

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**



**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΗΜΙΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΩΝ
ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑ ΞΥΛΟΥ ΤΟΥ ΑΠΟΛΙΘΩΜΕΝΟΥ ΔΑΣΟΥΣ
Bükkabrány.**



**ΒΑΧΤΣΙΟΛΗ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ
ΛΑΡΙΣΑ 2018**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΗΜΙΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΩΝ
ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑ ΞΥΛΟΥ ΤΟΥ ΑΠΟΛΙΘΩΜΕΝΟΥ ΔΑΣΟΥΣ
Bükkabrány.**

**STUDY OF DIVERSITY OF HEMICELLULASES GENES FROM
WOOD SAMPLE FROM Bükkabrány FOSSILIZED FOREST.**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΗΜΙΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΩΝ
ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑ ΞΥΛΟΥ ΤΟΥ ΑΠΟΛΙΘΩΜΕΝΟΥ ΔΑΣΟΥΣ
Bükkabrány.**

**ΟΝΟΜΑ: ΒΑΧΤΣΙΟΛΗ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΜΟΣΙΑΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΙΟΛΟΓΙΑΣ**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΜΟΣΙΑΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ, ΕΛΛΑΔΑ

ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ
ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ,
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ,
ΕΛΛΑΔΑ

ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ ΓΡΗΓΟΡΙΟΣ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ
ΣΤΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ,
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΛΑΡΙΣΑ,
ΕΛΛΑΔΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ		
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ		6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ		7
ABSTRACT		8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ		
1.1	Μικροβιακή αλλοίωση ξύλου	9
1.1.1	Κατηγορίες μυκήτων που αλλοιώνουν το ξύλο	10
1.1.2	Κατηγορίες βακτηρίων που αλλοιώνουν το ξύλο	15
1.1.3	Ημικυτταρίνη και Ημικυτταρινάσες	18
1.1.4	Παράγοντες που επηρεάζουν την αλλοίωση του ξύλου	19
1.1.5	Διαδικασίες συντήρησης αρχαιολογικών ή ιστορικών ξύλινων ευρημάτων	22
1.2	Απομόνωση DNA από δείγμα ξύλου και μελέτη ποικιλότητας μικροβιακών κοινοτήτων	23
1.3	Μελέτη του απολιθωμένου δάσους στο Bückabrány (Ουγγαρία)	24
2. ΣΚΟΠΟΣ		28
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ		
3.1	Κονιορτοποίηση ξύλου	29
3.2	Απομόνωση DNA	29
3.3	2 ^η Κονιορτοποίηση ξύλου	30
3.4	2 ^η Απομόνωση DNA	31
3.5	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR	36
3.5.1	Touchdown PCR	36

3.5.2	Εκφυλισμένοι Εκκινητές	37
3.6	Ενίσχυση γονιδίων ημικυτταρινάσης με Touchdown PCR	37
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ		
4.1	Ηλεκτροφόρηση	46
4.1.1	Αποτελέσματα ηλεκτροφορήσεων μετά από απομόνωση DNA	46
4.1.2	Αποτελέσματα ηλεκτροφορήσεων μετά από Touchdown PCR	49
4.2	Φασματοφωτομετρική Ανάλυση	51
4.2.1	Φασματοφωτομετρική Ανάλυση μετά από απομόνωση DNA	51
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ		53
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ		54

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του επίκουρου καθηγητή κ. Μόσιαλου Δημήτρη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Μόσιαλο Δημήτρη για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας μου. Η επιστημονική του κατάρτιση, οι συμβουλές του και η υπομονή του με βοήθησαν να ολοκληρώσω όλες τις πειραματικές διαδικασίες. Θα ήθελα επίσης να τον ευχαριστήσω για όλες τις ευκαιρίες που μου έδωσε, καθώς και για την αδιάκοπη καθοδήγησή του, που υπήρξαν καταλυτικοί παράγοντες για την άψογη συνεργασία μας και μου έδωσαν όλα τα απαραίτητα εφόδια για να συνεχίσω. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μαρκουλάτο και τον κ. Αμούτζια για την συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλη την εργαστηριακή ομάδα για την πολύτιμη βοήθειά της και την άψογη συνεργασία μας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το αρχαιότερο παλαιοντολογικό δάσος του κόσμου βρίσκεται στο Bökkåbråny της Ουγγαρίας. Πριν από περίπου 7 εκατομμύρια χρόνια έλαβε χώρα μια ξαφνική και γρήγορη ιζηματοπόθεση άμμου μέσω των δέλτα παρακείμενων ποταμών με αποτέλεσμα το επίπεδο της λίμνης Rannoch να ανέβει και να υπερκαλύψει το δάσος του Bökkåbråny. Δημιουργήθηκε έτσι ένα ανοξικό περιβάλλον που βοήθησε στη διατήρηση του οργανικού τμήματος των κορμών των δέντρων ως τις μέρες μας. Πήραμε δείγμα ξύλου από τους κορμούς του συγκεκριμένου δάσους, προχωρήσαμε σε κονιορτοποίηση του δείγματος ξύλου, ενίσχυση των δειγμάτων με τη βοήθεια Touchdown PCR και προσπάθεια απομόνωσης του DNA και μελέτη της ποικιλότητας των γονιδίων που κωδικοποιούν ημικυτταρινάσες.

ABSTRACT

The oldest standing paleo-forest in the world is located at Bükkábrány, Hungary. Some 7 million years ago a sudden and rapid sedimentation of sands from a prograding delta resulted in the rise of Lake Pannon that covered the landscape. The produced anoxic burial environment preserved the unmineralised trunks to the present day. We took wood sample from the trunks of this forest, we pulverized this wood sample, we amplified these samples with Touchdown PCR and we tried to extract the DNA and study the diversity of the genes encoding hemicellulases.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μικροβιακή αλλοίωση ξύλου

Το ξύλο είναι ένα σύνθετο, τρισδιάστατο βιοπολυμερές υλικό που τα τοιχώματά του αποτελούνται κυρίως από τα πολυμερή κυτταρίνη, ημικυτταρίνες και λιγνίνη. Τα κυτταρικά του τοιχώματα έχουν ένα εξωτερικό και ένα δευτερογενές εσωτερικό τοίχωμα. Το δευτερογενές τοίχωμα αποτελείται από τρία επίπεδα: τα S1, S2 και S3. Στα φυτά σκληρού ξύλου η περιεκτικότητα σε κυτταρίνη κυμαίνεται από 40% έως 50%, ενώ σε λιγνίνη και ημικυτταρίνη από 15% έως 25%. Αντίθετα, τα φυτά μαλακού ξύλου εμφανίζουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λιγνίνη (περίπου 5-10% περισσότερο σε σχέση με τα φυτά σκληρού ξύλου) ενώ το ποσοστό της κυτταρίνης τους κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα (40-50%) και η ημικυτταρίνη τους είναι πολλές φορές λιγότερη σε σχέση με τα φυτά σκληρού ξύλου. Τα πολυμερή αυτά συγκροτούν την ξυλώδη ύλη του ξύλου και είναι υπεύθυνα για τις περισσότερες φυσικές και χημικές ιδιότητες του.

Το ξύλο εμφανίζει ποικίλα πλεονεκτήματα, για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται σε μια πληθώρα διεργασιών. Μερικά από τα πλεονεκτήματα αυτά είναι τα εξής: είναι σχετικά φθηνό, χρειάζεται λίγη ενέργεια για την κατεργασία του, είναι ανανεώσιμο και παρουσιάζει ικανοποιητική μηχανική αντοχή.

Το ξύλο όμως εμφανίζει και ορισμένα μειονεκτήματα. Μερικά από αυτά είναι: η αλλοίωσή του από βιοτικούς παράγοντες (βακτήρια, μύκητες, έντομα και θαλάσσιους οργανισμούς), οι διαστασιακές του μεταβολές (ρίκνωση και διόγκωση) όταν παίρνει ή χάνει υγρασία και η ιδιότητά του να καίγεται σχετικά εύκολα. Επίσης το ξύλο αλλοιώνεται και όταν εκτεθεί στην επίδραση αβιοτικών παραγόντων όπως π.χ. κλιματικών (νερό, ηλιακό φως, θερμότητα, άνεμος) ή άλλων παραγόντων (μηχανικών, χημικών). Το είδος και ο βαθμός αλλοίωσης του ξύλου εξαρτάται από τις συγκεκριμένες συνθήκες χρησιμοποίησής του, το είδος των παραγόντων αλλοίωσης και τη φυσική αντοχή του ξύλου. Σε συνθήκες όπου δεν δρουν παράγοντες αλλοίωσης, το ξύλο μπορεί να διαρκέσει απεριόριστα, ωστόσο τέτοιες περιπτώσεις σπάνια υπάρχουν στην καθημερινή πρακτική.

Όπως είδαμε λοιπόν παραπάνω, το ξύλο όπως και κάθε άλλη οργανική ύλη αποσυντίθεται μέσα από διάφορες βιολογικές διεργασίες που συμβαίνουν στη φύση. Τα χαρακτηριστικά αυτών των διαδικασιών, καθώς και ο τρόπος με τον οποίο επηρεάζουν το ξύλο είναι από τα κυριότερα θέματα που λαμβάνονται υπόψη, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις που πρόκειται για αρχαιολογικά ή ιστορικά δείγματα ξύλου. Το ξύλο αποτελεί ιδανικό υπόστρωμα για τα ένζυμα που απελευθερώνονται από τους μικροοργανισμούς που το αποικίζουν.

Οι μύκητες και τα έντομα είναι από τους σημαντικότερους παράγοντες αλλοίωσης του ξύλου. Οι οργανισμοί αυτοί προσβάλλουν ζωντανά δέντρα, κορμοτεμάχια που βρίσκονται στο δάσος ή είναι αποθηκευμένα στα εργοστάσια. Κατά κανόνα, ένα υγρό ξύλο πάντα προσβάλλεται από μύκητες ενώ σε περιεχόμενη υγρασία κάτω από 20%, το ξύλο θεωρείται αρκετά ξηρό ώστε να μην μπορούν να δραστηριοποιηθούν οι μύκητες. Επίσης, οι μύκητες χρειάζονται οξυγόνο για την ανάπτυξή τους. Όταν το ξύλο περιέχει πολύ μεγάλες ποσότητες νερού, είναι κάτω από το νερό ή κάτω από υγρό έδαφος, τότε το οξυγόνο περιορίζεται σε επίπεδα κάτω των ελάχιστων ορίων που χρειάζονται για τη δραστηριοποίηση των μυκήτων. Επομένως, σε περιπτώσεις όπου δείγματα ξύλου έρχονται σε άμεση επαφή με το έδαφος αλλά σε υπέργειο επίπεδο, εκεί όπου τα επίπεδα οξυγόνου και υγρασίας είναι βέλτιστα, λαμβάνει χώρα αποικοδόμηση κυρίως από τους μύκητες.

Από την άλλη, στη μικροβιακή αλλοίωση του ξύλου εμπλέκονται και τα βακτήρια. Τα βακτήρια είναι πολύ μικροί οργανισμοί και υπάρχουν σχεδόν παντού σε μεγάλους πληθυσμούς. Ο κίνδυνος αλλοίωσης του ξύλου από τα βακτήρια είναι πολύ μικρός σε σχέση με τους μύκητες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Συγκεκριμένα τα βακτήρια προσβάλλουν το ξύλο μόνο όταν αυτό είναι εξαιρετικά υγρό π.χ. εξαιτίας της μακροχρόνιας παραμονής του στο νερό (ποταμοί, λίμνες, θάλασσα) ή μέσα στο έδαφος. Η παρουσία των βακτηρίων σε αυτές τις υγρές συνθήκες οφείλεται στην ικανότητά τους να αναπτύσσονται με λίγο ή καθόλου οξυγόνο (αναερόβια) ενώ οι μύκητες αδυνατούν να επιβιώσουν σε τέτοια περιβάλλοντα.

