόλις το πήκτωμα πήξει απομακρύνεται προσεχτικά το χτενάκι και μεταφέρεται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης η οποία περιέχει buffer ηλεκτροφόρησης TBE 10X 10% v/v (630 mL dH₂O και 70 mL TBE). Η ποσότητα του buffer ηλεκτροφόρησης πρέπει να είναι τόση ώστε να καλύπτεται και το πήκτωμα.
- ΠΡΟΣΟΧΗ!!! Η διαδικασία παρασκευής του πηκτώματος αγαρόζης λαμβάνει χώρα σε απαγωγό λόγω της επικίνδυνης φύσης του βρωμιούχου αιθιδίου.

Ηλεκτροφόρηση:

Σε parafilm προστίθενται για κάθε δείγμα 2μL 6X Blue Loading Dye της BioLabs και 8μL DNA. Αναμιγνύονται με πιπετάρισμα και φορτώνονται στα πηγάδια. Στο πρώτο πηγάδι φορτώνεται ο μάρτυρας 2-Log DNA Ladder. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 110 με 120 volts. Μόλις ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση το πήκτωμα παρατηρείται και φωτογραφίζεται σε λάμπα UV.

3.3.3. Ενίσχυση της περιοχής ITS των μυκήτων με PCR χρησιμοποιώντας τα ζεύγη εκκινητών ITS1- ITS4 (για 15 μύκητες) και ITS1F-NLB4 (για 2 μύκητες)

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 50 μl. Τα συστατικά της αντίδρασης είναι τα ακόλουθα (πίνακας 3 και 4):

	Αρχικές Συγκεντρώσεις	Τελικές Συγκεντρώσεις	Σε τελικό όγκο V=50 μL.
dH₂O (water for injection)			37 μL
Buffer (TAKARA)	10X	1X	5 μL
dNTPS (TAKARA)	2.5mM	250μM	5 μL
ITS1	14.3 μM	0.4 μM	1.4 μL
ITS4	55 μM	0.4 μM	0.4 μL
Ex Taq DNA pol (TAKARA)	5u/μl	1 unit	0.2 μL
DNA			1μL

Πίνακας 3: τα συστατικά της αντίδρασης PCR με το ζεύγος εκκινητών ITS1-ITS4

	Αρχικές Συγκεντρώσεις	Τελικές Συγκεντρώσεις	Σε τελικό όγκο V=50 μL.
dH₂O (water for injection)			38.164 μL
Buffer (TAKARA)	10X	1X	5 μL
dNTPS (TAKARA)	2.5mM	250μM	5 μL
ITS1-F	58.7 μM	0.4 μM	0.34 μL
NLB4	67.5 μM	0.4 μM	0.296 μL
Ex Taq DNA pol (TAKARA)	5u/μl	1 unit	0.2 μL

DNA			1μL
------------	--	--	-----

Πίνακας 4: τα συστατικά της αντίδρασης PCR με το ζεύγος εκκινητών ITS1-F-NLB4

Σε όλες τις διαδικασίες ενίσχυσης περιοχής με PCR χρησιμοποιείται “Negative control” δηλαδή χωρίς το DNA- μήτρα για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη ή όχι επιμολύνσεων.

Η ποσότητα του DNA-template δεν ήταν για όλους τους μύκητες ίδια:

1μL DNA-template → F1, F3, F4, F9, F10, F14, F16

2μL DNA-template → F6, F11, F12

3μL DNA-template → F5, F7, F13, F18

4μL DNA-template → F2, F15

6μL DNA-template → F17

Η PCR βασίστηκε στο πειραματικό πρωτόκολλο των Mesquita *et al.* (Mesquita *et al.*, 2009). Συγκεκριμένα (πίνακας 5):

Στάδια	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Αριθμός κύκλων
Initial Denaturation	95°C	2 min	
Denaturation	95°C	1 min	40
Annealing	55°C	1 min	
Extension	72°C	1 min	
Final Extension	72°C	10 min	

Πίνακας 5: Τα στάδια της PCR.

Όλα τα προϊόντα των PCR, ελέγχονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% v/w.

Αλληλουχίες των εκκινητών

Εκκινητές	Αλληλουχίες
ITS1	5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'
ITS4	5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3'

ITS1-F	5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A -3'
NLB4	5'-GGA TTC TCA CCC TCT ATG AC -3'

Πίνακας 6: Οι εκκινητές και οι αλληλουχίες τους.

3.3.4. Καθαρισμός των προϊόντων PCR

Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR σε τελικό όγκο V_{τελ.} = 30μL επιτυγχάνεται με το κιτ της MACHEREY-NAGEL “NucleoSpin Extract II”.

3.3.5. Αλληλούχιση και ανάλυση των αλληλουχιών με προγράμματα βιοπληροφορικής

Τα καθαρισμένα προϊόντα της PCR αλληλουχήθηκαν από το τμήμα Ιστολογίας – Ιστοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η ανάλυση των αλληλουχιών και η ταυτοποίηση των μυκήτων έγινε με το εργαλείο βιοπληροφορικής BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Πρόκειται για ευρετικό αλγόριθμο για ανίχνευση ομόλογων ακολουθιών.

3.4 Απομόνωση DNA απευθείας από το χαρτί

Τμήματα του βιοαλλοιωμένου χαρτιού συλλέχθηκαν, όπως προαναφέρθηκε, με τη χρήση αποστειρωμένων νυστεριών και διατηρήθηκαν σε αποστειρωμένα falcons στους 4°C. Με τις μοριακές τεχνικές δίδεται η δυνατότητα να ανιχνευτούν όχι μόνο οι βιώσιμοι μύκητες που εντοπίζονται αλλά και οι παλαιότερα ενεργοί στους οποίους πιθανόν οφείλεται η βιοαλλοίωση του.

Η απομόνωση του DNA απευθείας από το χαρτί πραγματοποιείται με το κιτ “NucleoSpin Soil” της MACHEREY-NAGEL. Η χρήση των σφαιριδίων του κιτ στο στάδιο της ομογενοποίησης έχει αποδειχτεί ότι αποτελεί πολύ αποτελεσματική μέθοδο απομόνωσης DNA του μύκητα από το αλλοιωμένο χαρτί. (Michaelsen *et al.*, 2006) Τα χειρόγραφα από τα οποία απομονώθηκε DNA είναι τα: Δείγμα 1, 2 και 4.

Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8%w/v για να επιβεβαιωθεί η επιτυχία της απομόνωσης.

3.4.1 Ενίσχυση με PCR του DNA που απομονώνεται από τα χειρόγραφα

Για την ενίσχυση του τμήματος DNA που απομονώνεται από τα χειρόγραφα (Δείγμα 1, 2 και 4) πραγματοποιείται PCR στις συνθήκες που περιγράφει ο πίνακας 5.

Τα συστατικά της αντίδρασης (master mix) για τα Δείγματα 1 και 4, σε τελικό όγκο $V=50\mu\text{L}$ είναι τα ακόλουθα (πίνακας 7):

	Αρχικές Συγκεντρώσεις	Τελικές Συγκεντρώσεις	Σε τελικό όγκο $V=50\mu\text{L}$.
dH₂O (water for injection)			33.164 μL
Buffer (TAKARA)	10X	1X	5 μL
dNTPS (TAKARA)	2.5mM	250 μM	5 μL
ITS1-F	58.7 μM	0.4 μM	0.34 μL
NLB4	67.5 μM	0.4 μM	0.296 μL
Ex Taq DNA pol (TAKARA)	5u/ μl	1 unit	0.2 μL
DNA			6 μL

Πίνακας 7: τα συστατικά της αντίδρασης PCR για τα χειρόγραφα Δείγμα 1 και 4.

Τα συστατικά της αντίδρασης για το Δείγμα 2, σε τελικό όγκο $V=50\mu\text{L}$ είναι τα ακόλουθα (πίνακας 8):

	Αρχικές Συγκεντρώσεις	Τελικές Συγκεντρώσεις	Σε τελικό όγκο $V=50\mu\text{L}$.
dH₂O (water for injection)			33.06 μL
Buffer (TAKARA)	10X	1X	5 μL
dNTPS	2.5mM	250 μM	5 μL

(TAKARA)			
ITS1-F	58.7 μ M	0.4 μ M	0.34 μ L
ITS4	55 μ M	0.4 μ M	0.4 μ L
Ex Taq DNA pol (TAKARA)	5u/ μ l	1 unit	0.2 μ L
DNA			6 μ L

Πίνακας 8: τα συστατικά της αντίδρασης PCR για το χειρόγραφο Δείγμα 2.

Σε όλες τις διαδικασίες ενίσχυσης περιοχής με PCR χρησιμοποιείται “Negative control” δηλαδή χωρίς το DNA- μήτρα για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη ή όχι επιμολύνσεων. Όλα τα προϊόντα των PCR, ελέγχονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% w/v.

3.4.2. Καθαρισμός των προϊόντων PCR

Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR σε τελικό όγκο Vτελ. = 30 μ L επιτυγχάνεται με το kit της MACHEREY-NAGEL “NucleoSpin Extract II”. Τα καθαρισμένα προϊόντα διατηρούνται στους -20°C.

3.5 Κλωνοποίηση

Δημιουργείται μία βιβλιοθήκη η οποία περιέχει τις περιοχές ITS με σκοπό τη λεπτομερή φυλογενετική ταυτοποίηση των μυκήτων.

3.5.1 Ligation

Το ligation πραγματοποιείται με το kit της Promega “Cloning PCR Products with pGEM-T and pGEM-T Easy Vectors”. Το buffer 2X Rapid Ligation αναδεύεται με vortex και στη συνέχεια προετοιμάζεται η αντίδραση μέσα σε πάγο για την προστασία του ενζύμου.

Σε τελικό όγκο V=10 μ L τα συστατικά της αντίδρασης είναι τα ακόλουθα (πίνακας 9):

Συστατικά	Ποσότητα (σε μL)
2x Rapid Ligation buffer, T4 DNA Ligase	5 μ L
pGEM- T Easy Vector (50ng)	1 μ L
PCR product	X μ L

T4 DNA ligase	2 μ L
dH ₂ O	1 μ L

Πίνακας 9 : Η αντίδραση του Ligation.

Τα συστατικά αναμειγνύονται με πιπετάρισμα.

Ακολουθεί επώαση στους 4°C overnight.

Η ποσότητα του PCR product που προστίθεται υπολογίζεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$\frac{\text{ng of vector} \times \text{kb size of insert}}{\text{kb size of vector}} \times \text{insert:vector molar ratio} = \text{ng of insert}$$

Το μέγεθος του φορέα pGEM-T Easy είναι 3.015 bp.

Εφόσον υπολογιστεί ο παραπάνω μαθηματικός τύπος, η συγκέντρωση του προϊόντος PCR υπολογίζεται με τη βοήθεια του ladder. Η μπάντα που δίνει το προϊόν συγκρίνεται με αυτές του ladder. Συνεπώς, γνωρίζοντας τα ng του ενθέματος και τα ng που αντιστοιχούν στη μπάντα που εμφανίζεται στο πήκτωμα είναι δυνατός ο προσδιορισμός της ποσότητας του προϊόντος PCR.

3.5.2 Μετασηματισμός

Ο μετασηματισμός στην παρούσα ερευνητική εργασία βασίστηκε στο κιτ της Promega “ Cloning PCR Products with pGEM-T and pGEM-T Easy Vectors”. Το πρωτόκολλο του κιτ τροποποιήθηκε. Πρέπει να αναφερθεί ότι για το χειρόγραφο Δείγμα 4 χρησιμοποιήθηκαν δεκτικά κύτταρα *E.coli* στέλεχος JM109 έτοιμα από την εταιρεία Promega. Στα χειρόγραφα Δείγμα 1 και 2 χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα *E.coli* στέλεχος JM109 τα οποία μετατράπηκαν σε δεκτικά μέσω επεξεργασίας με χλωριούχο ρουβίδιο.

3.5.2.1 Τα στάδια του μετασηματισμού

Τα στάδια του μετασηματισμού που ακολουθήθηκαν είναι:

1. Τα JM109 δεκτικά κύτταρα (διατηρούνται στους -80 °C) τοποθετούνται σε πάγο ώστε να ξεπαγώσουν (περίπου 5 min)
2. Η αντίδραση του Ligation αναμειγνύεται με πιπετάρισμα
3. Εφόσον τα δεκτικά κύτταρα έχουν ξεπαγώσει προστίθενται 5 μ L Ligation

4. Ανάμειξη με πιπετάρισμα.
5. Επώαση στον πάγο για 20 λεπτά
6. Τα κύτταρα μεταφέρονται σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 42°C για 45-50 δευτερόλεπτα και
7. Αμέσως μετά ξανά στον πάγο για 2 λεπτά.
8. Στα κύτταρα προστίθενται 900μL θρεπτικού LB Broth.
9. Επώαση στους 37°C με ανάδευση για περίπου 2 ώρες.
10. Μόλις ολοκληρωθεί η επώαση σε τρυβλία Petri με LB άγαρ, Αμπικιλίνη (Amp), IPTG και X-gal επιστρώνονται τα μετασηματισμένα κύτταρα. Σε κάθε τρυβλίο επιστρώνονται 100μL αυτών. Η επίστρωση πραγματοποιείται σε στείρες συνθήκες παρουσία του λύχνου.
11. Overnight επώαση στους 37°C με σκοπό την ανάπτυξη και συλλογή άσπρων αποικιών.

3.5.2.2 Προετοιμασία Δεκτικών Κυττάρων *E. coli* στέλεχος JM109

Τα κύτταρα *E. coli* στέλεχος JM109 μετατρέπονται σε δεκτικά μέσω τροποποίησης τους με χλωριούχο ρουβίδιο. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ακόλουθη:

1. Προετοιμασία 5-10 mL υγρής καλλιέργειας LB Broth και overnight επώαση στους 37°C με ανάδευση.
2. Σε δύο φλάσκες με 200mL LB Broth μεταφέρονται από 2ml της υγρής καλλιέργειας μετά την overnight επώαση και ακολουθεί επώαση στους 37°C με ανάδευση έως ότου $OD_{595}=0.5$. Η μεταφορά γίνεται σε στείρες συνθήκες.
3. Επώαση στον πάγο στα 15 λεπτά.
4. Το περιεχόμενο της φλάσκας μοιράζεται σε 4 falcons, από 50mL κάθε falcon.
5. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 4500rpm για 10 λεπτά.
6. Απομακρύνεται το υπερκείμενο.
7. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για την υπόλοιπη ποσότητα της καλλιέργειας.
8. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 12mL TFbI με πιπετάρισμα. Η επαναδιάλυση γίνεται μέσα σε πάγο όπου τα falcons παραμένουν για 15 λεπτά.
9. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 4000rpm για 5 λεπτά.
10. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 6 mL TFbII με πιπετάρισμα στον πάγο.

11. Τα aliquots αποθηκεύονται στους -80°C .

✓ Τα tips και τα erpendorfs διατηρούνται στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν στα βήματα 8 ως 11.

Το διάλυμα **TfbI** με $V=200\text{mL}$ αποτελείται από (πίνακας 10):

Συστατικά	Ποσότητα
RbCl (χλωριούχο ρουβίδιο)	2.9gr
MnCl ₂ (χλωριούχο μαγγάνιο)	2gr
CaCl ₂ (χλωριούχο ασβέστιο)	0.3gr
Potassium acetate (οξικό κάλιο)	5.88gr
Γλυκερόλη 15% (αποστειρωμένη)	30mL
dH ₂ O	170mL

Πίνακας 10: Τα συστατικά του TfbI.

Το διάλυμα **TfbII** με $V=50\text{mL}$ αποτελείται από (πίνακας 11):

Συστατικά	Ποσότητα
MOPS	2.5mL
RbCl (χλωριούχο ρουβίδιο)	0.06gr
CaCl ₂ (χλωριούχο ασβέστιο)	0.55gr
Γλυκερόλη 15% (αποστειρωμένη)	7.5mL
dH ₂ O	40mL

Πίνακας 11: Τα συστατικά του TfbII.

Για το **MOPS**: 20.93gr σκόνη MOPS διαλύεται σε 500mL dH₂O. Μία σταγόνα HCl προστίθεται στο MOPS ώστε να αποκτήσει pH=6.5.

Τα MOPS, TfbI και TfbII μεταφέρονται σε αποστειρωμένα falcons με τη βοήθεια σύριγγας και φίλτρου. Τα falcons τυλίγονται με αλουμινόχαρτο και τοποθετούνται μέχρι τη χρήση τους στους 4°C .

3.5.2.3 Προετοιμασία τρυβλίων Petri με LB άγαρ, Αμπικιλίνη, IPTG και X-gal

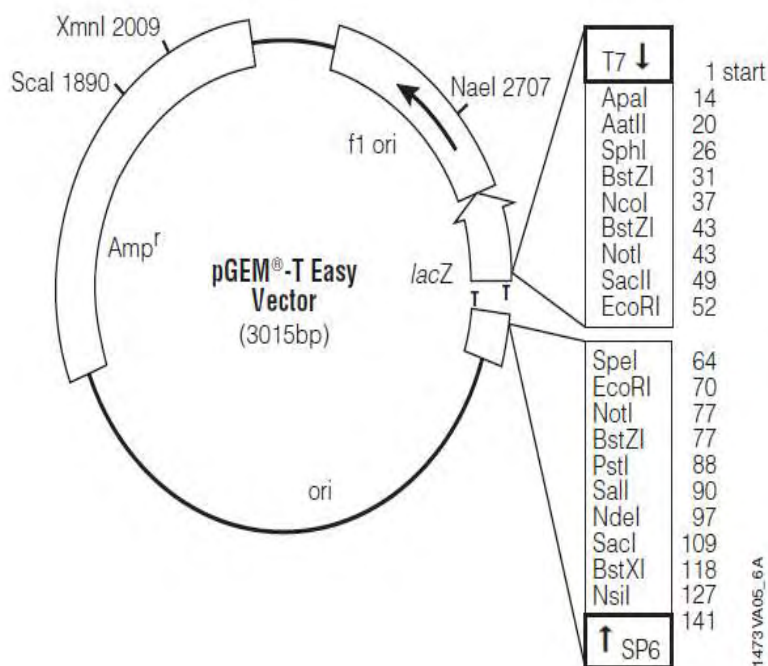
Παρασκευή LB άγαρ: Για την παρασκευή 1L θρεπτικού υλικού ζυγίζονται 30 gr LB άγαρ σε μορφή σκόνης και διαλύονται με ανάδευση σε 1L απιονισμένο νερό (dH₂O). Ακολουθεί αποστείρωση για 23 min.

Προετοιμασία τρυβλίων με θρεπτικό υλικό: Μετά την ολοκλήρωση της αποστείρωσης το θρεπτικό υλικό παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να ψυχθεί. (Απαιτείται προσοχή ώστε να μην πήξει πριν προστεθεί στα τρυβλία Petri.) Όταν η θερμοκρασία του θρεπτικού υλικού προσεγγίσει τους 45-50 °C προστίθενται αμπικιλίνη (Conc.= 100mg/mL), IPTG (Conc.=100mM) και X-gal (Conc.= 40mg/mL) σε συγκεντρώσεις 100μg/mL, 0.5mM και 80μg/mL αντίστοιχα. Αναδεύονται με προσοχή ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία αφρού. Το θρεπτικό υλικό με την αμπικιλίνη, το IPTG και το X-gal μοιράζεται σε τρυβλία με σταθερή ροή μέχρι να καλυφθεί η επιφάνειά τους. Ακολουθεί η σταθεροποίηση του θρεπτικού υλικού παρουσία λύχου για την αποφυγή επιμόλυνσης.

Όταν σταθεροποιηθεί, σε κάθε τρυβλίο προστίθενται 100μL καλλιέργειας και επιστρώνονται με κυκλικές κινήσεις μέσω αποστειρωμένης γυάλινης πιπέτας. Ακολουθεί overnight επώαση στους 37 °C.

3.5.3 Έλεγχος Αποικιών

Η επιλογή των μετασηματισμένων κλώνων αυτών δηλαδή που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο, ανασυνδυασμένο ή μη, πραγματοποιείται με την παρουσία του αντιβιοτικού (Αμπικιλίνη στη συγκεκριμένη περίπτωση) που υπάρχει στο θρεπτικό μέσο των τρυβλίων. Η επιλογή των βακτηρίων που έχουν προσλάβει ανασυνδυασμένο πλασμίδιο βασίζεται στο γονίδιο β-γαλακτοσιδάση του οπερονίου lac. Το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση υδρολύει την ουσία X-gal παράγοντας μια αδιάλυτη μπλε χρωστική. Η επιτυχής ένθεση του DNA στο φορέα pGEM T-Easy (εικόνα 7) διακόπτει την κωδική αλληλουχία της β-γαλακτοσιδάσης. Οι ανασυνδυασμένοι κλώνοι αναγνωρίζονται με έλεγχο του χρώματος των αποικιών. Πρόκειται για λευκές αποικίες καθώς η ένθεση προκαλεί την αδρανοποίηση της β-γαλακτοσιδάσης. Οι αποικίες που περιέχουν φορείς στους οποίους δεν έχει γίνει ένθεση DNA αποκτούν μπλε χρώμα.



Εικόνα 7: ο χάρτης του φορέα pGEM T-Easy, όπου παρατηρείται η θέση έναρξης αντιγραφής (ori), το γονίδιο β λακταμάση που προσφέρει ανθεκτικότητα στην Amp (Amp^r), το οπερόνιο lac, η θέση αναγνώρισης από ένζυμο περιορισμού, η θέση έναρξης της μεταγραφής από την T7 RNA πολυμεράση κ.λ.π. (Η πηγή της εικόνας είναι ο εργαστηριακός οδηγός του κιτ της Promega “ Cloning PCR Products with pGEM-T and pGEM-T Easy Vectors”.)