Για την αντιμετώπιση όλων αυτών των παραγόντων αλλοίωσης που αναφέρθηκαν παραπάνω και πολύ συχνά συμβάλουν στη μείωση της διάρκειας ζωής του ξύλου, χρησιμοποιείται μια πληθώρα εμποτιστικών χημικών ουσιών οι οποίες εισάγονται μέσα στη μάζα του με διάφορες τεχνικές ή χρησιμοποιείται θερμική τροποποίηση του ξύλου.

1.1.1 Κατηγορίες μυκήτων που αλλοιώνουν το ξύλο

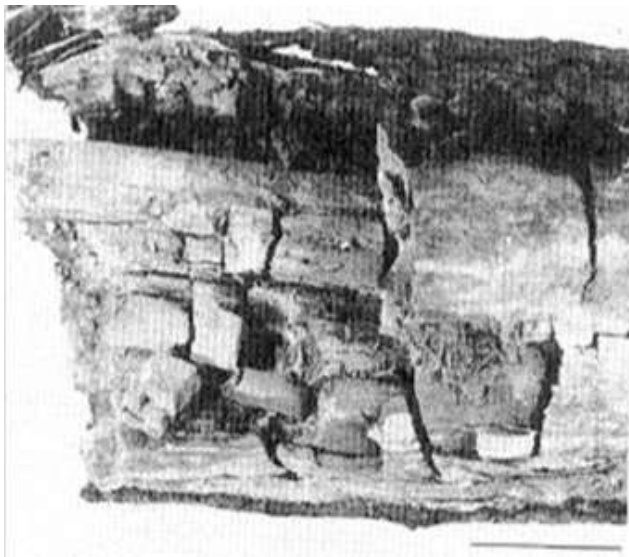
Οι μύκητες είναι φυτικοί οργανισμοί που δεν περιέχουν χλωροφύλλη και γι' αυτόν το λόγο δεν είναι σε θέση να πραγματοποιήσουν φωτοσύνθεση και να τραφούν. Έτσι, προσβάλλουν φυτά και ζώα, τα αλλοιώνουν και τα μετατρέπουν σε διαλυτές μορφές τροφής, τις οποίες αφομοιώνουν με τα κύτταρά τους. Για να δραστηριοποιηθούν και να αναπτυχθούν οι μύκητες σε ξύλο και να τραφούν από αυτό χρειάζονται τα εξής: κατάλληλη θερμοκρασία, υγρασία του υποστρώματος (του ξύλου) και αέρα (οξυγόνο). Αν ένας από τους παραπάνω παράγοντες λείπει, οι μύκητες είτε πεθαίνουν είτε παραμένουν αδρανείς, μέχρι να επικρατήσουν καλύτερες συνθήκες.

Οι μύκητες που προσβάλλουν το ξύλο χωρίζονται στις εξής κατηγορίες:

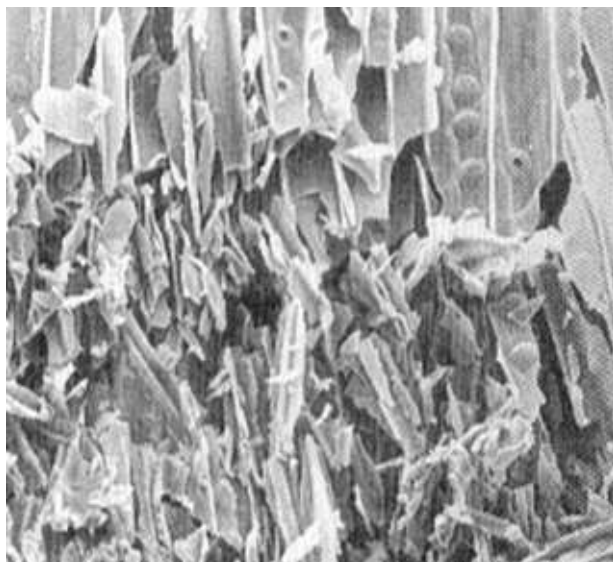
- σηπτικοί μύκητες: οι οποίοι προκαλούν σήψεις στο ξύλο.
- χρωστικοί μύκητες: οι οποίοι προκαλούν μεταχρωματισμούς στο ξύλο.

Επίσης, οι σήψεις χωρίζονται σε τρεις κυρίως τύπους: τις καστανές (brown rots), τις λευκές (white rots) και τις μαλακές (soft rots) σήψεις.

Οι μύκητες των καστανών σήψεων ανήκουν στους Βασιδιομύκητες και καταναλώνουν κυρίως κυτταρίνη και ημικυτταρίνη και σε μικρότερο ποσοστό λιγνίνη. Όσο αυξάνεται η ποσότητα λιγνίνης που καταναλώνουν τόσο μειώνεται η ικανότητα πέψης των πολυσακχαριτών από τους μύκητες αυτής της κατηγορίας. Με την πρόοδο της σήψης, το ξύλο γίνεται σκοτεινότερο, ρικνώνεται, υφίσταται κατάρρευση και ακόμα και με μια μικρή πίεση μπορεί να θρυμματιστεί. Οι μύκητες των καστανών σήψεων διακρίνονται στους μύκητες που προκαλούν “ξηρές σήψεις” αν το ξύλο στο οποίο αναπτύσσονται περιέχει χαμηλά επίπεδα υγρασίας και στους μύκητες που προκαλούν “υγρές σήψεις” αν η περιεχόμενη υγρασία του ξύλου είναι υψηλότερη. (Εικόνα 1,2)



Εικόνα 1: Μακροσκοπική εμφάνιση καστανής σήψης και μικροσκοπική προσβολή των κυτταρικών τοιχωμάτων σε στερεοσκοπικό ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

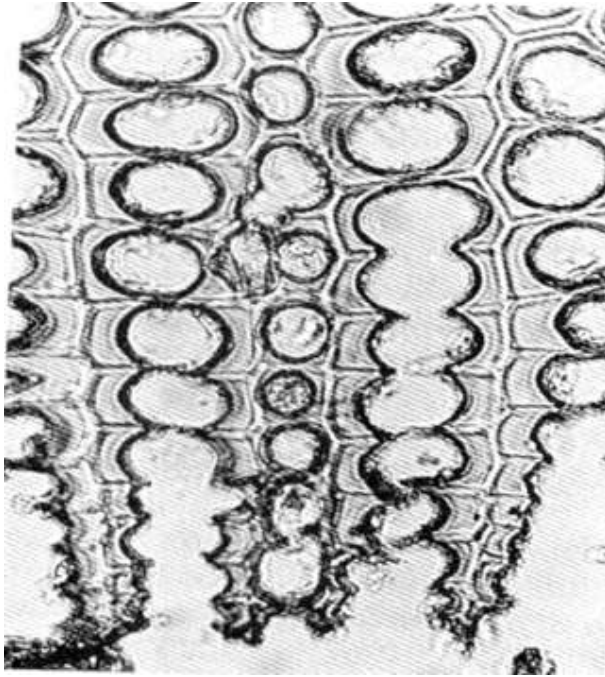


Εικόνα 2: Μακροσκοπική εμφάνιση που φαίνεται πόσο εύθρυπτο γίνεται το ξύλο σε τελικό στάδιο προσβολής από μύκητα καστανής σήψης.

Οι μύκητες των λευκών σήψεων όπως και οι μύκητες των καστανών σήψεων ανήκουν στους Βασιδιομύκητες και καταναλώνουν τόσο κυτταρίνη και ημικυτταρίνη όσο και λιγνίνη. Με την πάροδο της σήψης το ξύλο γίνεται ανοιχτότερο, σπογγώδες με ινώδη εμφάνιση. (Εικόνα 3,4)



Εικόνα 3: Μακροσκοπική εμφάνιση λευκής σήψης σε κορμοτεμάχιο δρυός.



Εικόνα 4: Μικροσκοπική προσβολή των κυτταρικών τοιχωμάτων από το εσωτερικό των κυτταρικών κοιλοτήτων.

Οι μύκητες μαλακών σήψεων προσβάλλουν περισσότερα είδη ξύλου από τις προαναφερθείσες κατηγορίες μυκήτων και ανήκουν στους Ασκομήκυτες και *Fungi Imperfecti*. Αποικοδομούν το ξύλο όταν βρίσκεται σε υγρές συνθήκες και καταναλώνουν τόσο κυτταρίνη και ημικυτταρίνη όσο και λιγνίνη. Με την πρόοδο της σήψης, το ξύλο γίνεται σκοτεινότερο, μαλακότερο και τα επιφανειακά του στρώματα ρυτιδώνονται και εμφανίζουν σχισμές. (Εικόνα 5,6)



Εικόνα 5: Μακροσκοπική εμφάνιση μαλακής σήψης.



Εικόνα 6: Μακροσκοπική εμφάνιση μαλακής σήψης.

Οι κυριότεροι σηπτικοί μύκητες που προσβάλλουν ξυλεία ανήκουν στα γένη *Lentinus*, *Lenzites*, *Polyporus*, *Coniophora*, *Poria*, *Merulius*, *Peniophora*, *Fomes*, *Trametes*, *Schizophyllum*, κ.ά.

Στους χρωστικούς μύκητες ανήκουν οι μύκητες που προκαλούν μεταχρωματισμό του ξύλου, δηλαδή αλλαγή του αρχικού χρώματος του ξύλου. Μέσα στα παρεγχυματικά τους κύτταρα υπάρχουν κυτταρίνη και ημικυτταρίνη μέσω των οποίων τρέφονται οι συγκεκριμένοι μύκητες. Οι μεταχρωματισμοί από τους χρωστικούς μύκητες μπορούν να προκληθούν ακόμα και σε διάστημα μίας μέρας με τα κωνοφόρα είδη να αποτελούν την πιο ευπαθή κατηγορία ξύλου. Οι πιο γνωστές προσβολές από χρωστικούς μύκητες είναι η κυάνωση και η ευρωτίαση. Η κυάνωση είναι σοβαρότερη και, σε ξύλο που έχει προσβληθεί, είναι δυνατό όλο το σομφό(το ανοιχτόχρωμο λειτουργικό ξύλο κοντά στον φλοιό) να μεταχρωματιστεί και να γίνει μέχρι και κυανόμαυρο λόγω των υφών ή χρωστικών που παράγονται από τους μύκητες.(Εικόνα 7

)



Εικόνα 7: Κυάνωση ξύλου.

1.1.2 Κατηγορίες βακτηρίων που αλλοιώνουν το ξύλο

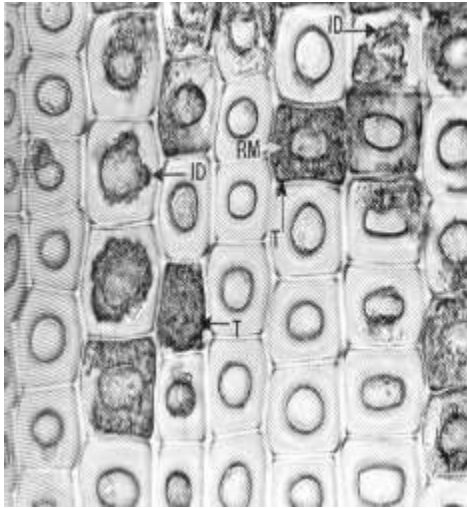
Σύμφωνα με συγκεκριμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά που παρατηρούνται στο ξύλο με τη δράση βακτηρίων, έχουμε ταξινομήσει τα βακτήρια που αλλοιώνουν το ξύλο σε τέσσερις κατηγορίες:

- Διαβρωτικά βακτήρια (erosion bacteria): τα οποία διαβρώνουν τα κυτταρικά τοιχώματα.
- Βακτήρια κοιλοτήτων (cavitation bacteria): τα οποία δημιουργούν κοιλότητες μέσα στα κυτταρικά τοιχώματα.
- Βακτήρια στοών (tunneling bacteria): τα οποία δημιουργούν στοές μέσα στα κυτταρικά τοιχώματα.
- σαπροφυτικά (αποικοδομητικά) βακτήρια (scavenging bacteria).

Όλα τα παραπάνω βακτήρια εμφανίζουν ραβδοειδές σχήμα και αποδομούν το ξύλο με μεγαλύτερη ταχύτητα από τους μύκητες. Επίσης, η δράση τόσο των βακτηρίων όσο και των μυκήτων είναι βιοχημική. Έχει παρατηρηθεί ότι τα βακτήρια αυξάνουν σημαντικά τη διαπερατότητα του ξύλου όταν αυτό διατηρείται μέσα στο νερό για ορισμένο χρονικό διάστημα. Η αύξηση της διαπερατότητας του ξύλου από τα βακτήρια οφείλεται στη δράση τους η οποία περιλαμβάνει διάτρηση ή καταστροφή μεμβρανών, διάβρωση κυτταρικών τοιχωμάτων και κατανάλωση του περιεχομένου των παρεγχυματικών κυττάρων. Οι αλλοιώσεις αυτές μπορούν να οδηγήσουν και σε ελάττωση της μηχανικής αντοχής του ξύλου, η οποία εάν είναι μακροχρόνια μπορεί να έχει σοβαρές συνέπειες.

Τα βακτήρια διάβρωσης εμφανίζονται με μεγάλη συχνότητα σε δείγματα αρχαίου ξύλου που ήταν θαμμένα κάτω από το νερό. Τα βακτήρια διάβρωσης είναι αναερόβιοι μικροοργανισμοί καθώς ασκούν τη δράση τους σε περιβάλλοντα με χαμηλά επίπεδα οξυγόνου, ακόμα και στα εσωτερικά στρώματα του ξύλου όπου η διαθεσιμότητα του οξυγόνου είναι πολύ χαμηλή. Τα συγκεκριμένα βακτήρια

χρησιμοποιούν τον μηχανισμό ολίσθησης και καταστρέφουν την κυτταρίνη και ημικυτταρίνη του κυτταρικού τοιχώματος ενώ η λιγνίνη δε φαίνεται να επηρεάζεται. Μετά την δράση των βακτηρίων, το ξύλο αποκτά πιο πορώδη υφή και καθώς βρίσκεται μέσα στο νερό, είναι δυνατό μέσα από τους πόρους να εισέλθει νερό, να συσσωρευτούν άλατα και το ξύλο να καταρρεύσει ή ακόμα και να καταστραφεί πλήρως. (Εικόνα 8)



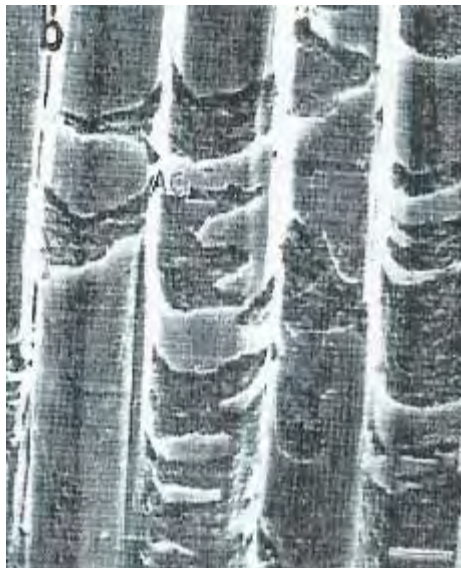
Εικόνα 8: Αρχική (ID) και προχωρημένη (T) αλλοίωση από διαβρωτικά βακτήρια (απλό μικροσκόπιο).

Στα εξωτερικά στρώματα του ξύλου και πιο συγκεκριμένα στα επιφανειακά στρώματα του ξύλου που είναι καλυμμένα με νερό δρουν τα βακτήρια στοών. Τα βακτήρια αυτά καταστρέφουν τόσο την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη όσο και την λιγνίνη και η καταστροφή συνεχίζεται μέχρι τα στρώματα του δευτερογενούς τοιχώματος. Καθώς η αποδόμηση προχωρά, τα βακτήρια δημιουργούν μικρές σήραγγες και στο τέλος της διαδικασίας το ξύλο αποτελείται από μεγάλες αποδομημένες περιοχές. (Εικόνα 9)



Εικόνα 9: Προσβολή ξύλου από βακτήρια που δημιουργούν στοές στη S2 στρώση των κυτταρικών τοιχωμάτων σε δασική πεύκη σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Η τρίτη κατηγορία βακτηρίων που έχει βρεθεί ότι αποικοδομούν αρχαία δείγματα ξύλου που βρίσκονται σε υδάτινα περιβάλλοντα είναι τα βακτήρια που δημιουργούν χαρακτηριστικές κοιλότητες στο ξύλο. Οι μικροοργανισμοί αυτοί καταστρέφουν την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη του S2 στρώματος του κυτταρικού τοιχώματος και δημιουργούν κοιλότητες με χαρακτηριστικό γωνιώδες σχήμα. Αν και δεν γνωρίζουμε ακριβώς τις απαιτήσεις αυτών των μικροοργανισμών σε σχέση με το οξυγόνο, δεν έχουν εντοπιστεί σε ακραία αναερόβια περιβάλλοντα. (Εικόνα 10)



Εικόνα 10: Προσβολή ξύλου από βακτήρια που δημιουργούν κοιλότητες στη S2 στρώση των κυτταρικών τοιχωμάτων σε ακτινωτή πεύκη σε απλό μικροσκόπιο.

Τόσο τα βακτήρια διάβρωσης όσο και τα βακτήρια που δημιουργούν στοές, στα πλαίσια της αποικοδόμησης των δειγμάτων ξύλου, αφήνουν κατάλοιπα, τα οποία αποικοδομεί η τέταρτη και τελευταία κατηγορία βακτηρίων που αλλοιώνουν το ξύλο, τα αποικοδομητικά βακτήρια, τα οποία εμφανίζουν τον αναερόβιο χαρακτήρα των βακτηρίων διάβρωσης.

Τα είδη βακτηρίων που έχουν βρεθεί σε δείγματα ξύλου και συναντάμε συχνότερα είναι τα α- και β-πρωτεοβακτήρια, με κυριότερους εκπροσώπους τα βακτήρια από τα γένη *Devosia* sp. και *Rhizobium* sp. Και την οικογένεια *Rhodocyclaceae*.

1.1.3 Ημικυτταρίνη και Ημικυτταρινάσες

Οι ημικυτταρίνες αποτελούν ένα μίγμα συμπολυμερών ουσιών που μαζί με την κυτταρίνη και τη λιγνίνη συγκροτούν τα κυτταρικά τοιχώματα των ξύλινων ιστών. Η παρουσία τους στη φύση είναι στενά συνδεδεμένη με την κυτταρίνη & λιγνίνη. Αποτελούνται τόσο από γραμμικά όσο και από διακλαδισμένα μέρη με στοιχειώδεις μονάδες δόμησης τη γλυκόζη, τη μαννόζη και τη ξυλόζη έτσι οι ημικυτταρίνες διακρίνονται σε γαλακτάνες, μαννάνες και ξυλάνες. Πλήρης υδρόλυση των ημικυτταρινών μας δίνει τις εξόζες D-γλυκόζη, D-μαννόζη, D-γαλακτόζη, ουρανικά οξέα και τις πεντόζες D-ξυλόζη, L-Αραβινόζη και σπανιότερα L-Ραμνόζη και L-φρουκτόζη.

Το ποσοστό των ημικυτταρινών κυμαίνεται σε μεγάλα όρια (18-41%) στα διάφορα φυτικά είδη. Ξύλο πλατύφυλλων δένδρων περιέχει κατά μέσο όρο περίπου 30% περισσότερες ημικυτταρίνες από το ξύλο κωνοφόρων δένδρων. Το ποσοστό των ημικυτταρινών είναι μεγαλύτερο στις κορυφές και στους κλάδους των δένδρων από ότι στο κορμό. Η κατανομή τους στα κυτταρικά τοιχώματα και τους διάφορους τύπους κυττάρων δεν είναι ομοιόμορφη. Απαντούν σε μεγάλα ποσοστά στην μεσοκυττάρια στρώση και στο πρωτογενές τοίχωμα.

Τα ένζυμα που απαιτούνται για τη διάσπαση της ημικυτταρίνης ονομάζονται ημικυτταρινάσες και είναι περισσότερα από αυτά στην κυτταρίνη επειδή έχει μεγαλύτερη ετερογένεια από αυτή. Η εμφάνιση των ημικυτταρινασών και ιδιαίτερα των ξυλανάσων είναι ευρέως διαδεδομένη. Τόσο βακτήρια όσο και μύκητες, οι οποίοι εντοπίζονται τόσο εξωκυτταρικά όσο και ενδοκυτταρικά, παράγουν ημικυτταρινάσες οι οποίες χρησιμοποιούν το ξύλο ως υπόστρωμα και το αποικίζουν. Οι ημικυτταρίνες βιοδιασπώνται σε μονομερή σάκχαρα και οξικό οξύ. Η ξυλάνη είναι ο κυριότερος υδατάνθρακας που υπάρχει στην ημικυτταρίνη και η επιτυχής αποδόμησή της απαιτεί την συνεργιστική δράση διαφόρων υδρολυτικών ενζύμων. Οι ημικυτταρίνες χωρίζονται ανάλογα με την δράση τους σε υποστρώματα σε α) ενδο-1,4-β-ξυλανάσες που ελευθερώνουν ξυλο-ολιγοσακχαρίτες από την διάσπαση της ξυλάνης και β) ξυλοζιδάσες που ελευθερώνουν ξυλόζες από τους ολιγοσακχαρίτες. Επιπλέον η αποδόμηση της ημικυτταρίνης χρειάζεται και άλλα

ένζυμα όπως οι ακετυλ-εστεράσες , οι εστεράσες του φερουλικού οξέος, οι α-L-αραβινοφουρανοζιδάσες και οι α-4-O-μέθυλ-γλυκουρονοζιδάσες. Όλα αυτά τα ένζυμα δρουν συνεργιστικά για την αποτελεσματική υδρόλυση των ξυλανών και των μαννανών. Στην περίπτωση της O-ακετυλ-4-O-μεθυλογλυκουροξυλάνης, που είναι μία από τις πιο κοινές ημικυτταρίνες, χρειάζονται τέσσερα διαφορετικά ένζυμα για αποικοδόμηση: ενδο-1-4-ξυλανάση, ακετυλο-εστεράση, α-γλυκουρονιδάση και β-ξυλοζιδάση.

1.1.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την αλλοίωση ξύλου

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την αλλοίωση του ξύλου είναι ποικίλοι και εξίσου σημαντικοί. Αρχικά, η δομή και η χημική σύνθεση του ξύλου αποτελούν μια βασική παράμετρο που επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την αλλοίωσή του.

Σε εσωτερικούς χώρους το ξύλο διατηρεί την εμφάνιση και τη δομή του για πολλά χρόνια. Όταν όμως το ξύλο είναι εκτεθειμένο αλλοιώνεται βαθμιαία κάτω από την επίδραση κλιματικών παραγόντων, π.χ. νερό που προέρχεται από τη βροχή, υγρασία, χιόνι, αέρας, θερμοκρασία, φως, κ.ά. Η μακροχρόνια επίδραση των παραγόντων αυτών προκαλεί το φαινόμενο της “γήρανσης” του ξύλου (Εικόνα 11,12) το οποίο σε μακροσκοπικές παρατηρήσεις περιλαμβάνει μεταβολή του χρώματος, εμφάνιση ραγαδώσεων, τραχύτητα της επιφάνειας και επιφανειακή διάβρωση του ξύλου.