3.5.4 Έλεγχος των λευκών αποικιών

Οι λευκές-θετικές αποικίες ελέγχονται επιπλέον με ενίσχυση με PCR και με πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση ώστε να επιβεβαιωθεί η παρουσία του ενθέματος.

Στα τρυβλία όπου έχουν αναπτυχθεί οι αποικίες, σημειώνονται 8 λευκές και αποσπώνται με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας σε στείρες συνθήκες. Σε ένα τρυβλίο με LB agar/Amp/X-gal/IPTG χωρισμένο σε 8 τμήματα επιστρώνεται με την οδοντογλυφίδα η λευκή αποικία. (Σε κάθε ένα από τα 8 τμήματα επιστρώνεται και μία αποικία.) Η καλλιέργεια επωάζει overnight στους 37 °C.

Α Έλεγχος με PCR

Πρόκειται για Colony PCR η οποία γίνεται για να επιβεβαιωθεί η ένθεση.

Η αντίδραση της Colony PCR για το χειρόγραφο Δείγμα 1 σε τελικό όγκο $V=25\mu\text{L}$ αποτελείται από τα ακόλουθα συστατικά:

	Αρχικές Συγκεντρώσεις	Τελικές Συγκεντρώσεις	Σε τελικό όγκο $V=25\mu\text{L}$.
dH₂O (water for injection)			21.152 μL
Buffer (GENEON)	10X	1X	2.5 μL
MgCl₂	100mM	2mM	0.5 μL
dNTPS (TAKARA)	2.5mM	250 μM	0.25 μL
ITS1-F	58.7 μM	0.5 μM	0.213 μL
NLB4	67.5 μM	0.5 μM	0.185 μL
Taq DNA pol (GENEON)	5 u/ μl	1 unit	0.2 μL

Πίνακας 12: το master mix για το χειρόγραφο Δείγμα 1.

Η αντίδραση της Colony PCR για το χειρόγραφο Δείγμα 2 σε τελικό όγκο $V=25\mu\text{L}$ αποτελείται από τα ακόλουθα συστατικά:

	Αρχικές Συγκεντρώσεις	Τελικές Συγκεντρώσεις	Σε τελικό όγκο $V=50\mu\text{L}$.
dH₂O (water for injection)			21.11 μL
Buffer (GENEON)	10X	1X	2.5 μL
MgCl₂	100mM	2mM	0.5 μL
dNTPS (TAKARA)	2.5mM	250 μM	0.25 μL
ITS1-F	58.7 μM	0.5 μM	0.213 μL
ITS4	55 μM	0.5 μM	0.227 μL

Taq DNA pol (GENEON)	5u/μl	1 unit	0.2 μL
-----------------------------	-------	--------	--------

Πίνακας 13: το master mix για το χειρόγραφο Δείγμα 2.

Η αντίδραση της Colony PCR για το χειρόγραφο Δείγμα 4 σε τελικό όγκο V=25μL αποτελείται από τα ακόλουθα συστατικά:

	Αρχικές Συγκεντρώσεις	Τελικές Συγκεντρώσεις	Σε τελικό όγκο V=25 μL.
dH₂O (water for injection)			20.652 μL
Buffer (HyTest)	10X	1X	2.5 μL
MgCl₂	50mM	2mM	1 μL
dNTPS (HyTest)	25mM	250μM	0.25 μL
ITS1-F	58.7 μM	0.5 μM	0.213 μL
NLB4	67.5 μM	0.5 μM	0.185 μL
Taq DNA pol (HyTest)	5 u/μl	1 unit	0.2 μL

Πίνακας 14: το master mix για το χειρόγραφο Δείγμα 4.

Σε κάθε PCR tube που περιέχει την αντίδραση PCR προστίθεται μία μικρή ποσότητα αποικίας με τη βοήθεια αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας.

Η Colony PCR πραγματοποιείται στις ακόλουθες συνθήκες (πίνακας 15). Αυξάνεται η διάρκεια της αρχικής αποδιάταξης (πίνακας 5) από 2 λεπτά σε 5 καθώς στο master mix περιέχεται ολόκληρο το βακτηριακό κύτταρο και όχι το DNA του μύκητα όπως στις παραπάνω περιπτώσεις PCR. Συνεπώς, είναι απαραίτητη η μεγαλύτερη διάρκεια αποδιάταξης ώστε να απελευθερωθεί το πλασμίδιο που φέρει ένθεμα.

Στάδια	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Αριθμός κύκλων
Initial Denaturation	95°C	5 min	
Denaturation	95°C	1 min	40
Annealing	55°C	1 min	
Extension	72°C	1 min	

Final Extension	72°C	10 min	
------------------------	------	--------	--

Πίνακας 15: τα στάδια της αντίδρασης της Colony PCR.

B. Έλεγχος με πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση

1. Προετοιμασία υγρών καλλιέργειών LB Broth: Σε 8 vials με 5mL LB Broth το καθένα, προστίθενται 5μL αμπικιλίνης. Στη συνέχεια, με αποστειρωμένες οδοντογλυφίδες αποσπάται μέρος από τις 8 αποικίες του τρυβλίου (βλ. 3.5.4) και εμβαπτίζονται στα vials. Απαιτείται ανάδευση ώστε το περιεχόμενο της οδοντογλυφίδας να ενσωματωθεί στο υγρό θρεπτικό υλικό. Η διαδικασία πραγματοποιείται παρουσία λύχνου. Οι καλλιέργειες επωάζουν overnight στους 37 °C με ανάδευση. Με την ολοκλήρωση της επώασης οι καλλιέργειες είναι θολές.

Παρασκευή LB Broth: Σε 900mL dH₂O διαλύονται 20gr LB Broth σε μορφή σκόνης.

2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA: με το κιτ “Nucleic acid and Protein Purification” της MACHEREY-NAGEL.

3. Πέψη με το ένζυμο EcoRI:

Σε τελικό όγκο αντίδρασης V=20μL προστίθενται μέσα σε πάγο:

- 10μL πλασμιδιακό DNA
- 2μL buffer H (αναδεύεται με vortex πριν τη χρήση του)
- 7μL dH₂O (water for injection)

Αναμειγνύονται με πιπετάρισμα και τέλος προστίθεται

- 1μL ενζύμου EcoRI.

Επώαση στους 37 °C για 3 ώρες.

Με το πέρας της επώασης τα προϊόντα της πέψης ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% w/v.

3.5.5 Συλλογή λευκών αποικιών

Οι λευκές αποικίες συλλέγονται σε ένα microtiter plate με 96 πηγάρια και αποθηκεύονται στους -80°C. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ακόλουθη:

- Παρασκευή 100ml LB Broth (75%) και γλυκερόλης (25%). Σε ένα μπουκάλι, σε 75mL dH₂O διαλύονται 1.66gr LB Broth. Προστίθενται 25 mL

γλυκερόλη. Το διάλυμα αναδεύεται με μαγνήτη μέχρι να γίνει διαυγές. Ακολουθεί αποστείρωση για 23 λεπτά.

- Σε ένα falcon μεταφέρονται 30mL του διαλύματος.
- Στα 30mL διαλύματος προστίθενται 3μL Αμπικιλίνη και αναδεύονται.
- Σε κάθε ένα από τα πηγάδια του microtiter plate μοιράζονται 200μL διαλύματος.
- Στη συνέχεια, με τη χρήση αποστειρωμένων οδοντογλυφίδων απομακρύνονται από τα τρυβλία οι λευκές αποικίες και μεταφέρονται στα πηγάδια του plate.
- Overnight επώαση στους 37 °C.
- Αποθήκευση (εφόσον έχουν οι καλλιέργειες θολώσει) στους -80 °C.

Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται σε στείρες συνθήκες που εξασφαλίζονται από το λύχνο.

3.5.6 Απομόνωση και καθαρισμός πλασμιδιακού DNA

Το τελευταίο βήμα, εφόσον, επιβεβαιωθεί η παρουσία ενθέματος είναι η απομόνωση και ο καθαρισμός του πλασμιδιακού DNA. Απαιτείται, αρχικά, η προετοιμασία υγρών καλλιεργειών LB Broth με αμπικιλίνη και στη συνέχεια πραγματοποιείται η απομόνωση με το κιτ “Nucleic acid and Protein Purification” της MACHEREY-NAGEL.

Τα καθαρισμένα πλασμιδιακά DNA αποστέλλονται για αλληλούχηση και αναλύονται με το εργαλείο βιοπληροφορικής, το BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Καλλιέργεια μυκήτων

Οι καλλιέργειες που έχουν συσταθεί χρησιμοποιώντας μύκητες οι οποίοι αποσπάστηκαν από τα χειρόγραφα με τη χρήση μπατονέτων σε malt yeast extract άγαρ οδήγησαν στην ανάπτυξη 17 διαφορετικών μορφολογικά αποικιών. Οι αποικίες στις οποίες δόθηκαν ονόματα F1 ως F17 παρουσίαζαν τα ακόλουθα μορφολογικά χαρακτηριστικά:

F1: Κυκλικός με 3 χρωματικές φάσεις (από έξω προς τα μέσα) άσπρο, πράσινο, πορτοκαλί

F2: Μικρός, κυκλικός, λευκοκίτρινος, χνουδωτός - Αναπτύχθηκε μόνο μία αποικία

F3: ανοιχτό ροζ, ακτινωτός

F4: Ακανόνιστο σχήμα, άσπρος-πράσινος

F5: Κυκλικός, λευκός χνουδωτός (αναπτύσσεται προς τα πάνω)

F6: Κυκλικός, διαφανής – Αναπτύχθηκε μόνο μία αποικία.

F8: Κυκλικός λευκός προς σκούρο πράσινο – Αναπτύχθηκε μόνο μία αποικία

F9: Πράσινος κυκλικός

F10: Λευκός κυκλικός

F11: Κυκλικός, άσπρος- πράσινος.

F12: Λευκός κυκλικός.

F13: Κυκλικός καφέ με λευκό στεφάνι

F14: Κυκλικός με 2 χρωματικές φάσεις (από έξω προς τα μέσα) λευκός – πράσινος.

F15: Κυκλικός καφέ με άσπρο χνούδι

F16: Λευκός ακτινωτός

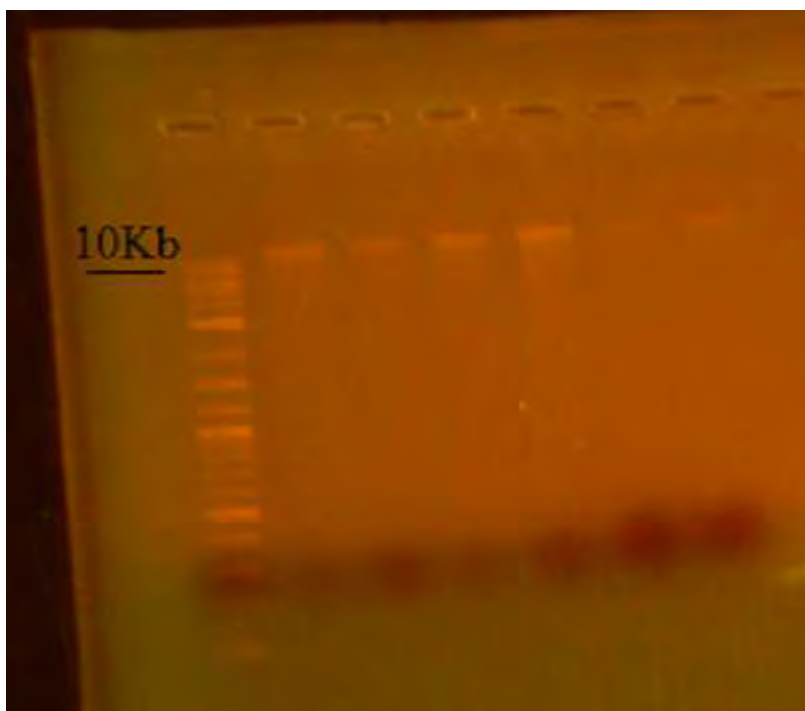
F17: Ακανόνιστο σχήμα, λευκός – Αναπτύχθηκε μόνο μία αποικία.

	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 3	Δείγμα 4	Δείγμα 5
F1		✓			
F2	✓				
F3		✓			
F4		✓			
F5				✓	
F6				✓	
F7					✓
F8					✓
F9	✓	✓	✓		✓
F10	✓	✓		✓	
F11		✓			✓
F12		✓			
F13			✓		
F14	✓		✓	✓	
F15				✓	
F16				✓	
F17				✓	

Πίνακας 16: Στον παραπάνω πίνακα παρατηρείται η κατανομή των μυκήτων με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά σε καθένα από τα 5 χειρόγραφα που μελετήθηκαν.

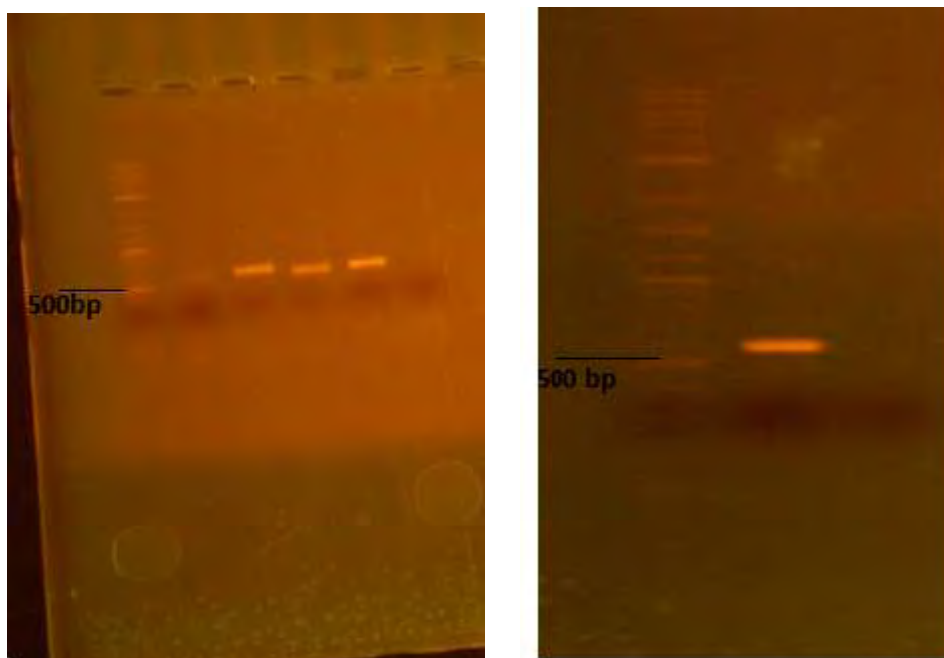
4.2 Απομόνωση DNA από τους καλλιεργήσιμους μύκητες και ενίσχυση της περιοχής ITS των μυκήτων

Το DNA των μυκήτων που αναπτύχθηκαν στην καλλιέργεια απομονώθηκε με τα κιτ “NucleoSpin Plant II” και το “NucleoSpin Soil” της MACHEREY-NAGEL (εικόνα 8).

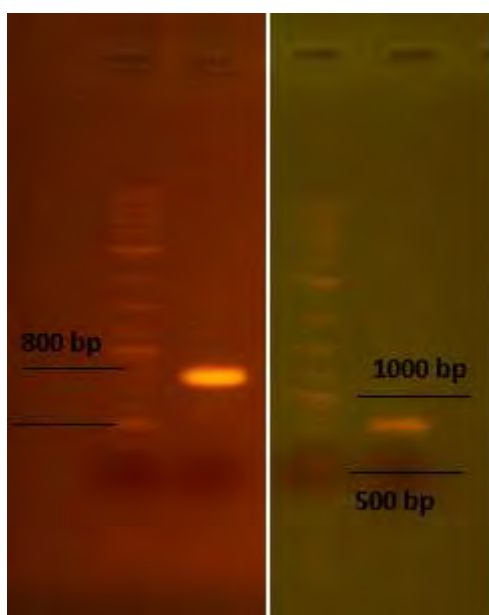


Εικόνα 8: Στο πήκτωμα απεικονίζεται στο 1^ο πηγάδι ο μάρτυρας 2-Log DNA Ladder της BioLabs (0.1 – 10.0 kb), στο 2^ο έως στο 7^ο το ολικό DNA των μυκήτων, F3, F9, F10, F11, F12, F15, F17 αντίστοιχα, που απομονώθηκαν με το κιτ “NucleoSpin Plant II” της MACHEREY-NAGEL. Το μέγεθος των τμημάτων είναι άνω των 10Kb.

Το DNA που απομονώθηκε ενισχύθηκε με PCR με τους εκκινητές ITS1-ITS4 και ITS1-F –NLB4, που στοχεύουν στις ITS περιοχές των μυκήτων. Η ενίσχυση με το ζεύγος εκκινητών ITS1-ITS4 δίνει τμήμα μήκους 450-650 bp. Αντίστοιχα, η ενίσχυση με το ζεύγος ITS1-F –NLB4 δίνει τμήμα μήκους 700-800 βάσεων. Η ηλεκτροφορήση των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% w/v επιβεβαιώνει ότι το τμήμα που ενισχύθηκε είναι το επιθυμητό (εικόνες 9-10).



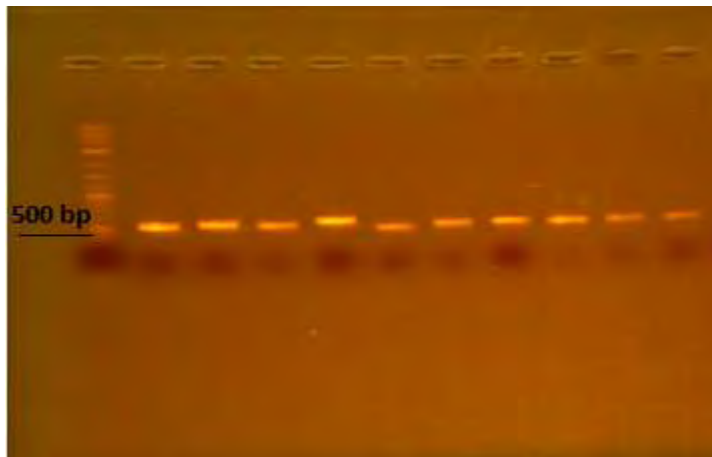
Εικόνα 9 α, β: Στο πήκτωμα απεικονίζεται στο 1^ο πηγάδι ο μάρτυρας 2-Log DNA Ladder της BioLabs (0.1 – 10.0 kb), στο 3^ο, 4^ο, και 5^ο οι μύκητες F5, F7 και F13 αντίστοιχα. Στο 5^ο πηγάδι απεικονίζεται το Negative control, είναι καθαρό και επιβεβαιώνει πως δεν υπήρξε επιμόλυνση. Για την ενίσχυση των 3 μυκήτων χρησιμοποιήθηκαν 3μl DNA-template. Το μέγεθος του τμήματος που ενισχύθηκε με τους εκκινητές ITS1-ITS4 είναι περίπου 550 bp στον F5 και περίπου 500 bp στους F7 και F13. Στην εικόνα 9β, ομοίως, στο 1^ο πηγάδι απεικονίζεται ο μάρτυρας, στο 2^ο το ενισχυμένο τμήμα DNA με τους εκκινητές ITS1-ITS4 του μύκητα F12 στα 550 bp και 3^ο πηγάδι το Negative control.



Εικόνα 10: Στο πήκτωμα απεικονίζεται στο 1^ο πηγάδι ο μάρτυρας 2-Log DNA Ladder της BioLabs (0.1 – 10.0 kb), στο 2^ο, το ενισχυμένο με τους εκκινητές ITS1-

F –NLB4, τμήμα DNA του μύκητα F17. Στο 3^ο πηγάδι ο μάρτυρας και στο 4^ο το ενισχυμένο με τους εκκινητές ITS1-F –NLB4, τμήμα DNA του μύκητα F15. Για την ενίσχυση των 2 μυκήτων χρησιμοποιήθηκαν 6μl και 4 μl DNA-template αντίστοιχα. Το μέγεθος του τμήματος που ενισχύθηκε με τους εκκινητές ITS1-F –NLB4 είναι περίπου 700-750 bp.

Τα προϊόντα της PCR καθαρίζονται με το κιτ της MACHEREY-NAGEL “NucleoSpin Extract II”(εικόνα 11).



Εικόνα 11: Τα καθαρισμένα προϊόντα PCR των μυκήτων F12, F11, F4, F16, F14, F1, F3, F9, F10, F6.

4.3 Ανάλυση των αλληλουχιών

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο «Υλικά και Μέθοδοι» τα καθαρισμένα προϊόντα της PCR αλληλουχήθηκαν από το τμήμα Ιστολογίας – Ιστοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Οι αλληλουχίες των 17 μυκήτων αναφέρονται στο Παράρτημα.

Η ανάλυση τους με σκοπό την ταυτοποίηση των μυκήτων έγινε με το εργαλείο βιοπληροφορικής, το BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Τα αποτελέσματα για κάθε μύκητα είναι τα εξής:

F1 (533 βάσεις)

Accession	Description	Max score	Query coverage	E value	Max identity
FJ647577.1	Penicillium sp. SC10	979	100%	0.0	99.8% στις 533 βάσεις
HQ637355.1	Penicillium sp. JZ-63	977	99%	0.0	100% στις 529 βάσεις
JF704118.1	Penicillium sp. HLS2-6	976	99%	0.0	99.8% στις 532 βάσεις
HQ262518.1	Penicillium crustosum strain Y19-08	976	99%	0.0	99.8% στις 531 βάσεις

Penicillium sp. SC10

Ανήκει στους ασκομύκητες. Απομονώθηκε από τους Wei,R.B. and Song,R. Αναφέρεται στο άρθρο τους “Study of two similar strains of marine sponge-associated fungi: differences in secondary metabolites and their bioactivities”.