Από τις καιρικές συνθήκες που αναφέρθηκαν παραπάνω, το νερό σε υγρή μορφή αποτελεί τον πιο καταστρεπτικό παράγοντα της δομής του ξύλου. Η καταστρεπτική επίδραση του νερού σαν παράγοντα αλλοίωσης οφείλεται κυρίως στο ότι το ξύλο διογκώνεται όταν υγραίνεται και ρικνώνεται όταν ξηραίνεται. Πρέπει να σημειωθεί ότι ο ρυθμός διόγκωσης του ξύλου όταν αυτό έρχεται σε επαφή με το νερό είναι μεγάλος στην αρχή ιδιαίτερα στα επιφανειακά στρώματα. Η εναλλαγή διόγκωσης και ρίκνωσης και οι ταχύτερες διαστασιακές μεταβολές των εξωτερικών στρωμάτων του ξύλου σε σύγκριση με τα εσωτερικά που προκαλούν αλλοιώσεις στο ξύλο οι οποίες μακροσκοπικά εμφανίζονται με τη μορφή ραγαδώσεων.(Εικόνα 13,14)

Σε περίπτωση που το ξύλο είναι θαμμένο κάτω από το νερό, μεγάλη σημασία έχουν οι περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν εκείνη την χρονική περίοδο. Έχει παρατηρηθεί ότι η βιολογική αλλοίωση του ξύλου είναι ταχεία σε υγρά και ζεστά περιβάλλοντα και αργή σε ξηρά και κρύα περιβάλλοντα. Περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η θερμοκρασία, τα επίπεδα οξυγόνου, το pH, η αλατότητα και η ωσμωτικότητα παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αλλοίωση του ξύλου.

Η δράση χημικών παραγόντων αποτελεί εξίσου μία από τις αιτίες αλλοίωσης του ξύλου. Το ξύλο είναι δυνατό να υποστεί χημικό μεταχρωματισμό κατά θέσεις που είναι αποτέλεσμα χημικών αντιδράσεων των ταννινών του ξύλου σε συνθήκες σχετικά υψηλής υγρασίας. Με τις αντιδράσεις αυτές σχηματίζονται ενώσεις μαύρου ή κυανόμαυρου χρώματος οι οποίες αλλοιώνουν τοπικά το χρώμα του ξύλου. Επίσης, ισχυρά οξέα και αλκάλια προκαλούν σημαντική αλλοίωση του ξύλου, μεταβάλλοντας το χρώμα του. Ο βαθμός αυτής της αλλοίωσης εξαρτάται από το είδος του ξύλου, τη διαπερατότητά του, τη διάρκεια επίδρασης, τη θερμοκρασία και τον τύπο του χημικού. Μακράς διάρκειας όμως έκθεση σε αλκάλια είναι εφικτό να διαλύσει τις ημικυτταρίνες και τη λιγνίνη και να μεταβάλλει το ξύλο σε μαλακό υπόλειμμα.

Τέλος, οι εκάστοτε μικροοργανισμοί που αποικίζουν το ξύλο, είτε είναι βακτήρια είτε είναι μύκητες είτε οτιδήποτε άλλο παίζουν σημαντικό ρόλο στην αλλοίωση του ξύλου. Τα διάφορα είδη ξύλου παρουσιάζουν διαφορετική ευαισθησία σε προσβολές μικροοργανισμών. Η διαφορετική αυτή φυσική αντοχή των ειδών ξύλου οφείλεται κυρίως στη διαφορετική περιεκτικότητα τοξικών εκχυλισμάτων. Αύξηση της περιεκτικότητας εκχυλισμάτων προσδίδει στο ξύλο σκοτεινότερο χρώμα και μεγαλύτερη φυσική αντοχή στις προσβολές από τους μικροοργανισμούς. Το εγκάρδιο ξύλο λόγω των περισσότερων εκχυλισμάτων που περιέχει από το σομφό είναι πολλές φορές σκοτεινότερο και πιο ανθεκτικό. Για πρακτικούς σκοπούς μπορεί να γίνει γενικά δεκτό ότι όσο το ξύλο έχει σκοτεινότερο χρώμα και είναι βαρύτερο, τόσο η φυσική αντοχή του σε προσβολές μικροοργανισμών είναι μεγαλύτερη.

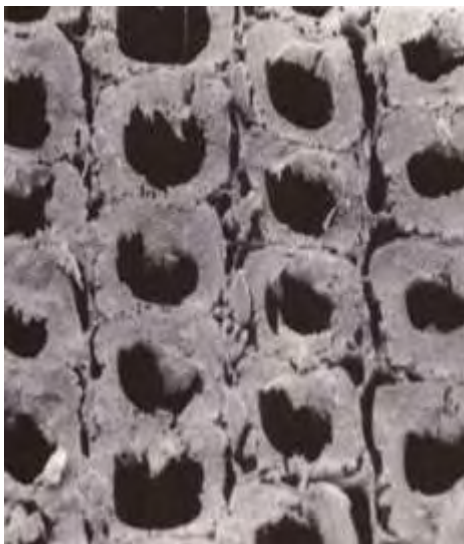
Αξίζει να τονίσουμε ότι παρά το γεγονός ότι το ξύλο θα μπορούσε να διατηρηθεί καλύτερα σε υπόγεια υδάτινα περιβάλλοντα, εξαιτίας των χαμηλότερων επιπέδων οξυγόνου, εκεί ασκούν τη δράση τους οι μικροοργανισμοί βακτηριακής προέλευσης και οδηγούν στη αλλοίωση. Η αλλοίωση του ξύλου στα υπόγεια υδάτινα περιβάλλοντα εξαρτάται τόσο από το βάθος του νερού όσο και από το χρονικό διάστημα κατά το οποίο το ξύλο είναι θαμμένο σε αυτό το βάθος.



Εικόνα 11: Μακροσκοπική εμφάνιση εγκάρσιων επιφανειών ξύλου, οι οποίες λόγω φυσικής γήρανσης εμφανίζονται αλλοιωμένες, μεταχρωματισμένες, τραχείες και με ραγαδώσεις.



Εικόνα 12: Μακροσκοπική εμφάνιση πλευρικών επιφανειών ξύλου, οι οποίες λόγω φυσικής γήρανσης εμφανίζονται αλλοιωμένες, μεταχρωματισμένες, τραχείες και με ραγαδώσεις



Εικόνα 13: Ραγαδώσεις και «μικροραγαδώσεις» σε εγκάρσια τομή ως αποτέλεσμα αλληπάλληλων κύκλων ύγρανσης και ξήρανσης.



Εικόνα 14: Ραγιδώσεις και «μικροραγιδώσεις» σε αξονική τομή ως αποτέλεσμα αλλεπάλληλων κύκλων ύγρανσης και ξήρανσης.

1.1.5 Διαδικασίες συντήρησης αρχαιολογικών ή ιστορικών ξύλινων ευρημάτων

Το ξύλο υπηρετεί τον άνθρωπο από τότε που αυτός εμφανίστηκε στη γη και έχει συντελέσει σημαντικά στην ανάπτυξη του πολιτισμού. Παρά την ευρύτατη χρήση του ξύλου στην αρχαιότητα, τα ξύλινα αρχαιολογικά ευρήματα είναι μάλλον σπάνια. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, με την επίδραση των παραγόντων του περιβάλλοντος αρχίζει η αλλοίωση του ξύλου με φυσικές, χημικές και δομικές αλλαγές, που οδηγούν στην αποσύνθεσή του. Με τον όρο αρχαιολογικό ξύλο θα μπορούσε κανείς να περιγράψει το ξύλο που μέσα από διαδικασίες αλλοίωσης και διάβρωσης κατέληξε σε μια κατάσταση με υποβαθμισμένες μηχανικές και μεταλλαγμένες φυσικές κι χημικές ιδιότητες σε σχέση με το φρέσκο ξύλο. Η γνώση λοιπόν των μηχανισμών που συμβάλουν στην αλλοίωση του αρχαιολογικού ξύλου μας βοηθάει να ανακαλύψουμε μηχανισμούς που συμβάλουν στη διατήρηση αυτών των ευρημάτων με σκοπό να εμποδιστεί η περαιτέρω καταστροφή τους.

Οι εφαρμοσμένες μέθοδοι συντήρησης θα πρέπει να μην αλλοιώνουν την αισθητική του ξύλινου ευρήματος, να μην υποβιβάζουν την αξία του ως φορέα πληροφοριών και να διασφαλίζουν την μακροβιότητά του. Επίσης, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη το χρονικό πλαίσιο των αρχαιολογικών έργων μέσα στο οποίο θα πρέπει να ολοκληρωθεί η ανασκαφή, το κόστος συντήρησης και οι διαθέσιμες πηγές χρηματοδότησης. Τέλος, κύριο χαρακτηριστικό για την επιλογή της μεθόδου είναι ο βαθμός υγρασίας του εκάστοτε ξύλου. Ξύλο με υγρασία μέχρι 17% χαρακτηρίζεται ως ξηρό, ξύλο με υγρασία 18-35% και 36-70% χαρακτηρίζεται ως υγρό ξύλο και τέλος ξύλο με υγρασία πάνω από 70% χαρακτηρίζεται ως υδατοκορεσμένο.

Σε γενικές γραμμές, τα τεχνικά προβλήματα που εμφανίζονται κατά τη μελέτη και συντήρηση του αρχαιολογικού ξύλου που είναι ξηρό κατά την ανασκαφή, είναι σαφώς μικρότερα συγκρινόμενα με εκείνα που σχετίζονται με το υδατοκορεσμένο αρχαιολογικό ξύλο.

Οι διαδικασίες που συνήθως ακολουθούνται περιλαμβάνουν την αντικατάσταση του νερού με υλικά που γεμίζουν τις κοιλότητες και εμποδίζουν έτσι την καταστροφή του ξύλου κατά τη διάρκεια της μεταφοράς του. Παραδείγματα τέτοιων μεθόδων αποτελούν ο εμποτισμός με πολυαιθυλενικές γλυκόλες και η υποκατάσταση του νερού με σάκχαρα. Οι διαδικασίες αυτές είναι ιδιαίτερα ακριβές και εξαρτώνται τόσο από τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά των υλικών που χρησιμοποιούνται όσο και από το βαθμό στον οποίο καλύπτονται οι κοιλότητες.

Μία δεύτερη μέθοδος που εφαρμόζεται συχνά είναι η χρήση βακτηριοφάγων, οι οποίοι εμφανίζουν ανθεκτικότητα στην αλλοίωση του ξύλου και είναι ικανοί να επιβιώσουν και να ανταπεξέλθουν τόσο εξωκυτταρικά όσο και ενδοκυτταρικά. Ωστόσο, πρέπει κάθε φορά να χρησιμοποιούνται οι κατάλληλοι βακτηριοφάγοι για το είδος των βακτηρίων που δρουν στο ξύλο και να δίνεται προσοχή έτσι ώστε οι εκάστοτε βακτηριακοί πληθυσμοί να μην εμφανίζουν ανθεκτικότητα στον βακτηριοφάγο που χρησιμοποιείται.

1.2 Απομόνωση DNA από δείγμα ξύλου και μελέτη ποικιλότητας μικροβιακών κοινοτήτων

Η απομόνωση του DNA είναι μία διαδικασία εκκαθάρισης του DNA ενός δείγματος με τον συνδυασμό φυσικών και χημικών μεθόδων. Η διαδικασία για την απομόνωση του περιλαμβάνει λύση των κυτταρικών μεμβρανών, αποικοδόμηση των πρωτεϊνών, διαχωρισμό του DNA από τα υπόλοιπα κυτταρικά συστατικά, καθαρισμό και αποθήκευση του DNA σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Η απομόνωση DNA από δείγμα ξύλου και ειδικά από δείγμα αρχαιολογικού ξύλου είναι μία δύσκολη διαδικασία και αποτελεί μεγάλη πρόκληση.

Η ταυτοποίηση μικροοργανισμών βακτηριακής προέλευσης που βρίσκονται σε αρχαία ή ιστορικά δείγματα ξύλου, διατηρημένα σε υδάτινα περιβάλλοντα, γίνεται συνήθως χρήση μοριακών τεχνικών και τεχνικών απομόνωσης. Οι μοριακές τεχνικές δίνουν τη δυνατότητα να ανιχνευθούν βακτηριακά είδη, να αναλυθεί μεγάλος όγκος αλληλουχιών, καθώς επίσης και να γίνουν φυλογενετικές αναλύσεις. Σε αυτές τις περιπτώσεις καταβάλλεται προσπάθεια απομόνωσης του DNA απευθείας από τα δείγματα ξύλου με σκοπό να προσδιοριστεί η ποικιλότητα των βακτηριακών ειδών.

Σημαντικό όπλο για την μελέτη της ποικιλότητας των μικροβιακών κοινοτήτων είναι η μεταγενωμική ανάλυση. Η μεταγενωμική είναι η μελέτη του γενετικού υλικού που ανακτάται απευθείας από περιβαλλοντικά δείγματα. Η μεταγενωμική προσέγγιση δίνει την δυνατότητα μελέτης μεγάλου αριθμού αλληλουχιών DNA σε ελάχιστο χρόνο, κάτι που επιτυγχάνεται με τη εισαγωγή των γονιδιωματικών βιβλιοθηκών σε βακτηριακά συστήματα E.coli. Πιο συγκεκριμένα, γίνεται χρήση του συλλογικού DNA της βιοποικιλότητας των περιοχών που μας ενδιαφέρουν και το DNA που συλλέγεται, τεμαχίζεται και εισάγεται σε φορείς βακτηριακής έκφρασης (πλασμίδια) δημιουργώντας γονιδιωματικές βιβλιοθήκες.

1.3 Μελέτη που απολιθωμένου δάσος στο Bükkábrány (Ουγγαρία)

Τα απολιθωμένα δάση ορίζονται ως εκείνα που οι κορμοί τους βρίσκονται σε όρθια στάση και έχει διατηρηθεί η αρχική τους δομή. Απολιθωμένα δάση έχουν βρεθεί σε όλες τις ηπείρους τις περισσότερες γεωλογικές εποχές. Το ξύλο τους είναι κυρίως μεταλλοποιημένο και συνήθως μετατρέπεται σε ανθρακικό άλας ή σιδηροπυρίτη. Τα δάση που διατηρούνται ως ξύλο είναι εξαιρετικά σπάνια. Παρά το γεγονός ότι μέχρι το 2007 δεν είχε βρεθεί ποτέ στην Ευρώπη κάποιο αρχαιολογικό δέντρο στην αρχική του κατάσταση και στον αρχικό του τόπο με πριν, το δάσος Bükkábrány στην Ουγγαρία, τον Ιούλιο του 2007, αποτέλεσε την έκπληξη. Το δάσος Bükkábrány αποτελεί μια παλαιοντολογική ανακάλυψη στην βορειοανατολική Ουγγαρία που αποκάλυψε δεκαέξι καλά διατηρημένους κορμούς δέντρων σε όρθια στάση σε ένα ορυχείο λιγνίτη 60 μέτρα κάτω από το έδαφος στο Bükkábrány, ένα μικρό χωριό στους πρόποδες της οροσειράς Bükk. Οι κορμοί, ύψους περίπου έξι μέτρων και διαμέτρου δύο με τρία μέτρα, περιβλήθηκαν από άμμο πριν από οχτώ εκατομμύρια χρόνια, διατηρώντας το ξύλο τους. (Εικόνα 15)

Πριν από 9,5 εκατομμύρια χρόνια, η υφάλμυρη λίμνη Pannon, που βρίσκεται στο λεκανοπέδιο Pannon, καταλάμβανε τη μεγαλύτερη έκταση της και τα όριά της έφταναν τη βάση της οροσειράς Bükk. Εκείνη την περίοδο περίπου ξεκίνησε και η εναπόθεση λιγνίτη κατά μήκος της βόρειας και της βορειοανατολικής ακτής της λίμνης. Τα στρώματα λιγνίτη διακόπτονται από εναποθέσεις λάσπης, ο ίδιος ο λιγνίτης καλύπτεται από 5-6 μέτρα γκρίζας άμμου. Πιο συγκεκριμένα, η άμμος απομακρυνόταν κάθε πρωί από τα στρώματα λιγνίτη και το βράδυ κινούμενη άμμος κορεσμένη με νερό έπαιρνε τη θέση της. Στα ανώτερα επίπεδα υπάρχει άμμος κίτρινου και καφέ χρώματος η οποία δεν ενσωμάτωσε κανένα ίχνος δέντρου και χαλίκια της εποχής του Πλειστόκαινου. (Εικόνα 16) Ακριβώς πάνω από τα επίπεδα του λιγνίτη συναντάμε τους κορμούς των δέντρων.

Πριν από 7 εκατομμύρια χρόνια, το επίπεδο της λίμνης Pannon ανέβηκε κατά 20 μέτρα και υπερκάλυψε το δάσος του Bükkábrány εξαιτίας μια απότομης

ιζηματοπόθεσης άμμου μέσω των δέλτων παρακείμενων ποταμών. Οι κορμοί καλύφθηκαν και οι κοιλότητές τους γέμισαν με άμμο, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός περιβάλλοντος που συντελούσε στη διατήρηση του οργανικού τμήματος των κορμών.

Με μια πρώτη ματιά τα δέντρα μοιάζουν με κανονικό υγρό ξύλο, σχετικά μαλακό όταν πιέζεται με το δάχτυλο. Όμως πολλοί κορμοί εμφανίζουν σοβαρές διαταραχές όπως σήψεις με χαρακτηριστικές κοιλότητες γεμάτες γκρίζα άμμο. Επίσης, πολλές ρωγμές στους κορμούς μαρτυρούν ποικίλες διεργασίες αποικοδόμησης.(Εικόνα 17) Η ελαστική κυτταρίνη των κυτταρικών τοιχωμάτων εμφανίζεται κατεστραμμένη ενώ η λιγνίνη παραμένει άθικτη. Η έκθεση των υγρών κορμών στο φως του ήλιου και στον αέρα, δημιουργεί συστολή και κύρτωσή τους λόγω της μεγάλης επιφανειακής τάσης που προκλήθηκε από το νερό που εξατμίστηκε.

Αυτή η κατάσταση των δέντρων τα καθιστά επίσης πολύ ευάλωτα σε εξωτερικές συνθήκες όπως ο αέρας και το φως του ήλιου, γι 'αυτό και οι προφυλάξεις και τα μέτρα ασφαλείας που λαμβάνονται για τη μεταφορά τους είναι ιδιαίτερα αυστηρά. Τέσσερα από αυτά τα δέντρα μεταφέρθηκαν στο Μουσείο Ottó Herman στο νομό Miskolc στη βορειοανατολική Ουγγαρία στις 8 Αυγούστου 2007, και τα υπόλοιπα στο κέντρο επισκεπτών του Εθνικού Πάρκου Bükk στο Ipolytarnóc. Για να μπορέσουν να διατηρηθούν κατά τη μεταφορά τους, τα δέντρα καλύπτονται με υγρή άμμο και νερό.

Ανατομικές μελέτες σε πρόσφατα ανακτημένο υλικό του ξύλου, επέτρεψαν την ταξινόμηση των δέντρων στις εξής κύριες κατηγορίες: *Taxodioxydon germanicum* VAN DER BURGH (το οποίο εμφανίζει πολλές ομοιότητες με την σημερινή *Sequoia* Endlicher) και *Glyptostroboxylon* sp. Επίσης πολλά από αυτά τα δέντρα (*Sequoia*) εμφανίζουν έντονες νευρώσεις. Επιπλέον, οι κορμοί, πέρα από τις ραβδώσεις που εμφανίζουν, είναι αποφλοιωμένοι και αλλοιωμένοι από διάφορους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες, όπως μύκητες, ζώα, κλιματικές συνθήκες, κλπ.(Εικόνα 18)

Το δάσος του Bükkábrány αποτελεί μεγάλη πρόκληση για τους ερευνητές, καθώς θα πρέπει να μελετηθούν όλα τα δεδομένα σχετικά με την γεωλογία του, την στρωματογραφία του, την υδρογεωλογία του και την γεωγραφική του θέση. Όλα τα παραπάνω δεδομένα θα πρέπει να συνδυαστούν με τον καλύτερο τρόπο έτσι ώστε να βρεθούν οι κατάλληλες προσεγγίσεις για την διατήρηση και συντήρηση του ιστορικού αυτού δάσους.



Εικόνα 15: Χαρακτηριστική εικόνα ενός απολιθωμένου δέντρου στο Bückabrány όπου η κοιλότητά του είναι γεμάτη με την άμμο μετά την ιζηματοπόθεση.



Εικόνα 16: Οι κορμοί διατηρούνται σε γκρι άμμο. Στα ανώτερα επίπεδα υπάρχει κίτρινη προς καφέ άμμος.



Εικόνα 17: Ρωγμές που μαρτυρούν διεργασίες αποικοδόμησης.



Εικόνα 18: Οξεία ράβδωση στους κορμούς.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Έχοντας δείγμα ξύλου από το απολιθωμένο δάσος του Bükkábrány, έχουμε σκοπό να προχωρήσουμε στη μελέτη της προκαρυωτικής ποικιλότητας γονιδίων ημικυτταρινασών . Πιο συγκεκριμένα, αρχικά έχουμε σκοπό να πάρουμε κομμάτια από τον εσωτερικό του ξύλου και να τα κονιορτοποιήσουμε έτσι ώστε να πάρουν τη μορφή σκόνης. Έπειτα, σκοπεύουμε να απομονώσουμε το DNA από το κονιορτοποιημένο δείγμα ξύλου με τη βοήθεια διάφορων kit και πρωτοκόλλων απομόνωσης σε συνδυασμό με Touchdown PCR και εκφυλισμένους εκκινητές σχεδιασμένους για γονίδια ημικυτταρινασών, έτσι ώστε να πάρουμε ενισχυμένα προϊόντα, τα οποία θα αλληλουχηθούν. Τέλος, οι αλληλουχίες θα αναλυθούν με σύγχρονα εργαλεία βιοπληροφορικής.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Κονιορτοποίηση ξύλου

1^η Κονιορτοποίηση

Συνθήκες-υλικά:

- Θάλαμος νηματικής ροής
- Αποστειρωμένες σύριγγες
- Αποστειρωμένα tips
- Αποστειρωμένα προζυγισμένα erpendorf (βάρος 1,03mg)
- Αποστειρωμένο γουδί
- Αποστειρωμένο μαχαίρι

Για τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε δείγμα ξύλου από το απολιθωμένο δάσος στο Bückabrány Προσθήκη ξύλου, από το εσωτερικό του διαθέσιμου υλικού με χρήση του αποστειρωμένου μαχαιριού, σε γουδί και στη συνέχεια προσθήκη υγρού αζώτου (N₂). Μετά την εξάτμιση του υγρού αζώτου, χρήση γουδιού για τη μετατροπή του ξύλου σε σκόνη. Τέλος, κατανομή της σκόνης στα προζυγισμένα erpendorf ώστε να υπάρχει κατά μέσο όρο υλικό 300-400mg στο καθένα και αποθήκευση στους -80°C μέχρι τη χρήση της.

Τα δείγματα που προέκυψαν μετά την κονιορτοποίηση του ξύλου ήταν τα εξής:

1. 340mgr
2. 370mgr

3.2 Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση DNA από το ξύλο χρησιμοποιήθηκαν και τα δύο δείγματα ξύλου (1,2), τα οποία αρχικά αφέθηκαν να ξεπαγώσουν για 3 λεπτά στον πάγο καθώς είχαν αποθηκευθεί στους -80°C, και στη συνέχεια προστέθηκε buffer που περιείχε SDS 5%, EDTA 0,5M και πρωτεΐνάση K 12,5mg/ml σε ποσότητες 340μl και 370μl αντίστοιχα. Μετά την προσθήκη του buffer τα δείγματα αφήνονται να επωαστούν για 15 ώρες.

- **1^η Απομόνωση του DNA**

Η 1^η απομόνωση του DNA από τα κονιορτοποιημένα δείγματα 1 και 2 έγινε με τη βοήθεια του kit **Genomic DNA from Soil Nucleospin kit** (Macherey-Nagel, Germany).