F2 (526 βάσεις)

Accession	Description	Max Score	Query coverage	E value	Max identity
FJ820627.1	Uncultured fungus clone S139	846	100%	0	96% στις 528 βάσεις
AM269811.1	Stereum rugosum isolate 388020	841	99%	0	96% στις 525 βάσεις
FN539050.1	Stereum rugosum isolate st79	839	100%	0	95.8% στις 528 βάσεις

Uncultured fungus clone S139

Απομονώθηκε από δείγμα αέρα στη Γερμανία. Αναφέρεται στην ερευνητική εργασία των Frohlich-Nowoisky, *et al.*, με θέμα “High diversity of fungi in air particulate matter”. Δημοσιεύτηκε το 2009 στο περιοδικό Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106 (31), 12814-12819 (2009) και στο PUBMED [19617562](#).

F3 (508 βάσεις)

Accession	Description	Max score	Query coverage	E value	Max identity
JF449874.1	Uncultured Lewia clone SW_2w_D09	939	100%	0.0	100% στις 508 βάσεις
GU584953.1	Lewia infectoria strain I458	939	100%	0.0	100% στις 508 βάσεις

GQ999401.1	Uncultured fungus clone LX042233-122-012-C03	939	100%	0.0	100% στις 508 βάσεις
FN539059.1	Uncultured Lewia, isolate oak3	939	100%	0.0	100% στις 508 βάσεις

Lewia infectoria strain I458

Ασκομύκητας που αποτελεί αναμορφή του μύκητα *Alternaria infectoria*. Απομονώθηκε από αμπέλι από τους Trenkwalder, S *et al.* Αναφέρεται στο άρθρο τους με τίτλο: “Endophytic fungi and bacteria in shoots of healthy and esca diseased grapevines”

F4 (518 βάσεις)

Accession	Description	Max score	Query coverage	E value	Max identity
JF497145.1	Uncultured fungus clone ABP_42	950	100%	0.0	99.8% στις 518 βάσεις
JN572058.1	Penicillium sp. SB10552a	950	100%	0.0	99.8% στις 518 βάσεις
JF907010.1	Penicillium chrysogenum strain QML-2	950	100%	0.0	99.8% στις 518 βάσεις
JN206678.1	Penicillium citrinum strain PTC07	950	100%	0.0	99.8% στις 518 βάσεις

Penicillium citrinum strain PTC07

Είναι ασκομύκητας που αναγνωρίστηκε από τους Priadharsini, K. *et al.* Στην εργασία τους με θέμα “Molecular characterization of *Penicillium* species”

F5 (529 βάσεις)

Accession	Description	Max score	Query coverage	E value	Max identity
EF505595.1	Uncultured endophytic fungus clone 38-7-30	904	100%	0.0	98% στις 530 βάσεις
AJ496632.1	Phaeosphaeria pontiformis strain CBS 589.86	883	98%	0.0	97.3% στις 522 βάσεις
FJ911873.1	Phaeosphaeria herpotrichoides isolate UFMGCB 2623	874	100%	0.0	96.7% στις 529 βάσεις
EF505571.1	Uncultured endophytic fungus clone 33-15-32	874	98%	0.0	97.1% στις 520 βάσεις

Uncultured endophytic fungus clone 38-7-30

Απομονώθηκε από φύλλα και ρίζες του φυτού *Zea mays*. Αναγνωρίστηκε από τους Pan,J.J., Baumgarten,A.M. and May,G. στην ερευνητική τους εργασία “Effects of host plant environment and Ustilago maydis infection on the fungal endophyte community of maize (*Zea mays*)” (*New Phytol.* 178 (1), 147-156 (2008) και PUBMED [18194146](#))

F6 (537 βάσεις)

Accession	Description	Max score	Query coverage	E value	Max identity
GQ999287.1	Uncultured fungus clone LX042400-122-057-E11	992	100%	0.0	100% στις 537 βάσεις
GU327501.1	Uncultured Peniophora clone G18p5	987	100%	0.0	99.8% στις 537 βάσεις
HM136652.1	Uncultured Peniophora clone MP39	981	100%	0.0	99.6% στις 537 βάσεις

Uncultured fungus clone LX042400-122-057-E11

Απομονώθηκε από δείγμα αέρα στην ερευνητική εργασία “Global atmospheric diversity of fungi: Asco- and Basidiomycota in continental and marine air” των Frohlich-Nowoisky,J., Despres,V.R. and Poschl,U.

F7 (474 βάσεις)

Accession	Description	Max score	Query coverage	E value	Max identity
JN689349.1	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	876	100%	0.0	100% στις 474 βάσεις
JN689342.1	<i>Epicoccum nigrum</i>	859	100%	0.0	100% στις 474 βάσεις
JN662418.1	<i>Epicoccum</i> sp. UASWS0806	859	100%	0.0	100% στις 474 βάσεις
JN031014.1	<i>Epicoccum</i> sp. XAE_132	859	100%	0.0	100% στις 474 βάσεις

Syncephalastrum racemosum

Βρέθηκε στον Καναδά στο φυτό *Panicum virgatum* από τον Francois Gagne-Bourque, μελετώντας τα ενδόφυτα του φυτού. “The characterization and distribution of endophyte of *Panicum virgatum*” Gagne Bourque,F. and Jabaji,S.

F8 (487 βάσεις)

Accession	Description	Max score	Query coverage	E value	Max identity
HQ696055.1	Cladosporium sp. zzz1737	900	100%	0.0	100% στις 487 βάσεις
JN689952.1	Cladosporium tenuissimum strain R201	900	100%	0.0	100% στις 487 βάσεις
JN207316.1	Cladosporium sp. P31E1	900	100%	0.0	100% στις 487 βάσεις

Cladosporium tenuissimum strain R201

Ασκομύκητας που βρέθηκε στη Λιθουανίας σε τραυματισμένο δέντρο *silver birch*. Αναγνωρίστηκε από τους Bakys,R., Vasaitis,R. and Vasiliauskas,A. κατά την εργασία τους “Isolation and identification of fungal endophytes in wounded silver birch”.

F9 (473 βάσεις)

Accession	Description	Max score	Query coverage	E value	Max identity
GU054202.1	Uncultured fungus clone L042885-122-065-F08	874	100%	0.0	100% στις 473 βάσεις
FJ820753.1	Uncultured fungus clone S266	874	100%	0.0	100% στις 473 βάσεις
GU248333.1	Davidiella tassiana isolate OS5	870	100%	0.0	99.7% στις 473 βάσεις

Uncultured fungus clone L042885-122-065-F08

Απομονώθηκε από δείγμα αέρα στην ερευνητική εργασία “Global atmospheric diversity of fungi: Asco- and Basidiomycota in continental and marine air” των Frohlich-Nowoisky,J., Despres,V.R. and Poschl,U.

F10 (501 βάσεις)

Accession	Description	Max score	Query coverage	E value	Max identity
JN032681.1	Penicillium chrysogenum strain LC1	926	100%	0.0	100% στις 501 βάσεις
JF440603.1	Penicillium chrysogenum	926	100%	0.0	100% στις 501 βάσεις
HQ262509.1	Penicillium chrysogenum strain T16	926	100%	0.0	100% στις 501 βάσεις
HQ232418.1	Penicillium chrysogenum strain MF10	926	100%	0.0	100% στις 501 βάσεις

HQ717405.1	Penicillium sp. LH-CAF6	926	100%	0.0	100% στις 501 βάσεις
----------------------------	-------------------------	-----	------	-----	----------------------

Penicillium chrysogenum strain LCI

Πρόκειται για ασκομύκητα που αναγνωρίστηκε από τους Han,J. and Tian,L. στην εργασία τους με τίτλο “ Capability of Polychlorinated Biophenyl (PCBs) Degrading Fungi Separated from Sediments”

F11 (493 βάσεις)

Accession	Description	Max score	Query coverage	E value	Max identity
JN226938.1	Penicillium sp. PX-2011b isolate Z8M-50	911	100%	0.0	100% στις 493 βάσεις
JN226936.1	Penicillium sp. PX-2011b isolate Z8M-45	911	100%	0.0	100% στις 493 βάσεις
JN226933.1	Penicillium sp. PX-2011b isolate Z8M-18	911	100%	0.0	100% στις 493 βάσεις
JN226921.1	Penicillium chrysogenum isolate J8M-4	911	100%	0.0	100% στις 493 βάσεις

F12 (511 βάσεις)

Accession	Description	Max score	Query coverage	E value	Max identity
JN986785.1	Penicillium chrysogenum strain DHMJ33	939	100%	0.0	99.8% στις 511 βάσεις
JN986783.1	Penicillium chrysogenum strain DHMJ31	939	100%	0.0	99.8% στις 511 βάσεις
JN561259.1	Penicillium chrysogenum isolate F4-02	939	100%	0.0	99.8% στις 511 βάσεις

Penicillium chrysogenum strain DHMJ33

Απομονώθηκε από τοιχογραφίες σε μελέτη των Zhang,B.L., Tang,D.P. and Xue,L.G. για την προστασία αυτών από την ανάπτυξη μούχλας. “Preventive Control of Mould Disease in Dunhuang Murals”

F13 (486 βάσεις)

Accession	Description	Max score	Query coverage	E value	Max identity
HQ696055.1	Cladosporium sp. zzz1737	898	100%	0.0	100% στις 486 βάσεις
JN689952.1	Cladosporium	898	100%	0.0	100%

	tenuissimum strain R201				στις 486 βάσεις
JN207316.1	Cladosporium sp. P31E1	898	100%	0.0	100% στις 486 βάσεις
JN227062.1	Cladosporium sp. CX-2011a isolate J8M-16	898	100%	0.0	100% στις 486 βάσεις

Cladosporium sp. zzz1737

Πρόκειται για ασκομύκητα που απομονώθηκε από την πόλη Guangxi της Κίνας. Βρέθηκε στο φυτό Moso bamboo από τους Cheng, Y.-L., Gao, J. and Hou, C.-L. στην εργασία τους “Molecular Diversity of Fungal Isolates from Moso Bamboo Seeds”.

F14 (484 βάσεις)

Accession	Description	Max score	Query coverage	E value	Max identity
JF497145.1	Uncultured fungus clone ABP_42	894	100%	0.0	100% στις 484 βάσεις
JN572058.1	Penicillium sp. SB10552a	894	100%	0.0	100% στις 484 βάσεις
JF907010.1	Penicillium chrysogenum strain QML-2	894	100%	0.0	100% στις 484 βάσεις
JN206678.1	Penicillium citrinum strain PTC07	894	100%	0.0	100% στις 484 βάσεις

Σημείωση: Για τους F4 και F14 από την ανάλυση με το BLAST δόθηκαν τα ίδια αποτελέσματα. Το χρώμα τους είναι άσπρο – πράσινο ενώ διαφέρουν ως προς το σχήμα. Ο F4 έχει ακανόνιστο σχήμα και F14 είναι κυκλικός.

F15 (658 βάσεις)

Accession	Description	Max Score	Query coverage	E value	Max identity
GU183130	Alternaria malorum strain NRRL 29097	1027	95%	0	96.2% στις 634 βάσεις
AY251081.2	Cladosporium malorum strain STE-U 4571	1027	95%	0	96.2% στις 634 βάσεις
AY251080.2	Alternaria malorum var. polymorpha strain STE-U 4570	1027	95%	0	96.2% στις 634 βάσεις

Alternaria malorum strain NRRL 29097

Αναγνωρίστηκε από τους Holler, U., Gloer, J.B. and Wicklow, D.T. στην εργασία τους με θέμα “Biologically active polyketide metabolites from an undetermined

fungicolous hyphomycete resembling *Cladosporium*” (J. Nat. Prod. 65 (6), 876-882 (2002) και PUBMED [12088431](#))

F16 (503 βάσεις)

Accession	Description	Max score	Query coverage	E value	Max identity
EF123253.1	<i>Talaromyces flavus</i>	937	100%	0.0	99.8% στις 510 βάσεις
HQ668177.1	<i>Penicillium</i> sp. C1 HC-2011	931	100%	0.0	99.6% στις 511 βάσεις
HQ392503.1	<i>Penicillium pinophilum</i> strain TP80	931	100%	0.0	99.6% στις 511 βάσεις
HQ392502.1	<i>Penicillium pinophilum</i> strain TP78	931	100%	0.0	99.6% στις 511 βάσεις

Talaromyces flavus

Αναγνωρίστηκε από τους Dai,C.-C., Yu,B.-Y. and Tao,J. στην εργασία “The screening of endophytic fungi from *Euphorbia pekinensis* and the mechanism of promoting host growth”

F17 (719 βάσεις)

Accession	Description	Max Score	Query coverage	E value	Max identity
AB158314.1	<i>Trametes ochracea</i>	1317	100%	0	99.7%
AF139961.2	<i>Trametes versicolor</i> strain T-868	1306	100%	0	99.4%
FJ820656.1	Uncultured fungus clone S168	1264	96%	0	99.6 %

Trametes ochracea

Ο μύκητας αναγνωρίστηκε από τους Vasilenko,O.V., Koroleva,O.V. and Psurtseva,N. στην εργασία τους με θέμα “ The molecular phylogenetical placement of the basidial mycelium cultures producing high red-ox potential laccase” και τους Vasilenko,O.V. *et al.*, στην εργασία “ Genetics of lygnolytic fungi producers of high redox potential laccases. Phylogenetic placement of four lygnolytic Basidiomycetes producers of high redox potential laccases”.

Χαρακτηριστικά των μυκήτων F1-F17

Το γένος *Penicillium* περιλαμβάνει μία ομάδα ειδών τεράστιας σημασίας για το ανθρώπινο περιβάλλον. Μερικά είδη είναι γνωστοί παράγοντες αλλοίωσης των τροφών, ενώ άλλα εντοπίζονται σε διάφορα οργανικά υποστρώματα. Μια μεγάλη ποικιλία ειδών αναπτύσσονται σε εσωτερικές επιφάνειες όπως σε ξύλο, σε ζωγραφισμένες επιφάνειες, σε γυψοσανίδες, ταπετσαρίες κλπ. Οι Das et al. (1997) απέδειξαν ότι όλα τα είδη χαρτιού (χαρτί εκτύπωσης, περιτυλίγματος, χαρτόνια, εφημερίδες) είναι ευπρόσβλητα από μύκητες. Οι μύκητες που εντόπισαν σε μεγαλύτερη αφθονία ήταν γένους *Penicillium* και παρουσίαζαν υψηλή ενεργότητα κυτταρινάσης. Την ίδια χρονιά (Fabbri, 1997) απομονώθηκαν από κηλίδες foxing 4 γένη μυκήτων: *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium* και *Penicillium*. Το γένος *Penicillium* απομονώθηκε από κηλίδες αλλοιωμένων τοπογραφικών χαρτών του 18^{ου} αιώνα με κλασικές μεθόδους καλλιέργειας (Zotti et al., 2008) και με μοριακές τεχνικές (ενίσχυση ITS περιοχών) από χαρτί παλιού βιβλίου. (Rakotonirainy et al., 2007) Επίσης, αποτελεί ένα από τα γένη που αναγνωρίστηκαν κατά τη μελέτη βιοαλλοίωσης του Leonardo Da Vinci's Atlantic Codex. (Principi et al., 2011). Αξίζει να σημειωθεί πως ο κυτταρινολυτικός μύκητας *Penicillium sp.* απομονώθηκε από ιταλικό χειρόγραφο του 13^{ου} αιώνα. (Michaelsen et al., 2010) Το ίδιο γένος εντοπίστηκε και στη σκόνη του χώρου φύλαξης του χειρόγραφου.

Ο ασκομύκητας *Penicillium citrinum* απομονώθηκε από αρχεία και χάρτες (κυτταρίνη) της Ινδονησίας. (Gandjar et al., 1989) Οι M. da Silva et al., κατά τη μελέτη τους για την αντιμετώπιση μυκήτων σε βιοαλλοιωμένο χαρτί με ακτινοβολία απομόνωσαν από βιβλία και χειρόγραφα της Κρατικής βιβλιοθήκης της Βραζιλίας μεταξύ άλλων μυκήτων τους *Penicillium sp.* από τα βιβλία και *Penicillium citrinum* από τα βιβλία και τα χειρόγραφα. (M. da Silva et al., 2006) Η παρουσία του μύκητα παρατηρήθηκε σε καφέ κηλίδες στις σελίδες ενός βιβλίου του 19^{ου} αιώνα. (Rakotonirainy et al., 2007) Εκκρίνει μία μυκοτοξίνη, την κιτρίνη και ένζυμα όπως ενδογλυκανάσες που διασπούν την κυτταρίνη και ενδο-1,4-β-ξυλανάση. (Dutta et al., 2008)

Ο ζυγομύκητας *Syncephalastrum racemosum* απομονώθηκε από αρχειακό υλικό της Ινδονησίας. (Gandjar et al., 1989) Παράγει ενδογλυκανάση, ένα κύριο κυτταρινολυτικό ένζυμο το οποίο υδρολύει τυχαία ενδομοριακούς β-1,4-γλυκοσιδικούς δεσμούς των αλυσίδων κυτταρίνης για την παραγωγή νέων άκρων της αλυσίδας. (Wonganu et al., 2008)

Οι μύκητες του γένους ***Cladosporium*** είναι κοινοί στο περιβάλλον. Συχνά εντοπίζονται σε αποικοδομημένο φυτικό υλικό. Εκκρίνουν σκούρα χρωστική και παράγουν καφέ σπόρους. Δημιουργούν αποικίες στο χώμα, σε εσωτερικά υποστρώματα (Ho 1999), σε βαμμένους τοίχους και σε μία ποικιλία υλικών από κυτταρίνη και είναι στενά συνδεδεμένη με την αποικοδόμηση τόσο της κυτταρίνης όσο και του χαρτιού, λόγω της παραγωγής κυτταρινασών όπως εξωγλυκανασών. (Ghahfarokhi *et al.*, 2004 ; Michaelsen *et al.*, 2006; 2009) Μύκητες του γένους *Cladosporium* απομονώθηκαν από ιταλικό χειρόγραφο του 13^{ου} αιώνα (Michaelsen *et al.*, 2010) και από κηλίδες foxing. (Fabbri, 1997) Στο Olabisi Onabanjo University, χρησιμοποιώντας κλασικές μεθόδους καλλιέργειας, απομόνωσαν από βιοαλλοιωμένα βιβλία της βιβλιοθήκης γένη *Penicillium* και *Cladosporium*. (Bankole and Abioye, 2005) Σε αντίστοιχη έρευνα στο Πανεπιστήμιο της Coimbra απομονώθηκαν από ιστορικά χειρόγραφα μύκητες του γένους *Cladosporium*. (Mesquita *et al.* 2009)

Ο βασιδιομύκητας ***Trametes ochracea*** όπως και οι περισσότεροι μύκητες του γένους *Trametes* αποικοδομούν το ξύλο και παράγουν ένζυμα που αποικοδομούν τη λιγνίνη όπως η laccase II που είναι μονομερής γλυκοπρωτεΐνη και την απομακρύνουν από την κυτταρίνη. (Morozova *et al.*, 2007) Ο ρόλος των λακκασών και ο τρόπος δράσης τους δεν είναι πλήρως κατανοητός. Οι λακκάσες είναι άφθονες στη φύση και δρουν συνεργιστικά με εξωκυττάρια οξειδάσες για την αποικοδόμηση πολύπλοκων φυσικών πολυμερών όπως η λιγνίνη. (Thurston, 1994) Επιπλέον, οι λακκάσες είναι πιθανό ότι συμμετέχουν στη σύνθεση σκουρόχρωμων χρωστικών που παράγουν οι οργανισμοί ως απόκριση στο περιβαλλοντικό στρες ή στη μορφογένεση των μυκήτων καταλύοντας το σχηματισμό εξωκυτταρικών χρωστικών. (Ikegaya *et al.*, 1993) Ο βασιδιομύκητας ***Trametes ochracea*** απομονώθηκε από την περιοχή Priezorsk του Leningrad στη Ρωσία από σημύδα (*Betula sp.*) Πρόκειται για ιστορικής σημασίας δέντρο για τους λαούς της βόρειας Σιβηρίας. Σύμφωνα με τις τοπικές παραδόσεις, μία αρσενική και μία θηλυκή σημύδα εμφανίστηκαν στην απαρχή του ανθρωπίνου γένους. (Vasilensko *et al.*, 2003)

Ο ασκομύκητας ***Talaromyces flavus*** είναι ένας ευρύτατα διαδεδομένος στις εύκρατες περιοχές του κόσμου (Fravel & Adams 1986). Η αναμορφή του ***Penicillium dangeardii*** Pitt (συνώνυμο *P. vermiculatum* Dang) έχει αναγνωριστεί ως wood-rot (Kogan *et al.*, 2002) με κυτταρινολυτική δράση. Ο *Talaromyces flavus*

παράγει ένα ένζυμο την οξειδάση της γλυκόζης (b-D-glucose: oxygen 1-oxidoreductase) που καταλύει την οξείδωση της γλυκόζης σε γλυκονικό και υπεροξειδίου του υδρογόνου παρουσία μοριακού οξυγόνου. Είναι ανταγωνιστής άλλων μυκήτων (όπως του *V. Dahliae*) και αυτή η δράση του είναι πιθανό να οφείλεται στην παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου. (Murray *et al.*, 1997) Τα ένζυμα που εκκρίνει ο ασκομύκητας, όπως β-1,3-, β-1,4-, β-1,6- γλυκανάσες, κυτταρινάση και χιτινάσες ευνοούν τη δράση του ως ανταγωνιστής. (Madi *et al.*, 1997; Inglis & Kawchuk, 2002).

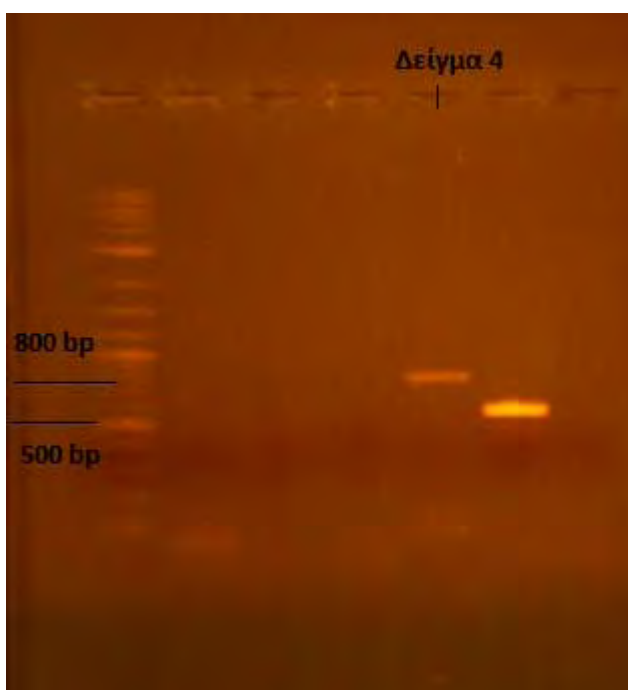
Ο μύκητας *Cladosporium malorum* ανακαλύφθηκε στην πολιτεία της Ουάσιγκτον. Για πρώτη φορά περιγράφηκε σε αποθηκευμένα μήλα το 1930. Στα χρόνια που ακολούθησαν ο μύκητας εντοπίστηκε σε πολλούς διαφορετικούς ξενιστές συμπεριλαμβανομένου σπόρους φυτών αγρονομική σημασίας και σε ξυλώδεις ρίζες κωνοφόρων. Το σύγχρονο όνομα του μύκητα είναι *Alternaria malorum*, (Ruehle U. Braun, Crous & Dugan, in Braun, Crous, Dugan & de Hoog, *Mycol. Progr.* 2(1): 5 (2003)) εξαιτίας των μοριακών, γενετικών και μεταβολικών συγγενειών και των κύριων μικροσκοπικών χαρακτηριστικών. (Goetz and Dugan, 2006) Από το 2009 ο μύκητας ονομάζεται *Chalastospora gossypii* (Jacz. U. Braun & Crous, *Persoonia* 22: 144). Ο μύκητας παρουσιάζει κυτταρινολυτική δράση όπως αποδείχτηκε και από την εργασία “In vitro degradation of the moss *Hylocomium splendens* by three pleosporalean fungi” των Day and Currah. (2011) Απομόνωσαν 3 είδη της οικογένειας *Pleosporaceae*: *Curvularia inaequalis*, *Ulocladium atrum* και *Chalastospora gossypii* και μελέτησαν το ρόλο τους στην αποικοδόμηση γαμετόφυτων βρύων. Και τα 3 είδη μυκήτων προκάλεσαν απώλεια της μάζας των γαμετόφυτων βρύων. Πραγματοποιήθηκαν *in vitro* ενζυμικά πειράματα που έδειξαν ότι και οι 3 μύκητες αποικοδόμησαν την κυτταρίνη, αλλά όχι αδιάλυτες πολυφαινόλες. Το υλικό εξετάστηκε με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης και παρατηρήθηκε σε κάποιο βαθμό διάβρωση του εξωτερικού στρώματος του κυτταρικού τοιχώματος των φύλλων. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε το ίδιο για το εσωτερικό στρώμα που περιέχει ενώσεις λιγνίνης.

Ο ασκομύκητας *Lewia infectoria* αποτελεί τελομορφή του μύκητα *Alternaria infectoria*. Έχει απομονωθεί από ξύλο οξιάς και πεύκου το οποίο τροποποιήθηκε χημικά κατά την πειραματική μελέτη των Pfeffer *et al.* (2012) και από άρρωστες φυτείες λυκίσκου (*Humulus lupulus*). (Phalip *et al.*, 2006) Τη χρονική περίοδο 1999-2000 σε μελέτη για τη βιοαλλοίωση των αντικειμένων του

μουσείου Baroda ο ασκομύκητας αναγνωρίστηκε σε δείγματα από τον αέρα του εσωτερικού χώρου και από σκόνη ξύλινης κατασκευής όπου φυλασσόταν μούμια (~230 π.Χ.). (Aryal *et al.*, 2001) Ο *Lewia infectoria* ανήκει στα είδη που ευθύνονται για την καταστροφή κατασκευών από ξύλο κέδρου στο Μαρόκο. (El Bergadi Fatimazahra *et al.*, 2011) Τα Sbaiyine και Sehrij είναι δύο από τα ιεροδιδασκαλεία (“Mersedas”) ανάμεσα στα πολλά ιστορικά κτήρια της παλιάς πόλης της Fez. Το ξύλο σε αυτές τις κατασκευές παρουσιάζει μεγάλο βαθμό αλλοίωσης από μικροοργανισμούς. Είκοσι είδη μυκήτων απομονώθηκαν και ελέγχθηκαν για την ικανότητα τους να παράγουν ένζυμα που διασπών την κυτταρίνη και τη λιγνίνη. Μεταξύ των ειδών, 12 παράγαγαν κυτταρινάσες *Aspergillus niger*, *Penicillium italicum*, *Penicillium griseoroseum* και *Lewia infectoria*, ενώ μόνο 3 λιγνινάσες. Ο *Aspergillus niger* παρουσίασε την υψηλότερη ενζυμική ενεργότητα.

4.4 Απομόνωση DNA απευθείας από το χαρτί

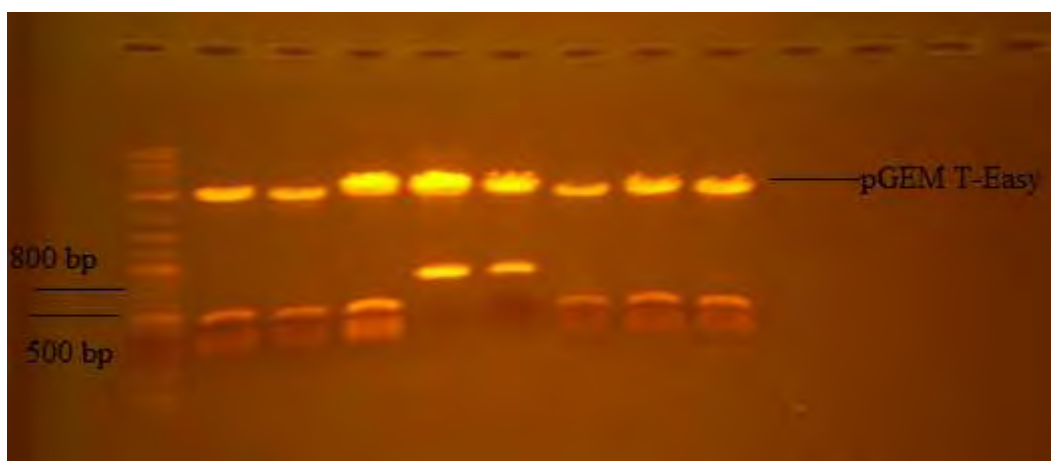
Κομμάτια των χειρόγραφων Δείγμα 1, 2 και 4 χρησιμοποιήθηκαν για άμεση απομόνωση DNA όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο «Υλικά και Μέθοδοι». Τα τμήματα DNA που απομονώθηκαν ενισχύθηκαν με PCR με τα ζεύγη εκκινητών ITS1-F – NLB4 (δείγμα 1, 4) και ITS1-F – ITS4 (δείγμα 2) οι οποίοι στοχεύουν στις ITS περιοχές. Το αποτέλεσμα της ενίσχυσης ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης. Ενδεικτικά, παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της ενίσχυσης του τμήματος DNA που απομονώθηκε από το χειρόγραφο Δείγμα 4 (εικόνα 12).



Εικόνα 12: Στο πήκτωμα απεικονίζεται στο 1^ο πηγάδι ο μάρτυρας 2-Log DNA Ladder της BioLabs (0.1 – 10.0 kb), στο 5^ο, το ενισχυμένο με τους εκκινητές ITS1-F –NLB4, τμήμα DNA που απομονώθηκε απευθείας από το χειρόγραφο Δείγμα 4. Στο 6^ο πηγάδι ο θετικός μάρτυρας (F15) και στο 7^ο ο αρνητικός μάρτυρας (δεν υπήρξε επιμόλυνση). Για την ενίσχυση του DNA χρησιμοποιήθηκαν 6μl DNA-template. Το μέγεθος του τμήματος που ενισχύθηκε με τους εκκινητές ITS1-F – NLB4 είναι περίπου 750 bp.

4.5 Δημιουργία βιβλιοθήκης

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο «Υλικά και Μέθοδοι» δημιουργήθηκε βιβλιοθήκη με τις περιοχές ITS των μυκήτων. Ακολουθήθηκε συγκεκριμένο πρωτόκολλο για την κλωνοποίηση και ελέγχθηκε με Colony PCR και πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI (εικόνα 13), αν οι λευκές αποικίες που συλλέχτηκαν περιείχαν όντως το ένθεμα.



Εικόνα 13: Στο πήκτωμα παρατηρούνται τα αποτελέσματα της πέψης με EcoRI πλασμιδιακού DNA από 8 λευκές αποικίες. Ο φορέας pGEM T-Easy εντοπίζεται περίπου στις 3000bp. Το άθροισμα του αριθμού βάσεων των μπαντών που προκύπτουν από την πέψη ισούται με το μέγεθος του τμήματος DNA που ενισχύθηκε ~750bp.

Το πλασμιδιακό DNA απομονώθηκε και στάλθηκε για αλληλούχιση. Οι αλληλουχίες των κλώνων (βλ. παράρτημα) αναλύθηκαν και με τη βοήθεια του εργαλείου BLAST αναγνωρίστηκε σε ποιους μύκητες αντιστοιχούν οι κλώνοι.

4.6 Χειρόγραφο Δείγμα 1

Αναλύοντας τις αλληλουχίες των κλώνων με τη βοήθεια του BLAST διαπιστώθηκε πως σε σύνολο 44 κλώνων οι 43 αντιστοιχούν στον ασκομύκητα *Alternaria sp.* και 1 στον ασκομύκητα *Penicillium chrysogenum*.

Οι μύκητες του γένους *Alternaria* εντοπίζονται στην επιφάνεια των φύλλων των φυτικών οργανισμών, τα οποία και αποικοδομούν, καθώς και σε εξωτερικά περιβάλλοντα αλλά είναι δυνατό να αποικίσουν και σε εσωτερικά υποστρώματα αν οι συνθήκες είναι κατάλληλες. Απομονώθηκαν από ιστορικά χειρόγραφα του

Πανεπιστημίου της Coimbra, στην Πορτογαλία και του μουσείου Astan Quds στο Ιράν, από ιταλικά χειρόγραφα του 13^{ου} αιώνα. (Shamsian *et al.*, 2006; Mesquita *et al.*, 2009; Michaelsen *et al.*, 2010) Μύκητες του γένους *Alternaria* εντοπίστηκαν και σε κηλίδες foxing. (Fabbri, 1997)

Ο μύκητας *Alternaria alternata* είναι το πιο κοινό είδος εσωτερικού χώρου. Έχει την ικανότητα να αποικοδομεί την κυτταρίνη και συχνά εντοπίζεται σε ξύλο και σε διάφορους τύπους χαρτιού. Ο συγκεκριμένος κυτταρινολυτικός μύκητας αποτελεί ένα από τα είδη που αναγνωρίστηκαν κατά τη μελέτη βιοαλλοίωσης του Leonardo Da Vinci's Atlantic Codex. (Principi *et al.*, 2011) Ο μύκητας *Alternaria alternata* παράγει ενδογλυκανάση. (Eshel *et al.*, 2000) Οι ενδογλυκανάσες υδρολύουν τυχαία ενδομοριακούς β-1,4-γλυκοσιδικούς δεσμούς των αλυσίδων κυτταρίνης για να παράγουν νέα άκρα της αλυσίδας. Από τον ίδιο μύκητα παράγονται και ενδοξυλανάσες οι οποίες δρουν συνεργιστικά με τις κυτταρινάσες. Απομακρύνουν μη κυτταρινικούς πολυσακχαρίτες από την ημικυτταρίνη, διευκολύνοντας την πρόσβαση των κυτταρινασών στην κυτταρίνη. (Berlin *et al.*, 2005; 2007) Σε μελέτη των Das *et al.* (1997) διατυπώθηκε η άποψη πως η ενεργότητα της ενδογλυκανάσης του *Alternaria alternata* είναι χαμηλότερη από αυτή των μυκήτων του γένους *Penicillium* και *Aspergillus*.

Η κυτταρινολυτική δράση του ασκομύκητα *Penicillium chrysogenum* μελετήθηκε πριν από αρκετές δεκαετίες. (Singh and Saksena, 1981) Οι μύκητες του γένους *Penicillium* έχουν μελετηθεί για τα κυτταρινολυτικά τους ένζυμα και την ικανότητα τους να αποικοδομούν το ξύλο και τα παράγωγα του. Παράγει κυτταρινάσες: εξωγλυκανάσες (ή cellobiohydrolases) και ενδοξυλανάσες. Οι εξωγλυκανάσες κόβουν τις αλυσίδες της κυτταρίνης στα άκρα για να απελευθερώσουν διαλυτή cellobiose ή γλυκόζη. Ο μύκητας *Penicillium chrysogenum* είναι ένας από τους κύριους παράγοντες βιοαλλοίωσης σε γνωστά βιβλία. (Magaudda *et al.*, 2004 ; Sterflinger, 2010) Απομονώθηκε από ιταλικό χειρόγραφο του 13^{ου} αιώνα. (Michaelsen *et al.*, 2010)

Accession	Description	E value	Max identity
JQ247340.1	Uncultured <i>Alternaria</i> clone FDBC9	0.0	99.9% στις 728 βάσεις

GQ121322.2	Alternaria alternata isolate IEIHBT	0.0	99.9% στις 728 βάσεις
HQ674662.1	Alternaria sp. RGT-S52	0.0	99.9% στις 728 βάσεις

Accession	Description	E value	Max identity
GQ121322.2	Alternaria alternata isolate IEIHBT	0.0	99.8% στις 734 βάσεις
GU797144.1	Alternaria alternata strain SS-L6	0.0	99.8% στις 734 βάσεις
GU797138.1	Alternaria alternata strain SS-S4	0.0	99.8% στις 734 βάσεις

Accession	Description	E value	Max identity
JF449889.1	Uncultured Alternaria clone SW_2w_H04	0.0	99.4% στις 715 βάσεις
JF449866.1	Uncultured Alternaria clone SW_2w_C10	0.0	99.4% στις 715 βάσεις
JF449811.1	Uncultured Alternaria clone SW_2d_E01	0.0	99.4% στις 715 βάσεις

Accession	Description	E value	Max identity
AF034857.1	Penicillium chrysogenum	0.0	100% στις 729 βάσεις
AF034451.1	Penicillium chrysogenum >gb AF033465.1 Penicillium chrysogenum strain NRRL 807	0.0	100% στις 729 βάσεις
GQ241341.1	Penicillium chrysogenum strain ACBF 003-2	0.0	99.9% στις 729 βάσεις

4. 7 Χειρόγραφο Δείγμα 4

Αναλύοντας τις αλληλουχίες των κλώνων με τη βοήθεια του BLAST διαπιστώθηκε πως σε σύνολο 37 κλώνων οι 35 αντιστοιχούν στο μύκητα *Alternaria alternata*, 1 στο μύκητα *Penicillium chrysogenum* και 1 στο μύκητα *Candida sake*.

Οι Gueguen *et al.* απομόνωσαν από το μύκητα *Candida sake* και ταυτοποίησαν τη β-γλυκοσιδάση, μία κυτταρινάση που παράγεται όταν ο μύκητας

αναπτύσσεται σε cellobiose την οποία χρησιμοποιεί ως πηγή άνθρακα. (Gueguen *et al.*, 2001) Οι β-γλυκοσιδάσες υδρολύουν τη cellobiose σε γλυκόζη. Με αυτό τον τρόπο η γλυκόζη απελευθερώνεται από τα ινίδια της κυτταρίνης και μπορεί να απορροφηθεί από τις υφές του μύκητα. (Saloheimo *et al.*, 2002 & Wang *et al.*, 2003)

Μύκητες του γένους *Candida* αναγνωρίστηκαν κατά τη μελέτη βιοαλλοίωσης του Leonardo Da Vinci's Atlantic Codex. (Principi *et al.*, 2011) Αντίθετα, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο χώρο του μουσείου Auschwitz-Birkenau εντοπίστηκαν μύκητες του γένους *Candida* σε aerosols, αλλά όχι στα υπό εξέταση αντικείμενα (έγγραφα, παπούτσια, τσάντες κ.λ.π.). (Niesler *et al.*, 2010)

Accession	Description	E value	Max identity
GQ121322.2	Alternaria alternata isolate IEIHBT	0.0	99.8% στις 743 βάσεις
GU797144.1	Alternaria alternata strain SS-L6	0.0	99.8% στις 743 βάσεις
GU797138.1	Alternaria alternata strain SS-S4	0.0	99.8% στις 743 βάσεις

Accession	Description	E value	Max identity
GQ241341.1	Penicillium chrysogenum strain ACBF 003-2	0.0	99.9% στις 730 βάσεις
AF034450.1	Penicillium chrysogenum	0.0	99.9% στις 730 βάσεις
AF034449.1	Penicillium chrysogenum	0.0	99.9% στις 730 βάσεις
AF034857.1	Penicillium chrysogenum	0.0	99.9% στις 730 βάσεις

Accession	Description	E value	Max identity
AJ549822.1	Candida sake strain CBS 159	0.0	99.7% στις 635 βάσεις
AJ549823.1	Candida sp. K2 strain K2	0.0	98 % στις 604βάσεις

AM160629.1	Candida sp. HA 1671	0.0	98.5 % στις 601 βάσεις
----------------------------	---------------------	-----	------------------------

4. 8 Κάλυψη κλώνων βιβλιοθήκης

Το ποσοστό κάλυψης της βιβλιοθήκης “Good’s C” (Good 1953), υπολογίζεται με βάση τον τύπο:

$$[1-(n_1/N)], \quad (1)$$

όπου n_1 είναι ο αριθμός των OTUs (operational taxonomic unit-λειτουργική ταξινομική μονάδα) που αντιπροσωπεύονται από έναν μόνο κλώνο της βιβλιοθήκης και N είναι ο συνολικός αριθμός των κλώνων που εξετάζονται (42 στην περίπτωση της βιβλιοθήκης μυκήτων) (Chao 1984). Το **OTU** (operational taxonomic unit-λειτουργική ταξινομική μονάδα) είναι μια ομάδα αλληλουχιών που περιέχει αλληλουχίες οι οποίες έχουν μεταξύ τους το ίδιο ποσοστό διαφοράς. Για παράδειγμα, το **OTU 0.03** περιέχει αλληλουχίες που διαφέρουν μεταξύ τους το πολύ κατά 3%. Αυτό σημαίνει πως είναι όμοιες κατά 97%, δηλαδή όμοιες σε επίπεδο γένους.

Ο δείκτης ποικιλότητας Chao1 υπολογίζεται με βάση τον τύπο:

$$S_{\text{Chao1}}=S_{\text{obs}}+n_1(n_1-1)/2(n_2+1), \quad (2)$$

όπου S_{obs} είναι ο αριθμός των παρατηρούμενων OTUs, n_1 ο αριθμός των OTUs που έχουν μόνο μία αλληλουχία και n_2 ο αριθμός των OTUs που έχουν μόνο δύο αλληλουχίες (Chao 1987). Ο υπολογισμός του δείκτη ποικιλότητας Chao1 γίνεται με διάστημα εμπιστοσύνης 95% (confidence interval, CI).

4.8.1. Υπολογισμός κάλυψης της βιβλιοθήκης του χειρόγραφου Δείγμα 1

Στο χειρόγραφο Δείγμα 1 οι 43 κλώνοι της βιβλιοθήκης αντιστοιχούν σε *Alternaria sp.* και 1 κλώνος σε *Penicillium chrysogenum*. Στη συγκεκριμένη βιβλιοθήκη αν χωρίσουμε τις αλληλουχίες με βάση το ποσοστό διαφοράς 3% παίρνουμε 2 **OTUs**. Το ένα περιέχει το μύκητα *Alternaria sp.* και το άλλο *Penicillium chrysogenum*.

Ο *Penicillium chrysogenum* αντιπροσωπεύεται από ένα μόνο κλώνο της βιβλιοθήκης, οπότε το n_1 για τον τύπο (1) είναι $n_1=1$. Άρα το ποσοστό κάλυψης είναι: $\%C=1-1/44=97.7\% \rightarrow \%C=97.7\%$

Ο δείκτης ποικιλότητας Chao1 δείχνει πόσο μεγάλη είναι η ποικιλότητα της βιβλιοθήκης ανάλογα με το **OTU** που χρησιμοποιείται. Για **OTU** =0.03, **S_{obs}** = 2, **n₁** =1 και **n₂**=0 ο δείκτης ποικιλότητας (2) ισούται με **S_{Chao1}**=2. Η τιμή ίση με 2 είναι η χαμηλότερη που μπορεί να πάρει ο δείκτης. Συνεπώς, η ποικιλότητα της βιβλιοθήκης είναι πολύ μικρή.