Η απομόνωση του DNA έγινε με βάση τις οδηγίες του kit. Δηλαδή:

1. Φυγοκέντρηση στα 11,000g για 2min. Κρατάω το υπερκείμενο για control και το υπόλοιπο το μεταφέρω σε Nucleospin Bead Tube. Προσθέτουμε στο tube 700μl από το SL2.
2. Προσθέτουμε 150μl από το SX.
3. Vortex για 5 λεπτά.
4. Φυγοκέντρηση για 2 min στα 11,000g. Βάζουμε σε ένα eppendorf το υπερκείμενο και πετάμε το ίζημα. Στο υπερκείμενο προσθέτουμε 150μl SL3 και κάνουμε vortex για 5sec. Επώαση για 5min στους 0-4°C. Φυγοκέντρηση για 1 min στα 11,000g.
5. Προσθέτουμε 700μl από το υπερκείμενο σε ένα collection tube το οποίο έχει φίλτρο Nucleospin Inhibitor Removal Column. Φυγοκέντρηση για 1min στα 11,000g. Αφαιρούμε το φίλτρο.
6. Προσθέτουμε 250μl SB και vortex για 5sec.
7. Τοποθετούμε ένα Nucleospin Soil Column στο collection tube. Φορτώνουμε 550μl δείγματος στη στήλη. Φυγοκέντρηση για 1min στα 11,000g. Απορρίπτουμε το υγρό και βάζουμε τη στήλη πίσω στο collection tube.
8. 1^η πλύση: 500μl στο Nucleospin Soil Column. Φυγοκέντρηση για 30sec στα 11,000g. Απορρίπτουμε το υγρό και τοποθετούμε πίσω τη στήλη.
2^η πλύση: 550μl SW1 στο Nucleospin Soil Column. Φυγοκέντρηση για 30sec στα 11,000g. Απορρίπτουμε το υγρό και τοποθετούμε πίσω τη στήλη.
3^η πλύση: 700μl SW2 στο Nucleospin Soil Column. Κάνουμε vortex για 2sec. Φυγοκέντρηση για 30sec στα 11,000g. Απορρίπτουμε το υγρό και τοποθετούμε πίσω τη στήλη.
4^η πλύση: 700μl SW2 στο Nucleospin Soil Column. Κάνουμε vortex για 2sec. Φυγοκέντρηση για 30sec στα 11,000g. Απορρίπτουμε το υγρό και τοποθετούμε πίσω τη στήλη.
9. Φυγοκέντρηση για 2min στα 11,000g.

Τοποθετούμε το Nucleospin Soil Column σε ένα καινούριο tube. Προσθέτουμε 30μl SE στη στήλη του δείγματος 1 και 50μl SE στη στήλη του δείγματος 2 και τα αφήνουμε για 3min σε θερμοκρασία δωματίου με ανοιχτό καπάκι. Κάνουμε φυγοκέντρηση για 1min στα 11,000g.

3.3 2^η Κονιορτοποίηση ξύλου

2^η Κονιορτοποίηση:

Συνθήκες-υλικά:

- Θάλαμος νηματικής ροής
- Αποστειρωμένες σύριγγες
- Αποστειρωμένα tips

- Αποστειρωμένα προζυγισμένα erpendorf (βάρος 1,03mg)
- Αποστειρωμένο γουδί
- Αποστειρωμένο μαχαίρι

Για τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε δείγμα ξύλου από το απολιθωμένο δάσος στο Bükkábrány Προσθήκη ξύλου, από το εσωτερικό του διαθέσιμου υλικού με χρήση του αποστειρωμένου μαχαιριού, σε γουδί και στη συνέχεια προσθήκη υγρού αζώτου (N₂). Μετά την εξάτμιση του υγρού αζώτου, χρήση γουδιού για τη μετατροπή του ξύλου σε σκόνη. Τέλος, κατανομή της σκόνης στα προζυγισμένα erpendorf ώστε να υπάρχει κατά μέσο όρο υλικό 400mg στο καθένα και αποθήκευση στους -80°C μέχρι τη χρήση της.

Τα δείγματα που προέκυψαν μετά την κονιορτοποίηση του ξύλου ήταν τα εξής:

1. 410mgr
2. 370mgr
3. 420mgr
4. 430mgr
5. 530mgr
6. 430mgr
7. 350mgr
8. 400mgr
9. 450mgr
10. 460mgr

3.4 2^η Απομόνωση DNA

- **2^η Απομόνωση του DNA**

Η 2^η απομόνωση του DNA από το κονιορτοποιημένο δείγμα 5 βασίστηκε στο **“Identification and Characterization of a Cellulase-Encoding Gene from Buffalo Rumen Metagenomic Library”**.

Για την απομόνωση του DNA ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Προσθήκη 530μl buffer: 200mM Tris-HCl pH=8, 100mM EDTA). Πραγματοποιήσαμε μια διαδικασία που περιελάμβανε 3 κύκλους παγώματος στους -20°C για 30min και ξεπαγώματος στους 65°C για 10min
2. Προσθήκη 177μl λυσοζύμης (100mg/ml) και κούνημα στα 225rpm για 30min στους 37°C. Στη συνέχεια, προσθήκη 230μl SDS 20% και 88,3μl πρωτεϊνάση K και κούνημα για 2h στους 37°C.

3. Ακολούθησαν 2 φυγοκentrήσεις για 2-3min στα 11,000g. Κρατήσαμε το ίζημα στους -20°C και το υπερκείμενο που ήταν 700μl το μεταφέραμε σε ένα καινούριο eppendorf.
4. Προσθέσαμε ίση ποσότητα με το υπερκείμενο, ισοπροπανόλης 100% και κάναμε vortex για 30sec-1min. Ακολούθησε φυγοκentrηση για 15min στα 14,000g και έπειτα αφαιρέσαμε με πιπέτα την ισοπροπανόλη και παρατηρήσαμε στη βάση του eppendorf ένα ίχνος DNA.
5. Έπειτα, προσθέσαμε 1ml κρύας αιθανόλης 70% και πλύνουμε το DNA και ακολούθησε φυγοκentrηση για 15min σε μέγιστη ταχύτητα. Απορρίψαμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύσαμε το DNA.
6. Φτιάξαμε ένα διάλυμα 10ml που περιείχε 10mM Tris-1mM EDTA για την αποθήκευση του DNA. Από αυτά τα 10ml χρησιμοποιήσαμε τα 88,3μl.

- **3^η Απομόνωση του DNA**

Για την απομόνωση DNA από το ξύλο χρησιμοποιήθηκε το δείγμα 3, στο οποίο προστέθηκε buffer που περιείχει SDS 5%, EDTA 0,5M και πρωτεΐνάση K 12,5mg/ml σε ποσότητα 420μl. Μετά την προσθήκη του buffer το δείγμα αφήνεται να επωαστεί για 15 ώρες. Η 3^η απομόνωση του DNA από το κονιορτοποιημένο δείγμα 3 έγινε με τη βοήθεια του kit **Genomic DNA from Soil Nucleospin kit** (Macherey-Nagel, Germany).

Η απομόνωση του DNA έγινε με βάση τις οδηγίες του kit. Δηλαδή:

1. Φυγοκentrηση στα 11,000g για 2min. Κρατάω το υπερκείμενο για control και το υπόλοιπο το μεταφέρω σε Nucleospin Bead Tube. Προσθέτουμε στο tube 700μl από το SL2.
2. Προσθέτουμε 150μl από το SX.
3. Vortex για 5 λεπτά.
4. Φυγοκentrηση για 2 min στα 11,000g. Βάζουμε σε ένα eppendorf το υπερκείμενο και πετάμε το ίζημα. Στο υπερκείμενο προσθέτουμε 150μl SL3 και κάνουμε vortex για 5sec. Επώαση για 5min στους 0-4°C. Φυγοκentrηση για 1 min στα 11,000g.
5. Προσθέτουμε 700μl από το υπερκείμενο σε ένα collection tube το οποίο έχει φίλτρο Nucleospin Inhibitor Removal Column. Φυγοκentrηση για 1min στα 11,000g. Αφαιρούμε το φίλτρο.
6. Προσθέτουμε 250μl SB και vortex για 5sec.

7. Τοποθετούμε ένα Nucleospin Soil Column στο collection tube. Φορτώνουμε 550μl δείγματος στη στήλη. Φυγοκέντρωση για 1min στα 11,000g. Απορρίπτουμε το υγρό και βάζουμε τη στήλη πίσω στο collection tube.

8. 1^η πλύση: 500μl στο Nucleospin Soil Column. Φυγοκέντρωση για 30sec στα 11,000g. Απορρίπτουμε το υγρό και τοποθετούμε πίσω τη στήλη.

2^η πλύση: 550μl SW1 στο Nucleospin Soil Column. Φυγοκέντρωση για 30sec στα 11,000g. Απορρίπτουμε το υγρό και τοποθετούμε πίσω τη στήλη.

3^η πλύση: 700μl SW2 στο Nucleospin Soil Column. Κάνουμε vortex για 2sec. Φυγοκέντρωση για 30sec στα 11,000g. Απορρίπτουμε το υγρό και τοποθετούμε πίσω τη στήλη.

4^η πλύση: 700μl SW2 στο Nucleospin Soil Column. Κάνουμε vortex για 2sec. Φυγοκέντρωση για 30sec στα 11,000g. Απορρίπτουμε το υγρό και τοποθετούμε πίσω τη στήλη.

9. Φυγοκέντρωση για 2min στα 11,000g.

10. Τοποθετούμε το Nucleospin Soil Column σε ένα καινούριο tube. Προσθέτουμε 30μl SE στη στήλη του δείγματος και το αφήνουμε για 3min σε θερμοκρασία δωματίου με ανοιχτό καπάκι. Κάνουμε φυγοκέντρωση για 1min στα 11,000g.

- **4^η Απομόνωση του DNA**

Για την απομόνωση DNA από το ξύλο χρησιμοποιήθηκε το δείγμα 8 (400mgr), το οποίο και χωρίστηκε στη μέση (δείγματα 8 και 8'). Η 4^η απομόνωση του DNA από τα κονιορτοποιήμενα δείγματα 8 και 8' έγινε με τη βοήθεια του kit **Genomic DNA from Plant II Nucleospin kit** (Macherey-Nagel, Germany) 2 φορές, τη μία με το buffer PL1 και την άλλη με το buffer PL2.

Η απομόνωση του DNA έγινε με βάση τις οδηγίες του kit. Δηλαδή:

Δείγμα 8 και Buffer PL1

1. 200mgr δείγμα και buffer PL1
2. Προσθήκη 800μl PL1 στο καινούριο tube που έχω βάλει το δείγμα και επώαση για 30min στους 65⁰C.
3. Τοποθετούμε ένα Nucleospin Filter σε ένα καινούριο Collection Tube και φορτώνω το δείγμα στη στήλη. Φυγοκέντρωση για 2min στα 11,000g. Συλλογή του υπερκείμενου και απόρριψη της στήλης.
4. Προσθήκη 900μl PC και vortex.

5. Τοποθετούμε μία Nucleospin Plant II Column σε ένα καινούριο Collection Tube και φορτώνουμε 700μl από το δείγμα. Φυγοκέντρωση για 1min στα 11,000g και απόρριψη του υπερκείμενου
6. 1^η πλύση: Προσθήκη 800μl PW1 στη Nucleospin Plant II Column. Φυγοκέντρωση για 1min στα 11,000g και απόρριψη του υπερκείμενου
2^η πλύση: Προσθήκη 700μl PW2 στη στήλη. Φυγοκέντρωσης για 1min στα 11,000g και απόρριψη του υπερκείμενου.
3^η πλύση: Προσθήκη 700μl PW2 στη στήλη. Φυγοκέντρωσης για 1min στα 11,000g και απόρριψη του υπερκείμενου
7. Τοποθετούμε τη Nucleospin Plant II Column σε ένα eppendorf. Βάζουμε 25μl PE και επωάζουμε για 5 λεπτά στους 65⁰C. Φυγοκέντρωση για 1min στα 11,000g. Βάζουμε άλλα 25μl PE και ακολουθούμε την ίδια διαδικασία.