4.8.2. Υπολογισμός κάλυψης της βιβλιοθήκης του χειρόγραφου Δείγμα 4

Στο χειρόγραφο Δείγμα 4 οι 35 κλώνοι της βιβλιοθήκης αντιστοιχούν σε *Alternaria alternata*, 1 κλώνος σε *Candida sake* και 1 κλώνος σε *Penicillium chrysogenum*. Στη συγκεκριμένη βιβλιοθήκη αν χωρίσουμε τις αλληλουχίες με βάση το ποσοστό διαφοράς 3% παίρνουμε 3 **OTUs**. Το ένα περιέχει το μύκητα *Alternaria sp.*, το δεύτερο *Candida sake* και το τρίτο *Penicillium chrysogenum*.

Οι *Penicillium chrysogenum* και *Candida sake* αντιπροσωπεύονται από ένα μόνο κλώνο της βιβλιοθήκης, οπότε το **n₁** για τον τύπο (1) είναι **n₁**=2. Άρα το ποσοστό κάλυψης είναι: $\%C=1-2/37=94.6\% \rightarrow \%C=94.6\%$

Ο δείκτης ποικιλότητας Chao1 δείχνει πόσο μεγάλη είναι η ποικιλότητα της βιβλιοθήκης ανάλογα με το **OTU** που χρησιμοποιείται. Για **OTU** =0.03, **S_{obs}** =3, **n₁** =2 και **n₂**=0 ο δείκτης ποικιλότητας (2) ισούται με **S_{Chao1}**=3. Συνεπώς, η ποικιλότητα της βιβλιοθήκης είναι πολύ μικρή.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί την πρώτη προσπάθεια για τη μελέτη της ποικιλότητας μυκήτων σε Ελληνικά ιστορικά χειρόγραφα του 19^{ου} και 20^{ου} αιώνα και τη συσχέτιση τους με τη βιοαλλοίωση των χειρογράφων.

Η βιοαλλοίωση ορίζεται ως η διαδικασία μέσω της οποίας «βιολογικοί παράγοντες, δηλαδή ζωντανοί οργανισμοί, είναι η αιτία της μείωσης στην ποιότητα ή στην αξία ενός αντικειμένου». (Rose, 1981) Οι πιο κοινοί ζωντανοί οργανισμοί που ευθύνονται για τη βιοαλλοίωση είναι οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί, τα έντομα όπως τερμίτες, οι μύκητες (soft rots, white and brown rots), τα άλγη, οι λειχήνες και τα βακτήρια. Οι μύκητες θεωρούνται οι κύριοι παράγοντες αλλοίωσης ιστορικών και πολιτιστικών αντικειμένων με πρώτη ύλη το χαρτί, ιδιαίτερα οι κυτταρινολυτικοί μύκητες. (Fabbri *et al.*, 1997) Ο αποικισμός μυκήτων στο χαρτί προκαλεί αλλαγή στην αισθητική του εικόνα είτε λόγω ασθενών οξέων που παράγουν οι μύκητες ή από τη συσσώρευση χρωστικών που δημιουργούν χρωματικούς λεκέδες στο χαρτί, φαινόμενο γνωστό ως “foxing”. (Arai, 2000) Οι μύκητες μπορούν να υδρολύσουν την κυτταρίνη ως αποτέλεσμα της δράσης των αποτελεσματικών λυτικών ενζύμων που παράγουν. (Bennett and Faison, 1997) Οι κυτταρινολυτικοί μύκητες, οι οποίοι χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα την κυτταρίνη, όταν αναπτύσσονται σε ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες μπορούν να καταστρέψουν το χαρτί σε σύντομο χρονικό διάστημα. (Adamo *et al.*, 2003) Η αναγνώριση των μυκήτων που πιθανόν προκαλούν το φαινόμενο της βιοαλλοίωσης είναι το πρώτο και απαραίτητο βήμα για την κατανόηση των επιδράσεων τους στα ιστορικά αντικείμενα. Το δεύτερο βήμα είναι η διασαφήνιση των λειτουργιών αυτών των μυκήτων και ο ρόλος τους στη βιοαλλοίωση.

Για την πραγματοποίηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από 5 χειρόγραφα προερχόμενα από το Γενικό Αρχείο του Κράτους (Αθήνα). Συλλέχτηκαν τμήματα βιοαλλοιωμένου χαρτιού και αποσπάστηκαν από περιοχές με ορατή την αλλοίωση του υλικού, με τη χρήση αποστειρωμένων μπατονέτων, δείγματα για καλλιέργεια σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα με σκοπό την αναγνώριση των μυκήτων.

Η ταυτοποίηση των καλλιεργήσιμων μυκήτων που απομονώθηκαν από το χαρτί πραγματοποιήθηκε με μια σειρά μοριακών πειραματικών διαδικασιών. Οι μοριακές τεχνικές στοχεύουν στις περιοχές ITS οι οποίες βρίσκονται στις

επαναλήψεις του πυρηνικού rDNA και χαρακτηρίζονται από μεγάλη ποικιλότητα μεταξύ ταξινομικά διακριτών ειδών μυκήτων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της αλληλούχισης των καλλιιεργήσιμων μυκήτων σε επίπεδο γένους απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν οι ακόλουθοι μύκητες: *Penicillium sp.* και *Cladosporium sp.*. Σε επίπεδο είδους, 7 διαφορετικά είδη μυκήτων αναγνωρίστηκαν: *Penicillium citrinum*, *Penicillium chrysogenum*, *Syncephalastrum racemosum*, *Trametes ochracea*, *Talaromyces flavus*, *Lewia infectoria*, *Chalastospora gossypii*. Η αλληλουχία 4 μυκήτων αντιστοιχούσε σε *uncultured fungus clone*.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA απευθείας από τα χειρόγραφα Δείγμα 1 και Δείγμα 4 και ενίσχυση του DNA, διαδικασία που επιτρέπει να ανιχνευτούν όχι μόνο οι βιώσιμοι μύκητες που εντοπίζονται αλλά και οι παλαιότερα ενεργοί στους οποίους πιθανόν οφείλεται η βιοαλλοίωση του. Δημιουργήθηκαν για τα δύο χειρόγραφα βιβλιοθήκες οι οποίες περιέχουν τις περιοχές ITS με σκοπό τη λεπτομερή φυλογενετική ταυτοποίηση των μυκήτων.

Για το χειρόγραφο Δείγμα 1 αλληλουχήθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 44 κλώνοι από τους οποίους οι 43 κλώνοι της βιβλιοθήκης αντιστοιχούν σε *Alternaria sp.* και 1 κλώνος σε *Penicillium chrysogenum*. Το ποσοστό κάλυψης της βιβλιοθήκης “Good’s C” (Good 1953), υπολογίζεται σε 97.7%. Η βιβλιοθήκη του χειρόγραφου Δείγμα 1 εμφανίζει πολύ μικρή ποικιλότητα γεγονός που επαληθεύεται από το δείκτη ποικιλότητας $S_{Chao1}=2$. (Chao 1987) Για το χειρόγραφο Δείγμα 4 αλληλουχήθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 37 κλώνοι από τους οποίους οι 35 κλώνοι της βιβλιοθήκης αντιστοιχούν σε *Alternaria alternata*, 1 κλώνος σε *Candida sake* και 1 κλώνος σε *Penicillium chrysogenum*. Το ποσοστό κάλυψης της βιβλιοθήκης “Good’s C”, υπολογίζεται σε 94.6%. Η βιβλιοθήκη του χειρόγραφου Δείγμα 4 εμφανίζει πολύ μικρή ποικιλότητα γεγονός που επαληθεύεται από το δείκτη ποικιλότητας $S_{Chao1}=3$.

Οι περισσότεροι από τους μύκητες που ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά στα συγκεκριμένα Ελληνικά ιστορικά χειρόγραφα, απομονώθηκαν από αντικείμενα με πρώτη ύλη το χαρτί και σε προγενέστερες αντίστοιχες μελέτες. Τα γένη *Penicillium sp.*, *Alternaria sp.* και *Cladosporium sp.* αποτελούν τα επικρατή γένη στην πλειοψηφία των μελετών. (Bankole, 2010) Τα συγκεκριμένα γένη μαζί με το γένος *Aspergillus* είναι τα κύρια γένη που εντοπίζονται σε κηλίδες “foxing”.(Florian, 1996; Florian and Manning 1999, 2000 ; Rakotonirainy *et al.*,

2007) Εξαίρεση αποτελούν οι μύκητες *Talaromyces flavus*, *Chalastospora gossypii* και *Trametes ochracea* οι οποίοι δεν έχουν ταυτοποιηθεί σε αντίστοιχες προηγούμενες μελέτες. Το ίδιο ισχύει και για το μύκητα *Candida sake*, αν και μύκητες του γένους *Candida* αναγνωρίστηκαν κατά τη μελέτη βιοαλλοίωσης του Leonardo Da Vinci's Atlantic Codex. (Principi *et al.*, 2011)

Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα η πλειοψηφία των ταυτοποιημένων μυκήτων έχει την ικανότητα να παράγει κυτταρίνασες: ενδογλυκανάσες, εξωγλυκανάσες ή κυτταρινοϋδρολάσες και β-γλυκοσιδάσες (Lynd *et al.*, 2002 & Zhang and Lynd, 2004b), που διασπούν τα ινίδια της κυτταρίνης, το βασικό συστατικό του χαρτιού. Η ικανότητα αυτή των μυκήτων να παράγουν κυτταρινάσες τους καθιστά πιθανούς παράγοντες βιοαλλοίωσης του χαρτιού. Η αποικοδόμηση της κυτταρίνης είναι, επίσης, χαρακτηριστικό που εντοπίζεται σε κηλίδες “foxing”. (Bichieri *et al.*, 2001)

Ωστόσο, ο βασιδιομύκητας *Trametes ochracea* όπως και οι περισσότεροι μύκητες του γένους *Trametes* παράγει ένζυμα που αποικοδομούν τη λιγνίνη και την απομακρύνουν από την κυτταρίνη. (Morozova *et al.*, 2007) Η κυτταρίνη, με αυτό τον τρόπο, γίνεται προσιτή σε άλλα ένζυμα όπως οι κυτταρινάσες που παράγονται από τους υπόλοιπους μύκητες. Επιπλέον, οι λακκάσες είναι πιθανό ότι συμμετέχουν στη σύνθεση σκουρόχρωμων χρωστικών και κατ' επέκταση στο σχηματισμό χρωματικών λεκέδων στο χαρτί.

Πολλοί από τους μύκητες (π.χ. *Penicillium* και *Alternaria spp.*) εκτός από την αλλοίωση που προκαλούν στα πολιτιστικά αντικείμενα από χαρτί είναι επικίνδυνοι και για την υγεία τόσο του προσωπικού του χώρου όπου φυλάσσονται όσο και αυτών που τα χρησιμοποιούν. Η αιτία της επικινδυνότητας τους οφείλεται στην παραγωγή μυκοτοξινών. Οι μυκοτοξίνες είναι τοξικοί μεταβολίτες των μυκήτων. Οι μύκητες παράγουν πολλούς δευτερογενείς μεταβολίτες ως παραπροϊόντα του μεταβολισμού τους. (Abbott, 2002) Εισέρχονται στο σώμα μέσω της εισπνοής τοξικογενών σπόρων και της άμεσης επιδερμικής επαφής και μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες, όπως άσθμα και μυκητιάσεις. (Bennet and Kilch, 2003 ; Nielsen, 2003). Μερικές περιπτώσεις επιβλαβών μυκήτων είναι οι ακόλουθες: Ο μύκητας *Alternaria alternata* αποτελεί γνωστό παράγοντα αλλεργίας και άσθματος. (Fung *et al.*, 2000) Η εισπνοή των σπόρων *Penicillium* που εκκρίνουν τοξίνες αποτελεί παράγοντα συνδρόμων όπως το τοξικό σύνδρομο σκόνης (ODTS- Organic Dust Toxic Syndrome). Ο μύκητας *Penicillium citrinum* παράγει τη μυκοτοξίνη

κιτρινίνη (citrinin) η οποία είναι νεφροτοξική. (Manabe, 2001) Συνεπώς, είναι σημαντικό οι εργαζόμενοι σε βιβλιοθήκες και αρχεία καθώς και οι χρήστες αρχειακού υλικού να είναι ενήμεροι του προβλήματος έτσι ώστε να παίρνονται οι κατάλληλες προφυλάξεις κατά το χειρισμό των αντικειμένων.

Η αναγνώριση των μικροοργανισμών που προκαλούν το φαινόμενο της βιοαλλοίωσης, η διασαφήνιση των λειτουργιών αυτών των μικροοργανισμών και ο ρόλος τους στη βιοαλλοίωση αποτελούν πληροφορίες απαραίτητες για το σχεδιασμό στρατηγικών διατήρησης και προστασίας μνημείων, έργων τέχνης από χαρτί και άλλα υλικά από τις μικροβιακές αποικίες και τις ακόλουθες συνέπειες του αποικισμού.

Ο έλεγχος της θερμοκρασίας και της σχετικής υγρασίας είναι το πρώτο βήμα στα πλαίσια του περιβαλλοντικού ελέγχου των αρχειοφυλάκιων. Υψηλά ποσοστά σχετικής υγρασίας (πάνω από 60%) με συνδυασμό με μέτριες θερμοκρασίες ευνοούν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, αλλά οι αλλοιώσεις που αυτοί προκαλούν μπορούν να μειωθούν ελέγχοντας τους χώρους φύλαξης και ρυθμίζοντας τις περιβαλλοντικές συνθήκες τους. Η κατάσταση υγιεινής του χώρου φύλαξης και ιδιαίτερα το ποσό των σπόρων των μυκήτων που εντοπίζονται πάνω στα αντικείμενα πρέπει να καθορίζεται και να αναπτύσσονται τεχνικές καταστροφής αυτών. (Dicus, 2000; Barton and Wellheiser, 1985) Επίσης, είναι απαραίτητες οι αίθουσες καραντίνας για τα μολυσμένα αντικείμενα. Στα νεόδμητα κτίρια φύλαξης έργων τέχνης λειτουργούν συστήματα φιλτραρίσματος που εμποδίζουν την είσοδο σπόρων μυκήτων στον εσωτερικό χώρο. Η χρήση βιοκτόνων αποτελεί μία αποτελεσματική λύση, ωστόσο λόγω του κόστους και της τοξικής φύσης της μεθόδου έχει απαγορευτεί σε αρκετές χώρες. (Flieder *et al.*, 1994; Adamo *et al.*, 2001; Gonzalez *et al.*, 2002) Τέλος, μία εναλλακτική είναι η χρήση της ακτινοβολίας των γ ακτινών, μία πολλά υποσχόμενη μέθοδος στο πεδίο της συντήρησης.

Τα 5 χειρόγραφα του 19^{ου} και 20^{ου} αιώνα που φυλάσσονται στο Γενικό Αρχείο του Κράτους είναι μεγάλης πολιτιστικής και ιστορικής αξίας. Ο στόχος της μελέτης της ποικιλότητας των μυκήτων πραγματοποιήθηκε με κλασσικές τεχνικές που βασίζονται στις καλλιέργειες μυκήτων σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα και με μεταγονιδιωματική προσέγγιση. Οι μύκητες που ταυτοποιήθηκαν λόγω των ενζύμων που παράγουν και των χρωστικών που εκκρίνουν είναι πολύ πιθανό να είναι υπεύθυνοι για την αλλοίωση των χειρογράφων. Η μικροβιακή ποικιλότητα,

όμως, των χειρόγραφων δεν περιορίζεται μόνο στους μύκητες. Η παρουσία βακτηρίων είναι πιθανόν να ευθύνεται επίσης για το φαινόμενο της βιοαλλοίωσης. Ταυτόχρονα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο καθορισμός του ακριβούς τρόπου δράσης κυτταρινολυτικών μυκήτων στο χαρτί και σε παρόμοια κυτταρινικά υποστρώματα και στο σχηματισμό κηλίδων “foxing”. Αναγκαία κρίνεται η πλήρης κατανόηση των διεργασιών μεταβολισμού των μυκήτων που ευθύνονται για το φαινόμενο της βιοαλλοίωσης, η διαλεύκανση του τρόπου δράσης των κυτταρινασών πάνω στο χαρτί καθώς και άλλων ενζύμων που πιθανόν συμμετέχουν σε αυτές τις διεργασίες. Η αναγνώριση ενζύμων-κλειδιά και η κατανόηση της λειτουργίας τους σε μονοπάτια του μεταβολισμού δεν βοηθά μόνο στην πρόληψη και διάσωση σημαντικών χειρόγραφων και έργων τέχνης, αλλά εξελίσσει ταυτόχρονα και την έρευνα που κινείται προς την κατεύθυνση βελτίωσης μιας νέας γενιάς αντιμυκητιακών φαρμάκων ενάντια στα ανθεκτικά στελέχη που έχουν πια δημιουργηθεί.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abbott, S.P. (2002) Mycotoxins and Indoor Molds. *Indoor Environment Connections* 3(4), 14-24
2. Adamo M., Brizzi M., Magaudda G., Martinelli G., Plossi Zappalà M., Rocchetti F., Savagnone F., (2001) Gamma radiation treatment of paper in different environmental conditions: chemical, physical and microbiological analysis, *Restaurator* 22, 107–131.
3. Adamo, M., Giovannotti, M., Magaudda, G., Plossi-Zappala M., Rocchetti, F., Rossi, G., (1998) Effect of gamma rays on pure cellulose paper as a model for the study of a treatment of “biological recovery” of biodeteriorated books. *Restaurator* 19, 41–59.
4. Adamo M., Magaudda G., (2003) Susceptibility of printed paper to attack of chewing insects after gamma irradiation and aging, *Restaurator* 24, 95–105.
5. Allsopp, D., Seal, K., Gaylarde, C. (2006) *Introduction to biodeterioration*,
6. 2nd Ed., Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
7. Anderson IC, Campbell CD, Prosser JI, (2003) Diversity of fungi in organic soils under a moorland Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) gradient. *Environmental Microbiology* 5: 1121–1132.
8. Arai, H., (2000) Foxing caused by fungi: twenty-9ve years of study. *International Biodeterioration & Biodegradation* 46, 181–188.
9. Arya A., Shah A.R., Sadasivan S., (2001) Indoor aeromycoflora of Baroda museum and Egyptian mummy. *Current Science* 81(7), 793-799.
10. Bankole, O.M. and Abioye, A. (2005) “Evaluation of deterioration of library materials at Olabisi Onabanjo University Library, Ago-Iwoye, Nigeria”, *African Journal of Library, Archives and Information Science*, Vol. 15 No. 2, pp. 99-108.
11. Barton, J.P., and Wellheiser, J.G. (eds), (1985) *An Ounce of Prevention: A Handbook on Disaster Contingency Planning for Archives, Libraries and Record Centres*. Toronto, Canada: Toronto Area Archivists Group Education foundation.
12. Bennett, J.W., Faison, B.D., (1997) Use of Fungi in Biodegradation. In: Hurst, C.J., Knudsen, G.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D., Walter, M.V. (Eds.), *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press, Washington, pp. 758–765

13. Bennet JW, Kilch M., (2003) Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* 16:497-516
14. Berlin A., Gilkes N., Kilburn D., Bura R., Markov A., Skomarovsky A., Okunev O., Gusakov A., Maximenko V., Gregg D., Sinitzyn A., Saddler J., (2005) Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates-Evidence for the role of accessory enzymes, *Enzyme Microb. Technol.* 37, 175-184.
15. Berlin A., Maximenko V., Gilkes N., Saddler J, (2007) Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng* 97, 287-296.
16. Berner R.A., (2003) The long-term carbon cycle, fossil fuels and atmospheric composition. *Nature*, 426, 323-326
17. Bicchieri, M., G. Pappalardo, E P. Romano, E M. Sementilli, and R. De Acutis. (2001) Characterization of foxing stains by chemical and spectrometric methods. *Restaurator* 22(1):1-19
18. Bicchieri M., S. Ronconi, F.P. Romano, L. Pappalardo, M. Corsi, G. Cristoforetti, S. Legnaioli, V. Palleschi, A. Salvetti, E. Tognoni, (2002) Study of foxing stains on paper by chemical methods, infrared spectroscopy, micro-X-ray fluorescence spectrometry and laser induced breakdown spectroscopy, *Spectrochimica Acta*, part B 57 1235e1249.
19. Blyskal B., (2009) Fungi utilizing keratinous substrates. *Int Biodeterior Biodegradation* 63: 631–653.
20. Bousher A, Malini C, and Edyvean R. 1995. *Biodeterioration and biodegradation 9: The 9th International Biodeterioration and Biodegradation Symposium*. Rugby, UK: Institution of Chemical Engineers
21. Bowman SM, Free SJ., (2006). "The structure and synthesis of the fungal cell wall". *Bioessays* 28 (8): 799–808.
22. Bourbonnais R, Paice MG, Freiermuth B, Borneman S., (1997) Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4627-4632.
23. Bruns T. (2006). "Evolutionary biology: a kingdom revised". *Nature* 443 (7113): 758–761
24. Camuffo, D., (1986) Deterioration Processes of Historical Buildings, pp.189-221 in: T. Schneider (editor): "*Acidification and its Policy Implications*", Elsevier, Amsterdam.

25. Camuffo, D., (1992) Acid Rain and Deterioration of Monuments: How Old Is the Phenomenon? *Atmospheric Environment*, 26B, 241-247.
26. Camuffo, D., (1994) Effects of Air Pollution on Historic Buildings and Monuments. Scientific Basis for Conservation: Case Studies in the Deterioration of Stone Monuments in Italy. *European Cultural Heritage Newsletter on Research*, 8,1, 7-15.
27. Cappitelli F., Pasquariello G., Tarsitani G., Sorlini Cl., (2010) Scripta manent? Assessing microbial risk to paper heritage. In: *Trends in Microbiology*, 18, pp. 538–542
28. Chao A., (1984) Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scand. J Stat.* 11:265-270
29. Chao A., (1987) Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics.* 43:783-791
30. Choi, Soyeon, (2007) “Foxing on Paper: A Literature Review,” *Journal of the American Institute for Conservation*, vol. 46, no. 2, pp. 137-152
31. Choisy, P., A. de la Chapelle, D. Thomas, and M. D. Legoy. (1997) Non-invasive techniques for the investigation of foxing stains on graphic art material. *Restaurator* 1S(3):131-S2.
32. Christensen BE and Characklis WG. (1990) Physical and chemical properties of biofilms. In: Characklis WG and Marshall KC (Eds). *Biofilms*. New York, NY: John Wiley and Sons, Inc.
33. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, (1995) Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49: 711–45.
34. Costerton JW, Stewart PE, and Greenberg EP. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318–22.
35. Daniels, V, and N. D. Meeks. (1994) Foxing caused by copper alloy inclusions in paper. *Proceedings of Symposium 88, conservation of historic and artistic works on paper, Ottawa.* ; Ottawa: Canadian Conservation Institute. 229-33.
36. Da Silva, M., A.M.L. Moraes, M.M. Nishikawa, M.J.A. Gatti, M.A.V. de Alencar, L.E. Brandão, A. Nóbrega., (2009) Inactivation of fungi from deteriorated paper materials by radiation. *Int. Biodeter. Biodegrad.*, 57: 163-167.
37. Das M.K.L., Prasad J.S., Ahmad S.K., (1997) Endoglucanase production by paper-degrading mycoflora, *Letters in Applied Microbiology* 25 (5), 313

38. Day M.J., Currah R.S., (2011) In vitro degradation of the moss *Hylocomium splendens* by three pleosporalean fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 57:(5) 382-391
39. Deacon JW., (1997) Fungal parasites of humans, insects and nematodes. In: *Modern Mycology* 3rd ed. (Edited by Deacon JW), pp 266 Blackwell Science, Cambridge
40. Deacon, J.W. (2005) *Fungal Biology*. Cambridge, MA, USA: Blackwell Publishers.
41. De Bonaventura, M. P., R. Desalle, D. E. Eveleigh, A. M. Baldwin, and R. J. Koestler. (2003) Studies of fungal infestations of Tiffany's drawings: Limits and advantages of classical and molecular techniques. In *Art, Biology, and Conservation: Bio deterioration of Works of Art*. New York: The Metropolitan Museum of Art, 94-109.
42. Derow, J., and A. Owen. (1992) Foxing. *Paper Conservation Catalog*. American Institute for Conservation Book and Paper Group. Washington, DC: AIC. Chap. 13:1-39
43. Dicus, D.H., (2000) One response to a collection wide mold outbreak: how bad can it be, how good can it get? *Journal of the American Institute for Conservation* 39, 85–105.
44. Dutta, T., Sahoo, R., Sengupta, R., Ray, S.S., Bhattacharjee Ghosh, S., (2007) Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35, 275–282.
45. El Bergadi Fatimazahra, El abed Soumya1, Laachari Faouzi and Ibsouda Koraichi Saad, (2011) *Penicillium italicum*, *Penicillium griseoroseum* and *Pseudomonas trivialis* are the Novel Species that Degrade Cedar Wood in Historical Moroccan Sites *Journal of Pure & Applied Microbiology* Volume 5 No. 2 Page No. 501-509
46. Eshel, D., Ben-Arie, R., Dinoor, A., Prusky, D. (2000) Resistance of gibberellin-treated persimmon fruit to *Alternaria alternata* arises from the reduced ability of the fungus to produce endo-1,4- β -glucanase. *Phytopathology*, 90, 1256–1262.
47. Eusman, Elmer, (1995) “Tideline Formation in Paper Objects: Cellulose Degradation at the Wet-Dry Boundary,” *Conservation Research*, pp. 11-27.

48. Fabbri, A.A., Ricelli A., Brasini S. , Fanelli C., (1997) Effect of different antifungals on the control of paper biodeterioration caused by fungi. *Int. Biodeter. Biodegrad.*, 39: 61-65.
49. Flieder, F., Ramiere, R., Leroy, M., Rakotonirainy, M., Descalle, P., (1994) Recherches sur l'effet du rayonnement gamma pour la desinfection des papiers. In: *Environnement et Conservation de l'Ecrit, de l'Image et du Son: Actes des Deuxiemes Journees Internationales d'Etudes de l'ARSAG, Association pour la recherche scientifique sur les arts graphiques, Paris*, pp. 79–86.
50. Florian, M.L.E. (1996) The role of the conidia of fungi in fox spots. *Studies in Conservation* 41:65- 75
51. Florian, M.L.E. (1997) *Heritage eaters: Insects & fungi in heritage collections*. London: James & James Ltd.
52. Florian, M.L.E. (2000) Fungal spots in a book dated 1854: Causative species ID and distribution; time, source, and method of contamination. In *The Book and Paper Group Annual*. American Institute for Conservation Book and Paper Group. Washington, DC: AIC. 19:41-2
53. Florian, M.L.E., (2000b) SEM analysis of irregular fungal fox spot in an 1854 book: population dynamics and species identification. *International Biodeterioration & Biodegradation* 46, 205–220.
54. Florian, M.L.E. (2002) *Fungal facts: Solving fungal problems in heritage collections*. London: Archetype Publications Ltd.
55. Florian, M.L.E., and L. Manning. (1999) The ecology of the fungal fox spots in a book published in 1854. *Restaurator* 20(3-4): 137-50
56. Florian, M.L.E., and L. Manning. (2000) SEM analysis of irregular fungal fox spots in an 1854 book: Population dynamics and species identification. *International Bio deterioration and Bio degradation* 46(3):205- 20.
57. Freitag, C.M., Morrell, J.J., (1998) Use of gamma radiation to eliminate fungi from wood. *Solid Wood Products* 48, 76–78.
58. Fung, F., Tappen D., Wood G., (2000) *Alternaria*- associated asthma. *Applied Occupational and Environmental Hygiene* 15: 924-927.
59. Gandjar, I., Abdis, D.N.D. and Wardasmita, S. (1989), ‘‘Moulds isolated from old archive materials in Indonesia’’, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 5, pp. 387-9.

60. Gaylarde, C., Ribas Silva, M., and Warscheid, Th. (2003) "Microbial impact on building materials: An overview." *Mater. Struct.*, 36, 342– 352
61. Ghahfarokhi MS, Fazli A, Lotfi A, Abyane MR., (2004) Cellobiose dehydrogenase production by the genus *Cladosporium*. *Iran. Biomed. J.* 8: 107-111.
62. Goetz J., Ducan f., (2006) *Alternaria Malorum*: a Mini-Review with New Records for Hosts and Pathogenicity *Pacific Northwest Fungi.* 1(3):1-8.
63. Gonzalez M.E., A.M. Calvo, E. Kairiyama, (2002) Gamma radiation for reservation of biologically damaged paper, *J. Radiat. Phys. Chem* 63 263–265.
64. Gonzalez J.M., Saiz-Jimenez C., (2005) Application of molecular nucleic acid-based techniques for the study of microbial communities in monuments and artworks *INTERNATIONAL MICROBIOLOGY* (2005) 8:189-194
65. Good IJ (1953) The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* 43:45–63
66. Gorny, R.L., Klaus W., Detlef Schmechel, Enric R., Marjorie B., Sergey A.G., Reponen T., (2002) Fungal fragments as indoor air biocontaminants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3522–3531
67. Green, P.W.C., (2008) Fungal isolates involved in biodeterioration of book-paper and their effects on substrate selection by *Liposcelis bostrychophila* (Badonnel) (Psocoptera: Liposcelididae). *J Stored Prod Res* 44: 258– 263.
68. Gueguen Y, Chemardin P, Arnaud A., (2001) Purification and characterization of an intracellular beta-glucosidase from a *Candida sake* strain isolated from fruit juices. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 95: 151-162
69. Guiamet, P., Borrego, S., Lavin, P., Perdomo, I., and de Saravia, S.G. (2011) Biofouling and biodeterioration in materials stored at the Historical Archive of the Museum of La Plata, Argentina and at the National Archive of the Republic of Cuba. *Colloids Surf B Biointerfaces* 85: 229– 234.
70. Hammond PM. (1995) Described and estimated species numbers: an objective assessment of current knowledge. In: Allsopp D, Colwell RR, and Hawksworth DL (Eds). *Microbial diversity and ecosystem function*. Wallingford, UK: CAB International Hawksworth D.L. and Rossman, A.Y. 1997. Where are all the undescribed fungi? *Phytopathology* 87: 888-891.
71. Hanus, J., (1985) Gamma radiation for use in archives and libraries. *Abbey Newsletter* 9, 34–36.

72. Ho, M.H., F.M. Duggan, and S.C. Jong. (1999) *Cladosporium* and *Cladophialophora* in culture: descriptions and an expanded key. *Mycotaxon* 72: 115-157
73. Ikegaya, N., Goto M., Hayashi Y., (1993) "Effect of phenolic compounds and urovides on the activities of extracellular enzyme during vegetative growth and fruit-body formation of *Lentinus edodes*." *Trans. Mycol. Soc. Japan* 34:195-207.
74. Inglis, G. D., Kawchuk, L.M., (2002) Comparative degradation of oomycete, ascomycete, and basidiomycete cell walls by mycoparasitic and biocontrol fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, 48, 60–70.
75. Ingold, C.T. (1965) *Spore Liberation*. New York: Oxford University Press, p. 210
76. Ito T., Yokoyama T., (1983) Preservation of basidiomycetes cultures by freezing. *IFO Res. Comm*, 11, 60-70
77. Izzo, A.D., Mazzola, M., (2009) Hybridization of an ITS-based macroarray with ITS community probes for characterization of complex communities of fungi and fungal-like protists. *Mycol. Res.* 113, 802–812
78. Jorg, M., Wildfuhr, W., Langguth, H., Teichert, E., (1992) Gammastrahlen zur Schimmelbekämpfung bei Buchern: Versuche an der Universitätsbibliothek zu Leipzig. *Restauro* 98, 114–119
79. Juarros E., Tortajada C., Garcia M.D., Uruburu F., (1993) Storage of cultures of filamentous fungi at -80°C: Effects of different freezing-thawing methods. *MICROBIOLOGIA SEM* 9, 28-33
80. Jurado v., Porca E., Pastrana M.P., Cuezva S., Fernandez-Cortes A., Saiz-Jimenez C., (2010) Microbiological study of bulls of indulgence of the 15th–16th centuries *Science of the Total Environment* 408, 3711–3715
81. Koestler RJ, Koestler VH, Charola AE, and Nieto-Fernandez FE. (2003) *Art, biology, and conservation: biodeterioration of works of art*. New York, NY: The Metropolitan Museum of Art.
82. Koch G.H., Brongers M.P.H., Thompson N.G., Virmani Y.P., Payer J.H., (2001) *Corrosion Cost and Preventive Strategies in the United States*. Report FHWA-RD-01-156, Federal Highway Administration
83. Kunamneni, A., Ballesteros A., Plou F.J., Alcalde M., (2007) Fungal Laccase - a Versatile Enzyme for Biotechnological Applications. In: *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied*

Microbiology, Mendez-Vilas, A. (Ed.). Formex, Badajoz, ISBN 978-84-611-9422-3, pp: 233-245.

84. Lord NS, Kaplan CW, Shank P, Kitts CL, Elrod SL (2002) Assessment of fungal diversity using terminal restriction fragment pattern analysis: comparison of 18S and ITS ribosomal regions. *FEMS Microbiol Ecol* 42:327–337

85. Lynd, L.R., Weimer, P.J., Van Zyl, W.H., Pretorius, I.S., (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 506e577.

86. Madi, L., Katan T., Katan J., Henis Y., (1997) Biological control of *Sclerotium rolfsii* and *Verticillium dahliae* by *Talaromyces flavus* is mediated by different mechanisms. *Phytopathology*, 87: 1054-1060.

87. Magaúda, G., (2004) The recovery of biodeteriorated books and archive documents through gamma radiation: some considerations on the results achieved. *Journal of Cultural Heritage* 5, 113–118.

88. Manabe M., (2001) Fermented foods and mycotoxins. *Mycotoxins* 51: 25-29.

89. McNamara, N.P., Black, H.I.J., Beresford, N.A., Parekh, N.R., (2003) Effects of acute gamma irradiation on chemical, physical and biological properties of soils. *Applied Soil Ecology* 24, 117–132.

90. McNamara, C. J., Breuker, M., Helms, M., Perry, T. D., & Mitchell, R. (2004). Biodeterioration of Inbralac used for the protection of bronze monuments. *Journal of Cultural Heritage*, 5, 361–364.

91. McNamara C.J., Mitchell R., (2005) Microbial deterioration of historic stone *Front Ecol Environ*; 3(8): 445–451

92. Meier C., Petersen K., (2006) *Schimmelpilze Auf Papier Ein Handbuch Für Restauratoren*. Tönning, Germany: Der Andere Verlag, p. 198.

93. Mesquita, N., Portugal, A., Videira, S., Rodríguez-Echeverri, A.A., Bandeira, A.M.L., Santos, M.J.A. and Freitas, H. (2009), “Fungal diversity in ancient documents. A case study on the Archive of the University of Coimbra”, *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol. 63 No. 5, pp. 626-9.

94. Meynell, G., Newsam, R.J., (1978). Foxing, a fungal infection of paper. *Nature* 274, 466–468.

95. Micali, O., Montacutelli R, Tarsitani G., (2003) Pathogenic microorganisms and situation of risk to man. In Cultural Heritage and Aerobiology (Mandrioli, P. et al., eds), pp. 31–43, Kluwer Academic Publishers
96. Michaelsen, A., Pinae, G., Montanari, M. and Pinzari, F. (2009), “Biodeterioration and Restoration of a 16th-century book using a combination of conventional and molecular techniques: a case study”, International Biodeterioration and Biodegradation, Vol. 63, pp. 161-8.
97. Michaelsen, A., Pinzari, F., Ripka, K., Lubitz, W. and Pinar, G. (2006), “Application of molecular techniques for identification of fungal communities colonizing paper material”, International Biodeterioration and Biodegradation, Vol. 58, pp. 133-41.
98. Mikata K., Banno I., (1987) Preservation of yeast cultures by freezing at -80°C : I. Viability after 2 years storage and the effects of repeated thawing-freezing. IFO ResComm. 13, 59-68.
99. Montemartini Corte, A., A. Ferroni, and V. S. Salvo. (2003) Isolation of fungal species from test samples and maps damaged by foxing, and correlation between these species and the environment. International Biodeterioration and Biodegradation 51(3): 167-73.
100. Moore RT., (1980). "Taxonomic proposals for the classification of marine yeasts and other yeast-like fungi including the smuts". *Botanica Marina* 23: 361–373.
101. Morozova O.V., Shumakovich G.P., Gorbacheva M.A., Shleev S.V., Yaropolov A.I., (2007a) “Blue” laccases. *Biochem. (Moscow)* 72:1136-1412.
102. Morozova O.V., Shumakovich G.P., Shleev S.V., Yaropolov Y.I. (2007b) Laccase-mediator systems and their applications: A review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 5:523-535.
103. Mueller, G.M. and Schmit, J.P. (2007) “Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict?”, *Biodiversity Conservation*, Vol. 16, pp. 1-5.
104. Murray, F. R., Llewellyn, D. J., Peacock, W. J., Dennis, E.S., (1997) Isolation of the glucose oxidase gene from *Talaromyces flavus* and characterization of its role in the biocontrol of *Verticillium dahliae*. *Current Genetics*, 32, 367– 375.
105. Nielsen K.F., (2003) Mycotoxin production by indoor molds, *Fungal Genetics and Biology* 39, 103–117

106. Niesler A, Górny RL, Wlazło A, Łudzeń-Izbińska B, Ławniczek-Wałczyk A, Gołofit-Szymczak M, (2010) Microbial contamination of storerooms at the Auschwitz-Birkenau Museum. *Aerobiologia* 26:125–33.
107. Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson K-H, (2008) Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary Bioinformatics* 4: 193e201.
108. Olubanke M. Bankole, (2010) "A review of biological deterioration of library materials and possible control strategies in the tropics", *Library Review*, Vol. 59 Iss: 6, pp.414 – 429
109. Pangallo, D., Chovanova, K., Simonovicova, A., Ferianc, P., (2009) Investigation of microbial community isolated from indoor artworks and their environment: identification, biodegradative abilities, and DNA typing. *Canadian Journal of Microbiology* 55, 277–287.
110. Pedersoli, J.L.J., Ligterink F.J., Di Pietro G., (2000) "Browning of paper: fluorescence changes accompanying the discolouration of artificially aged paper," *Papier Restaurierung*, vol. 1, pp. 47-54.
111. Peters, Dale, (2000) "An alternative to foxing? Oxidative degradation as a cause of cellulosic discoloration," *Papier Restaurierung*, vol.1, pp. 55-60.
112. Phalip V., Hatsch D., Laugel B., Jeltsch J.M., (2006) An overview of fungal community diversity in diseased hop plantations *FEMS Microbiol Ecol* 56, 321–329
113. Pinzari, F., Cialei, V., and Barbabietola, N. (2010a) Measurement of the micro-aeroflora deteriorating potentialities in the indoor environments. *e-Preserv Sci* 7: 29–34.
114. Pinzari, F., Pasquariello, G., De Mico, A., (2006) Biodeterioration of paper: a SEM study of fungal spoilage reproduced under controlled conditions. *Macromolecular Symposia* 238, 57–66.
115. Pinzari, F., Zotti, M., De Mico, A., and Calvini, P. (2010b) Biodegradation of inorganic components in paper documents: formation of calcium oxalate crystals as a consequence of *Aspergillus terreus* Thom growth. *Int Biodeterior Biodegradation* 64: 499–505.
116. Principi, P., Villa, F., Sorlini, C., Cappitelli, F., (2011) Molecular studies of microbial community structure on stained pages of Leonardo da Vinci's Atlantic Codex. *Microb. Ecol.* 61, 214e222.

117. Pointing, S.B., Jones, E.B.G., Jones, A.M., (1998) Decay prevention in water logged archaeological wood using gamma irradiation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 42, 17–24
118. Rakotonirainy, M.S., Heude, E., and Lavédrine, B. (2007) Isolation and attempts of biomolecular characterization of fungal strains associated to foxing on a 19th century book. *J Cult Herit* 8: 126–133
119. Rebrikova, N. L., and N. V. Manturovskaya. (2000) Foxing: A new approach to an old problem. *Restaurator* 21:85-100.
120. Reich, M., Kohler A., Martin F., Buee M., (2009) Development and validation of an oligonucleotide microarray to characterise ectomycorrhizal fungal communities. *BMC Microbiol.* 9, 241
121. Rocchetti F., M. Adamo, G. Magaudda, (2002) Fastness of printing inks subjected to gamma-ray irradiation and/or artificial aging, *Restaurator* 23, 15–26.
122. Rose A.H., (1981) *Microbial Biodeterioration*. Academic Press, London
123. Saad, D.S., Kinsey, G.C., Kim, S., Gaylarde, C.C., (2004) Extraction of genomic DNA from filamentous fungi in biofilms on water-based paint coatings. *International Biodeterioration & Biodegradation* 54, 99–103.
124. Saleh, Y.G., Mayo, M.S., Ahearn, D.G., (1988) Resistance of some common fungi to gamma irradiation. *Applied Environmental Microbiology* 54, 2134–2135.
125. Samson, R.A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C., Andersen, B., (2010) *Food and Indoor Fungi*. CBS Laboratory Manual Series, CBS-KNAW Fungal Diversity Centre, ISBN 978-90-70315-82-3, 390 pp.
126. Saloheimo M, Paloheimo M, Hakola S, Pere J, Swanson B, Nyssonen E, Bhatia A, Ward M, Penttila M., (2002) Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *Eur J Biochem* 269: 4202–4211
127. Shamsian, A., Fata, A., Mohajeri, M. and Ghazvini, K. (2006) ‘‘Fungal contaminations in historical manuscripts at Astan QudsMuseum Library, Mashhad, Iran’’, *International Journal of Agriculture and Biology*, Vol. 8 No. 3, pp. 420-2.
128. Sharma D., Cukras A.R., Rogers E.J., Southworth D.R., Green R., (2007) *Mutational analysis of S12 protein and implications for the accuracy of decoding by the ribosome. J Mol Biol* 374:1065–1076.
- Sterflinger, K. (2010) Fungi: their role in deterioration of cultural heritage. *Fungal Biol Rev* 24: 47–55.