Δείγμα 8' και Buffer PL2

1. 200mgr δείγμα και buffer PL2.
2. Προσθήκη 600μl PL2 στο καινούριο tube που έχω βάλει το δείγμα και επώαση για 30min στους 65⁰C. Προσθήκη 150μl PL3 και επώαση για 5min στον πάγο.
3. Τοποθετούμε ένα Nucleospin Filter σε ένα καινούριο Collection Tube και φορτώνω το δείγμα στη στήλη. Φυγοκέντρωση για 2min στα 11,000g. Συλλογή του υπερκείμενου και απόρριψη της στήλης.
4. Προσθήκη 900μl PC και vortex.
5. Τοποθετούμε μία Nucleospin Plant II Column σε ένα καινούριο Collection Tube και φορτώνουμε 700μl από το δείγμα. Φυγοκέντρωση για 1min στα 11,000g και απόρριψη του υπερκείμενου.
6. 1^η πλύση: Προσθήκη 800μl PW1 στη Nucleospin Plant II Column. Φυγοκέντρωση για 1min στα 11,000g και απόρριψη του υπερκείμενου.
2^η πλύση: Προσθήκη 700μl PW2 στη στήλη. Φυγοκέντρωσης για 1min στα 11,000g και απόρριψη του υπερκείμενου.
3^η πλύση: Προσθήκη 700μl PW2 στη στήλη. Φυγοκέντρωσης για 1min στα 11,000g και απόρριψη του υπερκείμενου.
7. Τοποθετούμε τη Nucleospin Plant II Column σε ένα eppendorf. Βάζουμε 25μl PE και επωάζουμε για 5 λεπτά στους 65⁰C. Φυγοκέντρωση για 1min στα 11,000g. Βάζουμε άλλα 25μl PE και ακολουθούμε την ίδια διαδικασία.

- **5^η Απομόνωση του DNA**

Για την απομόνωση DNA από το ξύλο χρησιμοποιήθηκε το δείγμα 9, στο οποίο προστέθηκε buffer που περιέχει SDS 5%, EDTA 0,5M και πρωτεΐνάση K 12,5mg/ml σε ποσότητα 420μl. Μετά την προσθήκη του buffer το δείγμα αφήνεται να επωαστεί για 15 ώρες. Η 5^η απομόνωση του DNA από το κονιορτοποιημένο δείγμα 9 έγινε με τη βοήθεια του kit **Genomic DNA from Soil Nucleospin kit** (Macherey-Nagel, Germany).

Η απομόνωση του DNA έγινε με βάση τις οδηγίες του kit. Δηλαδή:

1. Φυγοκέντρηση στα 11,000g για 2min. Κρατάω το υπερκείμενο για control και το υπόλοιπο το μεταφέρω σε Nucleospin Bead Tube. Προσθέτουμε στο tube 700μl από το SL2.
2. Προσθέτουμε 150μl από το SX.
3. Vortex για 5 λεπτά.
4. Φυγοκέντρηση για 2 min στα 11,000g. Βάζουμε σε ένα eppendorf το υπερκείμενο και πετάμε το ίζημα. Στο υπερκείμενο προσθέτουμε 150μl SL3 και κάνουμε vortex για 5sec. Επώαση για 5min στους 0-4⁰C. Φυγοκέντρηση για 1 min στα 11,000g.
5. Προσθέτουμε 700μl από το υπερκείμενο σε ένα collection tube το οποίο έχει φίλτρο Nucleospin Inhibitor Removal Column. Φυγοκέντρηση για 1min στα 11,000g. Αφαιρούμε το φίλτρο.
6. Προσθέτουμε 250μl SB και vortex για 5sec.
7. Τοποθετούμε ένα Nucleospin Soil Column στο collection tube. Φορτώνουμε 550μl δείγματος στη στήλη. Φυγοκέντρηση για 1min στα 11,000g. Απορρίπτουμε το υγρό και βάζουμε τη στήλη πίσω στο collection tube.
8. 1^η πλύση: 500μl στο Nucleospin Soil Column. Φυγοκέντρηση για 30sec στα 11,000g. Απορρίπτουμε το υγρό και τοποθετούμε πίσω τη στήλη.
- 2^η πλύση: 550μl SW1 στο Nucleospin Soil Column. Φυγοκέντρηση για 30sec στα 11,000g. Απορρίπτουμε το υγρό και τοποθετούμε πίσω τη στήλη.
- 3^η πλύση: 700μl SW2 στο Nucleospin Soil Column. Κάνουμε vortex για 2sec. Φυγοκέντρηση για 30sec στα 11,000g. Απορρίπτουμε το υγρό και τοποθετούμε πίσω τη στήλη.
- 4^η πλύση: 700μl SW2 στο Nucleospin Soil Column. Κάνουμε vortex για 2sec. Φυγοκέντρηση για 30sec στα 11,000g. Απορρίπτουμε το υγρό και τοποθετούμε πίσω τη στήλη.

9. Φυγοκέντρωση για 2min στα 11,000g.

10. Τοποθετούμε το Nucleospin Soil Column σε ένα καινούριο tube. Προσθέτουμε 30μl SE στη στήλη του δείγματος και το αφήνουμε για 3min σε θερμοκρασία δωματίου με ανοιχτό καπάκι. Κάνουμε φυγοκέντρωση για 1min στα 11,000g.

- **6^η Απομόνωση του DNA**

Για την απομόνωση DNA από το ξύλο χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα ξύλου 2 και 7, το καθένα από τα οποία το χωρίσαμε στη μέση (δείγματα 2, 2', 7, 7'). Η 6^η απομόνωση του DNA από τα κονιορτοποιήμενα δείγματα 2, 2', 7, 7' έγινε με τη βοήθεια του kit **Genomic DNA from Plant II Nucleospin kit** (Macherey-Nagel, Germany) 2 φορές, τη μία με το buffer PL1 και την άλλη με το buffer PL2. Η απομόνωση του DNA έγινε με βάση τις οδηγίες του kit που περιγράφηκαν και παραπάνω. (Στην 4^η απομόνωση του DNA)

3.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αποτελεί μια γρήγορη, εύκολη και οικονομική τεχνική που επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό in vitro επιλεγμένων αλληλουχιών DNA.

Η μέθοδος βασίζεται στη επαναλαμβανόμενη αντιγραφή ενός τμήματος DNA (γνωστού ή άγνωστου) με τη βοήθεια μιας ειδικής θερμοανθεκτικής πολυμεράσης και δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών σχεδιασμένων με γνωστές αλληλουχίες. Έτσι, ένα δείγμα DNA αναμειγνύεται με τα τέσσερα δεοξυριβονουκλεοτίδια, τα δύο εναρκτήρια ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές, primers) και την ειδική DNA πολυμεράση. Το δείγμα θερμαίνεται στους 94-95⁰C για να αποδιαταχθεί το DNA και ακολούθως ψύχεται στους 50-65⁰C για να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές με τις αποδιαταγμένες αλυσίδες του DNA. Ακολουθεί πολυμερισμός στους 72⁰C και τα παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονται πολλές φορές έως ότου συντεθεί αρκετή ποσότητα του επιθυμητού προϊόντος.

3.5.1 Touchdown PCR

Η Touchdown PCR είναι μια μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με την οποία οι εκκινητές αποφεύγουν την ενίσχυση μη ειδικών αλληλουχιών. Η θερμοκρασία υβριδισμού κατά τη διάρκεια της αντίδρασης καθορίζει την εξειδίκευση υβριδισμού του εκκινητή. Είναι ουσιαστικά μία μέθοδος που αυξάνει

την ειδικότητα των αντιδράσεων PCR. Χρησιμοποιεί ένα πρόγραμμα κατά το οποίο η θερμοκρασία υβριδισμού σταδιακά μειώνεται (π.χ. 1-2°C/κάθε δεύτερος κύκλος). Η αρχική θερμοκρασία υβριδισμού πρέπει να είναι κατά πολλούς βαθμούς πάνω από την εκτιμώμενη T_m των εκκινητών.

3.5.2 Εκφυλισμένοι Εκκινητές

Οι εκφυλισμένοι εκκινητές αποτελούν μίγματα παρόμοιων εκκινητών που μια ή περισσότερες από τις θέσεις μπορούν να έχουν εναλλακτικές βάσεις. Οι εκφυλισμένες αυτές βάσεις αντιπροσωπεύονται με συγκεκριμένα γράμματα, κάθε ένα από τα οποία υποδηλώνουν έναν τύπο παραλλαγής.

Οι εκφυλισμένοι εκκινητές χρησιμοποιούνται στην περίπτωση όπου είναι αναγκαία η ενίσχυση μιας αλληλουχίας DNA ενός οργανισμού, η οποία είναι γνωστή σε συγγενή οργανισμό ή η ταυτόχρονη ενίσχυση μιας αλληλουχίας DNA σε διαφορετικούς οργανισμούς δεδομένου ότι οι αλληλουχίες παρουσιάζουν ομοιότητα σε μεγάλο βαθμό. Όσο περισσότερο είναι απομακρυσμένοι οι οργανισμοί τόσο δυσκολότερο είναι να σχεδιαστούν εκκινητές.

3.6 Ενίσχυση γονιδίων ημικυτταρινάσης με Touchdown PCR

Χρησιμοποιώντας κάθε φορά διαφορετικά δείγματα ξύλου, στα οποία πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA παραπάνω, και διαφορετικούς εκφυλισμένους εκκινητές, οι οποίοι είναι σχεδιασμένοι να ενισχύσουν γονίδια ημικυτταρινασών, πραγματοποιήθηκαν διάφορες Touchdown PCR.

Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι Touchdown PCR ήταν συγκεκριμένες. (Πίνακας 1) Δηλαδή,

Θερμοκρασίες	Χρόνος	
94°C	5min	
94°C	30sec	} 30 cycles
X°C	30sec(-0,5°C/κύκλο)	
72°C	30sec	
94°C	30sec	} 20 cycles
Y°C	30sec	
72°C	30sec	
72°C	10min	
4°C	Infinity	

Πίνακας 1: Θερμοκρασίες αντίδρασης Touchdown PCR για την ενίσχυση γονιδίων ημικυτταρινασών.

Όπου τα Χ,Υ,τα οποία είναι θερμοκρασίες, μεταβάλλονται ανάλογα με το ζευγάρι εκφυλισμένων εκκινητών που χρησιμοποιείται.

Το ξύλο αποτελεί ιδανικό υπόστρωμα για τα ένζυμα που απελευθερώνονται από τους μικροοργανισμούς που το αποικίζουν. Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω πέντε ζευγάρια εκφυλισμένων εκκινητών που καθορίζουν και τις συνθήκες της Touchdown PCR. (Πίνακας 2)

GH2	β-Galactosidase	GH2F: GTGCGYACSWBCAYTAYCC GH2R: CCAAATRAYRATGCTYGGRTGRTT	204-219bp
GH11	Endo-xylanase	GH11F: TAYMTGDSNSTBTAYGGBTGG GH11R: TRCCYCTYCTYTKRTAYCCYTC	336bp
GH39	β-Xylosidase	GH39F: TTYGARGTNTGGAAYGARCC GH39R: GCRTGNCKISWIACRAARTC	223-230bp

Πίνακας 2: Εκφυλισμένοι εκκινητές σχεδιασμένοι να ενισχύσουν τμήματα γονιδίων ημικυτταρίνης.

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ανάλογα με το ζεύγος εκφυλισμένων εκκινητών που χρησιμοποιείται, μεταβάλλονται κάθε φορά και οι συνθήκες τις Touchdown PCR.(Πίνακας 3) Πιο συγκεκριμένα,

GH2	X=62°C	Y=52°C
GH11	X=60°C	Y=48°C
GH39	X=65°C	Y=50°C

Πίνακας 3: Θερμοκρασίες της Touchdown PCR σύμφωνα με τους εκφυλισμένους εκκινητές.

• **1^η TOUCHDOWN PCR**

Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές GH11F και GH11R. Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση *ExTaq* και οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων φαίνονται στον Πίνακα 4:

Αντιδραστήρια	Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
<i>ExTaq</i> buffer	10X	1X
dNTPs	2.5mM	250μM
GH11F primer	23,4μM	0,6μM
GH11R primer	20,1μM	0,6μM
<i>ExTaq</i> DNA polymerase	5u/μl	2units

Πίνακας 4: Οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της Touchdown PCR με την *ExTaq* DNA πολυμεράση για την ενίσχυση γονιδίων ημικυτταρίνης.