129. Sterflinger K., Pinzari Fl., (2010) The revenge of time: fungal deterioration of cultural heritage with particular reference to books, paper and parchment *Environmental Microbiology*, doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02584.x
130. Strzelczyk, A., M. Pronobis-Bobowska. (1993) Characteristics of foxing stains on paper his- toric objects. *Naukowe podstawy ochrony i konserwacji dzieł sztuki oraz zabytków kultury materialnej*. 327- 33.
131. Szczepanowska, H. M., and A. R. Cavaliere. (2003) Artworks, drawings, prints, and documents: Fungi eat them all! In *Art, Biology, and Conservation: Biodeterioration of Works of Art*. New York: The Metropolitan Museum of Art. 128-51.
132. Sand W and Bock E. (1991) Biodeterioration of mineral materials by microorganisms – biogenic sulfuric and nitric acid corrosion of concrete and natural stone. *Geomicrobiol J* 9: 129–38.
133. Thurston CF., (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140:19-26
134. Tomazello, M.G.C., Wiendl, F.M., (1995) The applicability of gamma radiation to the control of fungi in naturally contaminated paper. *Restaurator* 16, 83–99.
135. Wang, Y., T. A. McAllister, J. Baah, R. Wilde, K. A. Beauchemin, L. M. Rode, J. A. Shelford, G. M. Kamande, K. J. Cheng. (2003) Effect of Tween 80 on *in vitro* fermentation of silage and interactive effects of Tween 80, Monensin and exogenous fibrolytic enzyme on growth performance by feedlot cattle. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 16:968-978.
136. Whitman WB, Coleman DC, and Wiebe WJ., (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6578–83.
137. Woese CR. (1994) There must be a prokaryote somewhere: microbiology's search for itself. *Microbiol Rev* 58: 1–9.
138. Wolfenden R, Snider MJ., (2001) The depth of chemical time and the powder of enzyme as catalysts. *Acc Chem Res*; 34:938–45.
139. Wonganu, B., K. Pootanakit, K. Boonyapakron, V. Champreda, S. Tanapongpipat, L. Eurwilaichiitr., (2008) Cloning, expression and characterization of a thermotolerant endoglucanase from *Syncephalastrum racemosum* (BCC18080) in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 58:78-86.

140. Zang, Y-H.P., Lynd, L.R., (2004) Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering* 88 (7), 797–824.
141. Zotti, M., Ferroni, A. and Calvini, P. (2008) “Microfungal biodeterioration of historic paper; preliminary FTIR and microbiological analyses”, *International Biodeterioration and Biodegradation*, Vol. 62, pp. 186-94.
142. Zyska, B., (1997) Fungi isolated from library materials: a review of the literature. *International Biodeterioration & Biodegradation* 40 (1), 43–51.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Οι αλληλουχίες των μυκήτων F1-F17 και οι ομόλογες τους αλληλουχίες σύμφωνα με το BLAST:

F1 (533 βάσεις)

TGGGTCAACCTCCCACCCGTGTTTATTTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACT
GGCCGCGGGGGGCTTACGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACTCTG
TCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGA AAAATATAAATTATTTAAAACCTTCAACAACGGATCT
CTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAA
TTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCAT
GCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCGTCTCCG
ATCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCCGCTCCGGTCTCGAGCGTAT
GGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTT
TCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGGC

F2 (526 βάσεις)

CTTTGCGGGGGTCTCTTTTTGGGAATTCGACGCAAGTCGATGGTACCTGGGGAGGCTCG
CGTCCCTTACACACCCTTTGTATGTCTTAAGAATGTCTACTCGATGTAATAAAACGCAT
CTAATACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA
ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCT
TGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCACACCTGTTTGAGTGTGCGTGA AATTCTCAACCCCT
TTCCGCTTTTGTGAACGTAGGGATTGGACTTGGAGGCTTTGCCGGCTCTTGCTCGGCTCCT
CTCAAATGCATTAGTGCCTTTGTTGCGACGTGCGCCCTCGGTGTGATAATTATCTACGCT
GTGGTGCCTTGGTCTGTGGAGACACGCTTTCAAACCGTCCGAAAGGACAGCTTTCAT
CGAACTTTGACCTCAAATCAGGTGGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATAT

F3 (508 βάσεις)

TGCGCGCGGGGGCCGGCCCTGCTGAATTATTCACCCGTGTCTTTTGCCTACTTCTTGTTT
CCTGGGTGGGCTCGCCCGCCCTCAGGACCAACCACAAACCTTTTGCAATAGCAATCAGC
GTCAGTAACAACGTAATTAATTACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCG
ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC
GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTC
ATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCTCTTTTGTCTCCAGTTCGCTGGAGAC
TCGCCCTTAAAGTCATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGA GCGCAGCACAAAGTCGCGCT
CTTTGCCAGCCAAGGTCAGCGTCCAGCAAGCCTTTTTTTCAACCTTTGACCTCGGATCAG
GTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAT

F4 (518 βάσεις)

ACCTCCCACCCGTGTTTATTTTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACTGGCCGCC
GGGGGGCTTACGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAG
ATTGTAGTCTGAGTGA AAAATATAAATTATTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTC
CGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTG
AATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTC
CGAGCGTCAATTTCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCGTCTCCGATCCCGG
GGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCCGCTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTT
TGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTT ATCCAGGT
TGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATC

F5 (529 βάσεις)

CGGGAGGCGCTGTTAGTCCGCATAGTTTAACTACTGATGAGCGGCAGGCCCTCTGTCTG
TACCCTTGTCTTTTTGCGCACCCATGTTTCCCTCGCGGGCTTGCCCGCCGAATGGACAAA
ACTATAACCTTTTTAATTTTCAATCAGCGTCTGAAAAAACTTAATAATTACAACCTTCAA
CAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGT
GAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTC
CATGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGGTGT
TTGTCTCTCCTTTGCGTTTGGACTCGCCTTAAAGCAATTGGCAGCCAGTGTTTTGGTAT
TGAAGCGCAGCACAAATTTGCGCTTCTCGCCGATAATACTCGCGTCCATAAGCCTTTTATT
CAACTTTTACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATC

F6 (537 βάσεις)

GTCTGATGCTGCCCCGCAACGGGATGTGCTCGTCTGGATGCGTGTCCCTTCTCTATTCCA
CCCCTTTGTGAACCAAGTGTGCGAGCCGATGAGAGATCGGAGGCTCGCATGCAACCCTT
AACATACCCCAATGAAGTATCAGAATGTACCTTGCCTTAACCTCGCACAAATACAACCTT
CAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCTTGG
CATTCCGAGGGGCACGCCTGTTTGAGTGTCTGTAACCTCCACCCTCTACCTTTTTTCGG
AAGGCACTGGGCTGGGATTTGGGAGCTTGCGGGTCCCTGGCCGATCCGCTCTCCTTGAA
TACATTAGCGAAGCCCTTGCGGCCTTGGTGTGATAGTCATCTACGCCTTGGCTTAGCGA
ACATATGGGAATCGCTTCCAACCGTCTCGCAAGAGACAATCACTACCAACTTGACCTCA
AATCA

F7 (474 βάσεις)

CTGCTACCTCTTACCCATGTCTTTTGTGAGTACCTTCGTTTCCTCGGCGGGTCCGCCCGCCG
ATTGGACAACATTCAAACCCTTTCAGTTGCAATCAGCGTCTGAAAAACATAATAGTT
ACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG
ATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGC
CCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACCTTCAAGCTCTGCTT
GGTGTGGGTGTTTGTCTCGCCTCTGCGTGTAGACTCGCCTTAAAAACAATTGGCAGCCGG
CGTATTGATTTTCGGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTTCGACTCATAACGACGACGTCCAA
AAGTACATTTTTACTCTTACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGC

F8 (487 βάσεις)

GGATGTTTCATAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCTGCCTTCGGG
CGGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTCGCTAACTTTGCAGTCTGAGTAACTTA
ATTAATAAATTAACACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGC
AGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC
GCACATTGCGCCCCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTACCACTC
AAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGCCGCGTGCCTCAAATCGACCCGGCTGGG
TCTTCTGTCCCCTAAGCGTTGTGGAAACTATTCGCTAAAGGGTGTTCGGGAGGCTACGC
CGTAAACAACCCCATTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACT
TAAGCATATCATA

F9 (473 βάσεις)

GGGGTTGTTTTACGGCGTAGCCTCCCGAACACCCTTTAGCGAATAGTTTCCACAACGCTT
AGGGGACAGAAGACCCAGCCGACGATTTGAGGCACGCGGCGGACCCGCTTGCCTAAT
ACCAAGCGAGGCTTGTGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCCGGAATACC
AGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCAGTGAATTCTGCAATTCACATTA
CTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTAAAAG
TTTTAATTTATTAATTAAGTTTACTCAGACTGCAAAGTTACGCAAGAGTTTGAAGTGTCC
ACCCGGAGCCCCGCCCCGAAGGCAGGGTCCGCCGGAGGCAACAGAGTTCGAAAAACA
AGGGTTGTGCGTTCCAGCTGTACAAGCCTGGGGCGTCATATAATGATCCCTCCGCAGG
T

F10 (501 βάσεις)

TTTGGGTTGATCGGCAAGCGCCGGCCGGGCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATAC
GCTCGAGGACCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCGGGATCGGAG
GACGGGGCCCAACACACAAGCCGTGCTTGTGGGAGGAGAAATGACGCTCGGACAGGCATG
CCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCAGTGAATTT
GCAATTCACATTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGAT
CCGTTGTTGAAAGTTTAAATAATTTATATTTCACTCAGACTACAATCTTCAGACAGAG
TTCGAGGGTGTCTTCGGCGGGCGCGGGCCCGGGGGCGTAAGCCCCCGGCGGCCAGTTA
AGGCGGGCCCCGCAAGCAACAAGGTAATAAACACGGGTGGGAGGTTGGACCCAG
AGGGCCCTCACTCGGTAATGATCCTTCCGCA

F11 (493 βάσεις)

TGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTAACTGGCCGCCGGGGGGCTTACGCCCCCGGGCCCGC
GCCCGCCGAAGACACCTCGAATCTGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGAAAATATAAA
TTATTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA

AATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACAT
TGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCA
CGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCTCCGATCCCGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGC
GGCACCAGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGGCC
GGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAC
CCGCTGAACTTAAGCATATCA

F12 (511 βόσεις)

TGTTTTATTTACGTTGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCCTTAACTGGCCGCCGGGGGGCTTACG
CCCCGGGCCCCGCGCCCCGCCGAAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGTAGTCTGA
GTGAAAATATAAATTATTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATG
AAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGT
CTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATT
GCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCGTCCTCCGATCCCGGGGGACGGGCC
CGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGCGTCCGGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCT
CTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTTATCCAGGTTGACCTCGGA
TCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAA

F13 (486 βόσεις)

GGATGTTTATAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCTGCCTTCGGG
CGGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTGCGTAACTTTGCAGTCTGAGTAACTTA
ATTAATAAATTAACCTTTTAAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGC
AGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC
GCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACACTC
AAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGTCCGCCGCGTGCCTCAAATCGACCGGCTGGG
TCTTCTGTCCCCTAAGCGTTGTGGAACTATTCGCTAAAGGGTGTTCGGGAGGCTACGC
CGTAAACAACCCCATTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACT
TAAGCATATCAT

F14 (484 βόσεις)

CGGCGGGCCCCGCCTTAACTGGCCGCCGGGGGGCTTACGCCCCCGGGCCCCGCGCCCCGCC
AAGACACCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGAATAAATAAATTTAA
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT
ACGTAATGTGAATTGCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCC
CTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTG
TGTTGGGCCCCGTCCTCCGATCCCGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGC
GTCCGGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTG
CCGATCAACCCAAATTTTTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAA
CTTAAGCATATC

F15 (658 βόσεις)

CAAGGCGGGCTGGCTCTCTCCCGGGAGGACTGGCCCTGCTGAATTATTCACCCGTGTCT
TTTGCGTACTTCTTGTTCCTGGGCGGGCTCGCCCGCCACCAGGACCCCCCATAAACCT
TTTGCAATGGCAATCAGCGTCAGTAAAATATAATCATTACAACCTTTCAACAACGGATCT
CTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGA
ATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCAT
GCCTGTTGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTGTCTCC
GGCTTGCCTGGAGACTCGCCTTAAAGTGATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGC
AGCACAAGTCGCGCTCTCTCCAGCCAAGGTCAGCGTCCACCAAGCCACCTTTTTTACCT
TTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
AAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACA GCTCAAATT
TGAAATCTGGCTCTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCGCTTTGGCTTTGGCA
CGGTC

F16 (503 βόσεις)

GTCTCTATACACTGTTGCTTTGGCGGGCCACCAGGGGCCACCTGGTCGCCGGGGGACG
CAGTCCCCGGCCCCGCGCCCCGCCGAAGCGCGCTGTGAACCCTGATGAAGATGGGCTGT
CTGAGTACGATGAAAATTGTCAAAACCTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGA
TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCGTAATCATCG
AATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTC

ATTTCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTGTGGTCCCCCGGGGACCTGCCCGA
AAGGCAGCGGCGACGTCCGTCTGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTCTGTCACTCGCTCGGG
AAGGACCTGCGGGGGTTGGTCACCACCACATTTTACCACGGTTGACCTCGGATCAGGTA
GGAGTTACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATA

F17 (719 βάσεις)

ACGAGTTGTAGCTGGCCTTCCGAGGCATGTGCACGCTCTGCTCATCCACTCTACCCCTGT
GCACTTACTGTAGGTTGGCGTGGGCTCCTTAACGGGAGCATTCTGCCGGCCTATGTATA
CTACAAACACTTTAAAGTATCAGAATGTAAACGCGTCTAACGCATCTATAATACTAACTT
TTAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCCTCCTTGGT
ATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTGATGTCATGGAATTCTCAACTTATAAATCCTTGTGAT
CTATAAGCTTGGACTTGGAGGCTTGTGGCCCTCGTTGGTCCGGCTCCTTGAATGCATT
AGCTCGATTCCGTACGGATCGGCTCTCAGTGTGATAATTGTCTACGCTGTGACCGTGAA
GTGTTTTGGCGAGCTTCTAACCGTCCATTAGGACAACCTTTTTAACATCTGACCTCAAATC
AGGTAGGACTACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTAACA
AGGATCCCCTAGTAACTGCGAGTGAAGCGGAAAAGCTCAAATTTAAAATCTGGCGGT
CTTTGGCCGTCCGAGTTGTAGTCTGGAGAAGCGTCTCCGCGTTGGACCGTGTACAAGT
CTCTTGG

Χειρόγραφο 1

E2 (730 βάσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGCCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGTGAA
TTATTCACCCTTGTCTTTTGCCTACTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGTCTCTAGCTTGTGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTGCCTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGAACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGCTTTGGCAGCGG

E3 (730 βάσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGCCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGTGAA
TTATTCACCCTTGTCTTTTGCCTACTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGTCTCTAGCTTGTGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTGCCTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGAACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGCTTTGGCAGCGG

E4 (729 βάσεις)

GGATTCTCACCTCTATGACGTCCCGTTCAGGGCACTTAGATGGGGACCGCTCCCGAA
GCATCCTCTACAAATTACAATGCGGACCCCGAAGGAGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCT
TGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGGGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGA
TATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGGATAAAAATTTG
GGTTGATCGGCAAGCGCCGGCCGGCCCTACAGAGCGGGTGACAAAAGCCCCATACGCTC

GAGGACCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCGTCCCCGGGATCGGAGGAC
GGGGCCCAACACACAAGCCGTGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCC
CCCGAATACCAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTTGCA
ATTCACATTACGTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCG
TTGTTGAAAGTTTTAAATAATTTATATTTTCACTCAGACTACAATCTTCAGACAGAGTTC
GAGGGTGTCTTCGGCGGGCGCGGGCCCCGGGGCGTAAGCCCCCGGGCGGCCAGTTAAG
GCGGGCCCCGCGAAGCAACAAGGTAATAAACACGGGTGGGAGGTTGGACCCAGAG
GGCCCTCACTCGGTAATGATCCT

E5 (762 βάσεις)

GGATTCTCACCCTCTATGACGTCCTGTGACGGAACCTGGACCGCTGCCAAAGCCAAAGC
GCCCTCTGCAAATTACAACCTCGGACTCTAGAAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGTTG
CCGCTTCACTCGCCGTTACTAGGGCAATCCCTGTTGGTTCTTTTCTCCGCTTATTGATA
TGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAGTTGAAAAAAGGCTT
AATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGCAGCTTGTGCTGCGCTCCGAAACCAGT
AGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGCC
AACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAAT
ACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACA
CTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGA
AAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACA AAAGGTTTATGTTTGT
CCTAGTGGTGGGCGAACCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAGACAAGGGTGAAT
AATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATGAT
CCCTCCGAGGTTACCTACGGAGACCTTGTTACGACTTTTACTTCTCTAAA

E7 (725 βάσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGTCTTTTGCCTACTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTGTAAATGTAATCAGCGTCAGTAACAATTAATAATTACAACCTT
CAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTTAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGCTTTGGC

E8 (711 βάσεις)

CTCACCTCTATGACGTCCTGTTCAWAGGAACCTGGACCGCTGCCAAAGCCAAAGCGCC
CTCTGCAAATTACAACCTCGGACTCTAAAAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGTTGCCG
CTTCACTCGCCGTTACTAGGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGATATGC
TTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAGTTGAAAAAAGGCTTAAT
GGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGCAGCTTGTGCTGCGCTCCGAAACCAGTAGG
CCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGCCCAAC
ACCGAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAATACC
AAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTA
CTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAG
TTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTTTGTCT
AGTGGTGGGCGAACCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAGACAAGGGTGAATAA
TTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATGATCCC
TC

E9 (726 βάσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTACAGCCTTGCTGAA

TTATTCACCCTTGTCTTTTGCCTACTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAGCAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGCTTTGGCA

E10 (731 βάσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTACAGCCTTGTGAA
TTATTCACCCTTGTCTTTTGCCTACTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAACAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCA
ACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCGC
TTTGGCTTTGGCAGCGGTC

E11 (730 βάσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTACAGCCTTGTGAA
TTATTCACCCTTGTCTTTTGCCTACTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAACAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGAGAACTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGCTTTGGTAGCGG

E12 (719 βάσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTACAGCCTTGTGAA
TTATTCACCCTTGTCTTTTGCCTACTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAACAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGC

F1 (719 βάσεις)

GGATTCTCACCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACCTGGACCGCTGCCAAAGCCAAA
GCGCCCTCTGCAAATTACAACCTCGGACTCTAAAAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGT
TGCCGCTTCACTCGCCGTTACTAGGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGA
TATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAAAGTTGAAAAAAGGC
TTAATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGCAGCTTGTGCTGCGCTCCGAAACCA
GTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGC
CCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGA
ATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCA
CACTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTT
GAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGTTTATGTTT
GTCCTAGTGGTGGGCGAACCCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAGACAAGGGTGA
ATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATG
ATCCCTCCGC

F2 (715 βάσεις)

GGATTCTCACCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACCTGGACCGCTGCCAAAGCCAAA
GCGCCCTCTGCAAATTACAACCTCGGACTCTAAAAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGT
TGCCGCTTCACTCGCCGTTACTAGGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTCTCCGCTTATTGA
TATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAAAGTTGAAAGAAAGGC
TTAATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGCAGCTTGTGCTGCGCTCCGAAACCA
GTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGC
CCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGA
ATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCA
CACTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTT
GAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGTTTATGTTT
GTCCTAGTGGTGGGCGAACCCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAGACGAGGGTGA
ATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATG
ATCCCT

F3 (753 βάσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGTCTTTTGCCTACTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTGAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGCTTTGGCAGCGGTCCAAGTTCCTTGGAACAGGACG

F4 (739 βάσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGTCTTTTGCCTACTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTGAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC

AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGCTTTGGCAGCGGTCCAAGTTC

F5 (767 βάσεις)

ATTCTCACCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACCTGGACCGCTGCCAAAGCCAAAGC
GCCCTCTGCAAATTAACAATCGGACTCTAAAAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGTTG
CCGCTTCACTCGCCGTTACTAGGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCTCCGCTTATTGATA
TGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAGTTGAAAAAAGGCTT
AATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGGACTTGTGCTGCGCTCCGAAACCAGT
AGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGCC
AACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAAT
ACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACA
CTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGA
AAGTTGTAATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTTTGT
CCTAGTGGTGGGCGAACCCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAGACAAGGGTGAAT
AATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATGAT
CCCTCCGAGGTTACCTACGGAGACCTTGTTACGACTTTTACTTCTCTAAATGACC

F6 (730 βάσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGCTTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAAACCTTTTGAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGGATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGCTTTGGCAGCGG

F8 (739 βάσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGCTTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAAACCTTTTGAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGCTTTGGCAGCGGTCCAAGTTC

F9 (719 βάσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGCTTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAAACCTTTTGAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG

GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGC

F10 (716 βάσεις)

GGATTCTCACCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACTTGGACCGCTGCCAAAGCCAAA
GCGCCCTCTGCAAATTACAACCTCGGACTCTAAAAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGT
TGCCGCTTCACTCGCCGTTACTAGGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGA
TATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAGTTGAAAAAAGGC
TTAATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGCGACTTGTGCTGCGCTCCGAAACCA
GTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGC
CCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGA
ATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCA
CACTACTTATCGCATTTGCTGCGTCTTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTT
GAAAGTTGTAATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTTT
GTCCTAGTGGTGGGCGAACCCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAGACAAGGGTGA
ATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATG
ATCCCTC

F11 (708 βάσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGCTTTTGCCTACTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTGAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAG

F12 (729 βάσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGCTTTTGCCTACTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTGAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCAATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAC
AGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCGCTT
GGCTTTGGCAGCGGT

G1 (720 βάσεις)

GGATTCTCACCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACTTGGACCGCTGCCAAAGTCAA
GCGCCCTCTGCAAATTACAACCTCGGACTCTAAAAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGT
TGCCGCTCACTCGCCGTTACTAGGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGA
TATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAGTTGAAAAAAGGC
TTAATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGCGACTTGTGCTGCGCTCCGAAACCA
GTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGC

CCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGA
ATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCA
CACTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCCTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTT
GAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTTT
GTCCTAGTGGTGGGCGAACCCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAAGACAAGGGTGA
ATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATGA
TCCCTCCGCAG

G2 (730 βύσεις)

GGATTCTCACCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACCTGGACCGCTGCCAAAGCCAAA
GCGCCCTCTGCAAATTACAACTCGGACTCTAAAAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGT
TGCCGCTTCACTCGCCGTTACTAGGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGA
TATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAGTTGAAAAAAGGC
TTAATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGCAGCTTGTGCTGCGCTCCGAAACCA
GTAGGCCGCTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGC
CCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGA
ATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCA
CACTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCCTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTT
GAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTTT
GTCCTAGTGGTGGGCGAACCCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAAGACAAGGGTGA
ATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATG
ATCCCTCCGCAGGTTACCTA

G3 (748 βύσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGCTTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGCTTTGGCAGCGGTCCAAGTTCCTTGAACA

G4 (741 βύσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGCTTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTTGATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCGGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGCTTTGGCAGCGGTCCAAGTTCCT

G5 (790 βύσεις)

GGATTCTCACCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACCTGGACCGCTGCCAAAGCCAAA
GCGCCCTCTGCAAATTACAACTCGGACTCTAAAAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGT
TGCCGCTTCACTCGCCGTTACTAGGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGA

TATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAAGTTGAAAAAAGGC
TTAATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGC GACTTGTGCTGCGCTCCGAAACCA
GTAGGCCGGCTGCCAATTACCTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGC
CCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGA
ATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTC AAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCA
CACTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCCTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTT
GAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTTT
GTCCTAGTGGTGGGCGAACCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAAGACAAGGGTGA
ATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATCTGTGTAATG
ATCCCTCCGCAGGTTACCTACGGAGACCTTGTTACGACTTTTACTTCCTCTAAATGACC
AAGAATCACTAGTGAATTCGC

G6 (728 βύσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGCTTTTTGCGTACTTCTTGTTCCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGATGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGTAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGCGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGCTTTGGCAGC

G8 (720 βύσεις)

GGATTCTCACCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACCTGGACCGCTGCCAAAGCCAAA
GCGCCCTCTGCAAATTACAACCTCGGACTCTAAAAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGT
TGCCGCTTCACTCGCCGTTACTAGGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGA
TATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAAGTTGAAAAAAGGC
TTAATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGC GACTTGTGCTGCGCTCCGAAACCA
GTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGC
CCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGA
ATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTC AAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCA
CACTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCCTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTT
GAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTTT
GTCCTAGTGGTGGGCGAACCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAAGACAAGGGTGA
ATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATG
ATCCCTCCGCA

G9 (719 βύσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGCTTTTTGCGTACTTCTTGTTCCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGCGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGC

G10 (737 βάσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGTCTTTTGCCTACTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGCTTTGGCAGCGGTCCAAGT

G11 (719 βάσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTCGCTGAA
TTATTCACCCTTGTCTTTTGCCTACTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTGTAGTTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCACCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGATCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGC

G12 (719 βάσεις)

GGATTCTCACCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACCTGGACCGCTGCCAAAGCCAAA
GCGCCCTCTGCAAATTACAACCTCGGACTCTAAAAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGT
TGCCGCTTCACTCGCCGTTACTAGGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGA
TATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAAAGTTGAAAAAAGGC
TTAATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGCAGCTTGTGCTGCGCTCCGAAACCA
GTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGC
CCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGA
ATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCA
CACTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCCTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTT
GAAAGTTGTAATTAATAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTTT
GTCCTAGTGGTGGGCGAACCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAAAGACAAGGGTGA
ATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATG
ATCCCTCCGC

H1 (747 βάσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGTCTTTTGCCTACTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTGTCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC

AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGCTTTGGCAGCGGTCCAAGTTCCTTGAAC

H2 (738 βύσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGCTTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGCTTTGGCAGCGGTCCAAGTT

H3 (740 βύσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGCTTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
TTTGGCTTTGGCAGCGGTCCAAGTTCCT

H4 (742 βύσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGCTTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTCGGCTTTGGCAGCGGTCCAAGTTCCT

H5 (729 βύσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGCTTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT

ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGCTTTGGCAGCG

H6 (729 βύσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGTCTTTTTCGCTACTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGCTTTGGCAGCG

H7 (730 βύσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGAAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGTCTTTTTCGCTACTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGCTTTGGCAGCG

H8 (728 βύσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGTCTTTTTCGCTACTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGCTTTGGCAGCG

H9 (728 βύσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGTCTTTTTCGCTACTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA

CAAACATAAACCTTTTGTAAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGCTTTGGCAGC

H10 (707 βάσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTACAGCCTTGTGAA
TTATTCACCCTTGTCTTTTGCCTACTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTGTAAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTCAACTTTTGACCTCAGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGA

H11 (727 βάσεις)

GGATTCTCACCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACCTGGACCGCTGCCAAAGCCAAA
GCGCCCTCTGCAAATTACAACCTCGGACTCTAAAAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGT
TGCCGCTTCACTCGCCGTTACTAGGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGA
TATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAGTTGAAAAAAGGC
TTAATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGCAGCTTGTGCTGCGCTCCGAAACCA
GTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGC
CCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGA
ATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCA
CACTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTCTTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTT
GAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTTT
GTCCTAGTGGTGGGCGAACCCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAGACAAGGGTGA
ATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATG
ATCCCTCCGCAGGTTTAC

H12 (719 βάσεις)

GGATTCTCACCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACCTGGACCGCTGCCAAAGCCAAA
GCGCCCTCTGCAAATTACAACCTCGGACTCTAAAAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGT
TGCCGCTTCACTCGCCGTTACTAGGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGA
TATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAGTTGAAAAAAGGC
TTAATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGCAGCTTGTGCTGCGCTCCGAAACCA
GTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGC
CCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGA
ATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCA
CACTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTCTTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTT
GAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTTT
GTCCTAGTGGTGGGCGAACCCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAGACAAGGGTGA
ATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATG
ATCCCTCCGC

Χειρόγραφο 4

A1 (736 βύσεις)

GGATTCTCACCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACCTGGACCGCTGCCAAAGCCAAA
GCGCCCTCTGCAAATTACAACTCGGACTCTAAAAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGT
TGCCGCTTCACTCGCCGTTACTAGGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCTCCGCTTATTGA
TATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAAAGTTGAAAAAAGGC
TTAATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGC GACTTGTGCTGCGCTCCGAAACCA
GTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGC
CCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGA
ATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCA
CACTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTT
GAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTTT
GTCCTAGTGGTGGGCGAACCCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAGACAAGGGTGA
ATAATTCAGCAASGGCTGTAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATG
ATCCCTCCGCAGGTTACCTACGGAG

A4 (732 βύσεις)

GGATTCTCACCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACCTGGACCGCTGCCAAAGCCAAA
GCGCCCTCTGCAAATTACAACTCGGACTCTAAAAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGT
TGCCGCTTCACTCGCCGTTACTAGGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCTCCGCTTATTGA
TATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAAAGTTGAAAAAAGGC
TTAATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGC GACTTGTGCTGCGCTCCGAAACCA
GTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGC
CCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGA
ATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCA
CACTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTT
GAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTTT
GTCCTAGTGGTGGGCGAACCCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAGACAAGGGTGA
ATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATG
ATCCCTCCGCAGGTTACCTACG

A5 (788 βύσεις)

GGATTCTCACCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACCTGGACCGCTGCCAAAGCCAAA
GCGCCCTCTGCAAATTACAACTCGGACTCTAAAAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGT
TGCCGCTTCACTCGCCGTTACTAGGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCTCCGCTTATTGA
TATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAAAGTTGAAAAAAGGC
TTAATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGC GACTTGTGCTGCGCTCCGAAACCA
GTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGC
CCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGA
ATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCA
CACTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTT
GAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTTT
GTCCTAGTGGTGGGCGAACCCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAGACAAGGGTGA
ATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATG
ATCCCTCCGCAGGTTACCTACGGAGACCTTGTACGACTTTTACTTCCTCTA AATGACC
AAGAATCACTAGTGAATTC

A6 (780 βύσεις)

GGATTCTCACCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACCTGGACCGCTGCCAAAGCCAAA
GCGCCCTCTGCAAATTACAACTCGGACTCTAAAAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGT
TGCCGCTTCACTCGCCGTTACTAGGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCTCCGCTTATTGA
TATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAAAGTTGAAAAAAGGC
TTAATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGC GACTTGTGCTGCGCTCCGAAACCA
GTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGC
CCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGA
ATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCA

CACTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTT
GAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTTT
GTCCTAGTGGTGGGCGAACCCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAAAGACAAGGGTGA
ATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATG
ATCCCTCCGCAGGTTACCTACGGAGACCTTGTTACGACTTTTACTTCCTCTAAATGACC
AAGAATCACTA

A7 (746 βύσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGCTTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GCTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGKTTGTAATTTGCAGAGGGC
GCTTTGGCTTTGGCAGCGGTCCAAGTTCCCTTGGGA

A8 (719 βύσεις)

GGATTCTACCCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGACAAGAGCCATTACCAA
GTAGCCATCTTCAAATTACAACCTCGGCTTACGCAGATTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCT
TCACTCGCCGTTACTGAGGCAATCCCGGTTGGTTTCTTTTCCCTCCGCTTATTGATATGCTT
AAGTTCAGCGGGTAGTCTACCTGATTTGAGGTCAAACCTTGTAGATTAGTATAACGAGT
TGGTAAAACCTAATAGTTATGCTTTTTCATGTTTTTCAAGTAAACCGAGTATCACTCAACG
CCAAACCAGAGGTTTGAGGGAGAAATGACGCTCAAACAGGCATGCCCTGTGGAATACC
ACAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACGAAAATCTGCAATTCATATTA
CGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGGAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAA
GTTTTGATATTTTTATTTGTTGACTAAGTAAATTAATTAGTGTCTTGCAAGCAAGTTCTCT
AAAAAAACATGTGTAATGCAATTAAGCAAACCTTAAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTA
CGGAAACCTTGTACGACTTTTACTTCCTCTAAATGACCAAGAATCACTAGTGAATTCG
GGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAG
TATTC

A9 (733 βύσεις)

CTTGGGCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGA
GGGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTACAGCCTTGCTGA
ATTATTCACCCTTGCTTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGG
ACAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACA
TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT
AGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTG
GTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGT
GGGCGTCTTGCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTAC
TGGTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTA
GCCTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATAT
CAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCG
GCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGG
CGCTTTGGCTTTGGCAGCGGTCC

A10 (736 βύσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGCTTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT

TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTG
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGCGCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGTA
ACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCGC
TTTGGCTTTGGCAGCGGTCCAAG

A11 (730 βάσεις)

GGATTCTCACCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACCTGGACCGCTGCCAAAGCCAAA
GCGCCCTCTGCAAATTACAACCTCGGACTCTAAAAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGT
TGCCGCTTCACTCGCCGTTACTAGGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGA
TATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAGTTGAAAAAAAGGC
TTAATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGCGACTTGTGCTGCGCTCCGAAACCA
GTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGC
CCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGA
ATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCA
CACTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCCTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTT
GAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGTTTATGTTT
GTCCTAGTGGTGGGCGAACCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAAGACAAGGGTGA
ATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATG
ATCCCTCCGCAGGTTACCTA

A12 (750 βάσεις)

GGATTCTCACCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACCTGGACCGCTGCCAAAGCCAAA
GCGCCCTCTGCAAATTACAACCTCGGACTCTAAAAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGT
TGCCGCTTCACTCGCCGTTACTAGGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGA
TATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAGTTGAAAAAAAGGC
TTAATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGCGACTTGTGCTGCGCTCCGAAACCA
GTAGGCCGGCTGCCAACTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGC
CCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGA
ATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCA
CACTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCCTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTT
GAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGTTTATGTCT
GTCCTAGTGGTGGGCGAACCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAAGACAAGGGTGA
ATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATG
ATCCCTCCGCAGGTTACCTACGGAGACCTTGTTACGACTT

B2 (727 βάσεις)

CGATTCTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTG
CGGAGGGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTG
CTGAATTATTACCCCTTGTCTTTTTCGTAATCTTCTGTTTCCCTTGGTGGGTTTCGCCACCAC
TAGGACAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTAC
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT
AAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC
TTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGG
TGTTGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGC
CTACTGGCTTCGGAGCGCAGCACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCA
TTAAGCCTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGC
ATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAA
GCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGA
GGGCGCTTTGGCTTT

B3 (742 βύσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGTCTTTTGCCTACTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGG
CAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGG
CGCTTTGGCTTTGGCAGCGGTCCAAGTTCC

B4 (785 βύσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGTCTTTTGCCTACTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGCTTTGGCAGCGGTCCAAGTTCTTGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATC
CAATCACTAGTGAA

B5 (730 βύσεις)

GGATTCTCACCTCTATGACGTCCCGTTCCAGGGCACTTAGATAGGGACCGCTCCCGAA
GCATCCTCTACAAATTACAATGCGGACCCCGAAGGAGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCT
TGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGGGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGA
TATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGGATAAAAAATTTG
GGTTGATCGGCAAGCGCCGGCCGGCCTACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTC
GAGGACCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCTTTCGGGCCCCGTCCCCCGGGATCGGAGGAC
GGGGCCCAACACACAAGCCGTGCTTGAGGGCAGAAATGACGCTCGGACAGGCATGCC
CCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATTTGCA
ATTCACATTACGTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCG
TTGTTGAAAGTTTTAAATAATTTATATTTTCACTCAGACTACAATCTTCAGACAGAGTTC
GAGGGTGTCTTCGGCGGGCGCGGGCCCCGGGGCGTAAGCCCCCGGCGGCCAGTTAAG
GCGGGCCCCCGAAGCAACAAGGTAAAATAAACACGGGTGGGAGGTTGGACCCAGAG
GGCCCTCACTCGGTAATGATCCTT

B6 (757 βύσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGTCTTTTGCCTACTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCA

GCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAGCCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGCTT

C5 (757 βύσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGTCTTTTGCCTACTTCTTGTTCCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGCTTTGGCAGCGGTCCAAGTTCCTTGAACAGGACGTCAT

C6 (731 βύσεις)

GGATTCTACCCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACCTGGACCGCTGCCAAAGCCAAA
GCGCCCTCTGCAAATTACAACCTCGGACTCTAAAAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGT
TGCCGCTTCACTCGCCGTTACTAGGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGA
TATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAGTTGAAAAAAGGC
TTAATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGCAGCTTGTGCTGCGCTCCGAAACCA
GTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGC
CCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGA
ATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCA
CACTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTCTTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTT
GAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGTTTGTGTTT
GTCCTAGTGGTGGGGCGAACCCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAGACAAGGGTG
AATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAAT
GATCCCTCCGAGGTTACCTA

C7 (712 βύσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGTCTTTTGCCTACTTCTTGTTCCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGTTAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATC
AATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGG
CAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGC

C8 (757 βύσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGTCTTTTGCCTACTTCTTGTTCCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGTTAAGTA

GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGCTTTGGCAGCGGTCCAAGTTCCTTGGAACAGGACGTCAT

C9 (735 βύσεις)

GGATTCTCACCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACCTGGACCGCTGCCAAAGCCAAA
GCGCCCTCTGCAAATTACAACTCGGACTCTAAAAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGT
TGCCGCTTCACTCGCCGTTACTAGGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGA
TATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAGTTGAAAAAAGGC
TTAATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGCAGCTTGTGCTGCGCTCCGAAACCA
GTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGC
CCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGA
ATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCA
CACTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCCTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCTGTTGTT
GAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTTT
GTCCTAGTGGTGGGCGAACCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAGACAAGGGTGA
ATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATG
ATCCCTCCGCAGGTTACCTACGGAG

C11 (742 βύσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGTCTTTTTCGCTACTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTTGGCCACCCTAGGA
CAGACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCGACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTATGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGCTTTGGCAGCGGTCCAAGTTCCTT

C12 (783 βύσεις)

GGATTCTCACCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACCTGGACCGCTGCCAAAGCCAAA
GCGCCCTCTGCAAATTACAACTCGGACTCTAAAAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGT
TGCCGCTTCACTCGCCGTTACTAGGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGA
TATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAGTTGAAAAAAGGC
TTAATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGCAGCTTGTGCTGCGCTCCGAAACCA
GTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGC
CCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGA
ATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCA
CACTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCCTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTT
GAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTTT
GTCCTAGTGGTGGGCGAACCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAGACAAGGGTGA
ATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATG
ATCCCTCCGCAGGTTACCTACGGAGACCTTGTACGACTTTTACTTCCTCTAAATGACC
AAGAATCACTAGTG

D1 (733 βύσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCATAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGTCTTTTGCCTACTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGCTTTGGCAGCGGTCC

D2 (783 βύσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGTCTTTTGCCTACTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGCTTTGGCAGCGGTCCAAGTTCCTTGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATC
CAATCACTAGTG

D3 (701 βύσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGTCTTTTGCCTACTTCTTGTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG

D4 (756 βύσεις)

GGATTCTACCCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAAGTGGACCGCTGCCAAAGCCAAA
GCGCCCTCTGCAAATTACAACCTCGGACTCTAAAAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGT
TGCCGCTTCACTCGCCGTTACTAGGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGA
TATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAGTTGAAAAAAGGC
TTAATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGGCACTTGTGCTGCGCTCCGAAACCA
GTAGGCCGGCTGCCAATTAATTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGC
CCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGA
ATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTTCTGCAATTC
CACTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTT
GAAAGTTGTAATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTTT
GTCTAGTGGTGGGCGAACCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAGACAAGGGTGA

ATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGTAATG
ATCCCTCCGCAGGTTACCTACGGAGACCTTGTTACGACTTTTACTT

D7 (726 βάσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTCTCCGTAGGTGAATCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGCTTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCAGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT
AGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGCGCCCTTGT
GTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGT
GGGCGTCTTGCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTAC
TGGTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAA
GCCTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATAT
CAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCG
GCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGG
CGCTTTGGCTTTGGCA

D9 (758 βάσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGCTTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGCGCCCTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGCTTTGGCAGCGGTCCAAGTTCCTTGGAACAGGACGTCATA

D10 (747 βάσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGCTTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTCGCGCCCTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTGGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGACTTTGGCAGCGGTCCAAGTTCCTTGGAAC

D11 (789 βάσεις)

GGATTCTCACCCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACCTGGACCGCTGCCAAAGCCAAA
GCGCCCTCTGCAAATTACAACCTCGGACTCTAAAAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTGT
TGCCGCTTCACTCGCCGTTACTAGGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGA
TATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAGTTGAAAAAAGGC
TTAATGGATGCTAGACCTTTGCTGATAGAGAGTGCAGCTTGTGCTGCGCTCCGAAACCA
GTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGAGACAAGACGC
CCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGA
ATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCA

CACTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTT
GAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTTT
GTCCTAGTGGTAGGCGAACCCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAAAGACAAGGGTGA
ATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCGTATTTGTGTAATG
ATCCCTCCGCAGGTTACCTACGGGGACCTTGTTACGACTTTTACTTCCTCTAAATGACC
AAGAATCACTAGTGAATTCG

E2 (728 βύσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCACCGTAGGTGAACCTGCGGA
GGGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGTTACAGCCTTGCTGA
ATTATTCACCCTTGCTTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGG
ACAAACATAAACCTTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACT
TTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT
AGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTG
GTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGT
GGGCGTCTTGCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTAC
TGGTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAA
GCCTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATAT
CAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCG
GCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGG
CGCTTTGGCTTTGGCAGC

E4 (790 βύσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCCCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGTTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGCTTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGCTTTGGCAGCGGTCCAAGTTCCTTGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATC
CAATCACTAGTGAATTCGC

E5 (790 βύσεις)

CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG
GGATCGTTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGTTACAGCCTTGCTGAA
TTATTCACCCTTGCTTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGA
CAAACATAAACCTTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCT
TCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA
GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTG
GTTTCGGAGCGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAAGC
CTTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCA
ATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGC
AACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGGCG
CTTTGGCTTTGGCAGCGGTCCAAGTTCCTTGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATC
CAATCACTAGTGAATTCGC

Σημείωση: Κατά την ανάγνωση των αλληλουχιών με τη βοήθεια χρωμογραφήματος μέσω του προγράμματος Sequence Scanner της Applied Biosystems παρατηρήθηκαν ασάφειες-ambiguities. Αναλύοντας τις αλληλουχίες με το εργαλείο βιοπληροφορικής, το BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) , συγκρίνοντας με τις ομόλογες αλληλουχίες και με τη βοήθεια του πίνακα Fasta DNA Codes βρέθηκε σε ποιες βάσεις αντιστοιχούν οι ασάφειες.

Code	Meaning	Etymology	Complement	Opposite
A	A	Adenosine	T	B
T/U	T	Thymidine/Uridine	A	V
G	G	Guanine	C	H
C	C	Cytidine	G	D
K	G or T	Keto	M	M
M	A or C	Amino	K	K
R	A or G	Purine	Y	Y
Y	C or T	Pyrimidine	R	R
S	C or G	Strong	S	W
W	A or T	Weak	W	S
B	C or G or T	not A (B comes after A)	V	A
V	A or C or G	not T/U (V comes after U)	B	T/U
H	A or C or T	not G (H comes after G)	D	G
D	A or G or T	not C (D comes after C)	H	C
X/N	G or A or T or C	any	N	.
.	not G or A or T or C		.	N
-	gap of indeterminate length			