Η αντίδραση της Touchdown PCR έγινε σε τελικό όγκο 50μl και χρησιμοποιήθηκαν ως DNA-μήτρα 3 δείγματα ξύλου από την απομόνωση που κάναμε με το kit

Nucleospin Soil (Macherey-Nagel, Germany) και 3 δείγματα ξύλου από την απομόνωση που πραγματοποιήθηκε βασισμένη στο άρθρο "Identification and Characterization of a Cellulase-Enconding Gene from Buffalo Rumen Metagenomic Library". Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν, φαίνονται στους Πίνακες 5,6 που ακολουθούν.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μl)
H ₂ O	230,64
<i>ExTaq</i> buffer	40
dNTPS	40
GH11F primer	10,24
GH11R primer	11,92
<i>ExTaq</i> DNA polymerase	3,2

Πίνακας 5: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την Touchdown PCR.

	Nucleospin Soil			Article			Negative
	1	2	3	4	5	6	7
DNA template	4μl	6 μl	8 μl	1 μl	0,5 μl	1 μl	-
H ₂ O	4 μl	2 μl	-	7 μl	7,5 μl	7 μl	8 μl

Πίνακας 6: Πόσοτητες από τα DNA templates που χρησιμοποιούνται στην Touchdown PCR.

• **2^H TOUCHDOWN PCR**

Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές GH11F και GH11R. Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση *ExTaq* και οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων φαίνονται στον Πίνακα 7:

Αντιδραστήρια	Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
<i>ExTaq</i> buffer	10X	1X
dNTPs	2.5mM	250μM
GH11F primer	23,4μM	0,6μM
GH11R primer	20,1μM	0,6μM
<i>ExTaq</i> DNA polymerase	5u/μl	2units

Πίνακας 7: Οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της Touchdown PCR με την *ExTaq* DNA πολυμεράση για την ενίσχυση γονιδίων ημικυτταρίνης.

Η αντίδραση της Touchdown PCR έγινε σε τελικό όγκο 50μl και χρησιμοποιήθηκαν ως DNA-μήτρα 2 δείγματα ξύλου από την απομόνωση που κάναμε με το kit Nucleospin Plant II (Macherey-Nagel, Germany) και 3 δείγματα ξύλου από την απομόνωση που πραγματοποιήθηκε βασισμένη στο άρθρο "Identification and Characterization of a Cellulase-Enconding Gene from Buffalo Rumen Metagenomic Library". Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν, φαίνονται στους Πίνακες 8,9 που ακολουθούν.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μl)
H ₂ O	201,81
<i>ExTaq</i> buffer	35
dNTPS	35
GH11F primer	8,96
GH11R primer	10,43
<i>ExTaq</i> DNA polymerase	2,8

Πίνακας 8: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την Touchdown PCR.

	Nucleospin Plant II		Article			Negative
	1	2	3	4	5	6
DNA template	8 μl	8 μl	2,5 μl	5 μl	2 μl	1 μl
H ₂ O	-	-	5,5 μl	7 μl	6 μl	7 μl

Πίνακας 9: Πόσοιτες από τα DNA templates που χρησιμοποιούνται στην Touchdown PCR.

• **3^η TOUCHDOWN PCR**

Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές GH11F και GH11R. Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση *Dream Taq* και οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων φαίνονται στον Πίνακα 10:

Αντιδραστήρια	Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
<i>Dream Taq</i> buffer	10X	1X
dNTPs	2.5mM	250μM
GH11F primer	23,4μM	0,6μM
GH11R primer	20,1μM	0,6μM
<i>Dream Taq</i> DNA polymerase	5u/μl	2units

Πίνακας 10: Οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της Touchdown PCR με την *Dream Taq* DNA πολυμεράση για την ενίσχυση γονιδίων ημικυτταρίνης.

Η αντίδραση της Touchdown PCR έγινε σε τελικό όγκο 50μl και χρησιμοποιήθηκαν ως DNA-μήτρα 2 δείγματα ξύλου από την απομόνωση που κάναμε με το kit Nucleospin Plant II (Macherey-Nagel, Germany). Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν, φαίνονται στους Πίνακες 11,12 που ακολουθούν.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μl)
H ₂ O	115,32
<i>Dream Taq</i> buffer	20
dNTPS	20
GH11F primer	5,12
GH11R primer	5,96
<i>Dream Taq</i> DNA polymerase	1,6

Πίνακας 11: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την Touchdown PCR.

	Nucleospin Plant II		Negative
	1	2	3
DNA template	8 μ l	8 μ l	-
H ₂ O	-	-	8 μ l

Πίνακας 12: Πόσοτητες από τα DNA templates που χρησιμοποιούνται στην Touchdown PCR.

- **4^η TOUCHDOWN PCR**

Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές GH11F και GH11R. Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση *Dream Taq* και οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων φαίνονται στον Πίνακα 13:

Αντιδραστήρια	Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
<i>Dream Taq</i> buffer	10X	1X
dNTPs	2.5mM	250 μ M
GH11F primer	23,4 μ M	0,6 μ M
GH11R primer	20,1 μ M	0,6 μ M
<i>Dream Taq</i> DNA polymerase	5u/ μ l	2units

Πίνακας 13: Οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της Touchdown PCR με την *Dream Taq* DNA πολυμεράση για την ενίσχυση γονιδίων ημικυτταρίνης.

Η αντίδραση της Touchdown PCR έγινε σε τελικό όγκο 50 μ l και χρησιμοποιήθηκαν ως DNA-μήτρα 4 δείγματα ξύλου από την απομόνωση που κάναμε με το kit Nucleospin Plant II (Macherey-Nagel, Germany). Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν, φαίνονται στους Πίνακες 14,15 που ακολουθούν.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μ l)
H ₂ O	160,98
<i>Dream Taq</i> buffer	30
dNTPS	30
GH11F primer	7,68
GH11R primer	8,94
<i>Dream Taq</i> DNA polymerase	2,4

Πίνακας 14: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την Touchdown PCR.

	Nucleospin Plant II				Negative
	1	2	3	4	5
DNA template	6 μ l	10 μ l	6 μ l	10 μ l	-
H ₂ O	4 μ l	-	4 μ l	-	10 μ l

Πίνακας 15: Πόσοτητες από τα DNA templates που χρησιμοποιούνται στην Touchdown PCR.

- **5^H TOUCHDOWN PCR**

Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές GH11F και GH11R. Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση *KappaTaq* και οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων φαίνονται στον Πίνακα 16:

Αντιδραστήρια	Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
<i>KappaTaq</i> buffer	10X	1X
dNTPs	2.5mM	250μM
GH11F primer	23,4μM	0,6μM
GH11R primer	20,1μM	0,6μM
<i>KappaTaq</i> DNA polymerase	5u/μl	1unit

Πίνακας 16: Οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της Touchdown PCR με την *KappaTaq* DNA πολυμεράση για την ενίσχυση γονιδίων ημικυτταρίνης.

Η αντίδραση της Touchdown PCR έγινε σε τελικό όγκο 50μl και χρησιμοποιήθηκαν ως DNA-μήτρα 3 δείγματα ξύλου από την απομόνωση που κάναμε με το kit Nucleospin Plant II (Macherey-Nagel, Germany) και 3 δείγματα ξύλου από την απομόνωση που κάναμε με το kit Nucleospin Soil. Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν, φαίνονται στους Πίνακες 17,18 που ακολουθούν.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μl)
H ₂ O	248,24
<i>KappaTaq</i> buffer	40
dNTPS	40
GH11F primer	10,24
GH11R primer	11,92
<i>KappaTaq</i> DNA polymerase	1,6

Πίνακας 17: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την Touchdown PCR.

	Nucleospin Plant II			Nucleospin Soil			Negative
	1	2	3	4	5	6	
DNA template	2 μl	4 μl	6 μl	1 μl	2 μl	6 μl	-
H ₂ O	4 μl	2 μl	-	5 μl	4 μl	-	6 μl

Πίνακας 18: Πόσοιτες από τα DNA templates που χρησιμοποιούνται στην Touchdown PCR.

- **6^H TOUCHDOWN PCR**

Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές GH11F και GH11R. Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση *KappaTaq* και οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων φαίνονται στον Πίνακα 19:

Αντιδραστήρια	Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
<i>KappaTaq</i> buffer	10X	1X
dNTPs	2.5mM	250μM
GH11F primer	23,4μM	0,6μM
GH11R primer	20,1μM	0,6μM
<i>KappaTaq</i> DNA polymerase	5u/μl	1unit

Πίνακας 19: Οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της Touchdown PCR με την *KappaTaq* DNA πολυμεράση για την ενίσχυση γονιδίων ημικυτταρίνης.

Η αντίδραση της Touchdown PCR έγινε σε τελικό όγκο 50μl και χρησιμοποιήθηκαν ως DNA-μήτρα 1 δείγμα ξύλου από την απομόνωση που κάναμε με το kit Nucleospin Plant II (Macherey-Nagel, Germany) και 1 δείγμα ξύλου από την απομόνωση που κάναμε με το kit Nucleospin Soil. Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν, φαίνονται στους Πίνακες 20,21 που ακολουθούν.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μl)
H ₂ O	128,12
<i>KappaTaq</i> buffer	20
dNTPS	20
GH11F primer	5,12
GH11R primer	5,96
<i>KappaTaq</i> DNA polymerase	0,8

Πίνακας 20: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την Touchdown PCR.

	Nucleospin Plant II	Nucleospin Soil	Negative
	1	2	3
DNA template	1 μl	5 μl	-
H ₂ O	4 μl	-	5 μl

Πίνακας 21: Πόσοιτες από τα DNA templates που χρησιμοποιούνται στην Touchdown PCR.

- 7^Η TOUCHDOWN PCR

Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές GH2F και GH2R. Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση *KappaTaq* και οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων φαίνονται στον Πίνακα 22:

Αντιδραστήρια	Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
<i>KappaTaq</i> buffer	10X	1X
dNTPs	2.5mM	250μM
GH2F primer	8,4μM	0,6μM
GH2R primer	26,2μM	0,6μM
<i>KappaTaq</i> DNA polymerase	5u/μl	1unit

Πίνακας 22: Οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της Touchdown PCR με την *KappaTaq* DNA πολυμεράση για την ενίσχυση γονιδίων ημικυτταρίνης.

Η αντίδραση της Touchdown PCR έγινε σε τελικό όγκο 50μl και χρησιμοποιήθηκαν ως DNA-μήτρα 2 δείγματα ξύλου από την απομόνωση που κάναμε με το kit Nucleospin Plant II (Macherey-Nagel, Germany) και 2 δείγματα ξύλου από την απομόνωση που κάναμε με το kit Nucleospin Soil. Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν, φαίνονται στους Πίνακες 23,24 που ακολουθούν.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μl)
H ₂ O	209,04
<i>KappaTaq</i> buffer	30
dNTPS	7,5
GH2F primer	21,42
GH2R primer	6,84
<i>KappaTaq</i> DNA polymerase	1,2

Πίνακας 23: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την Touchdown PCR.

	Nucleospin Plant II		Nucleospin Soil		Negative
	1	2	3	4	5
DNA template	2 μl	4 μl	2 μl	4 μl	-
H ₂ O	2 μl	-	2 μl	-	4 μl

Πίνακας 24: Πόσοιτες από τα DNA templates που χρησιμοποιούνται στην Touchdown PCR.

• **8^H TOUCHDOWN PCR**

Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές GH39F και GH39R. Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση *KappaTaq* και οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων φαίνονται στον Πίνακα 26:

Αντιδραστήρια	Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
<i>KappaTaq</i> buffer	10X	1X
dNTPs	2.5mM	250μM
GH39F primer	20,6μM	0,6μM
GH39R primer	27,2μM	0,6μM
<i>KappaTaq</i> DNA polymerase	5u/μl	1unit

Πίνακας 26: Οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της Touchdown PCR με την *KappaTaq* DNA πολυμεράση για την ενίσχυση γονιδίων ημικυτταρίνης.

Η αντίδραση της Touchdown PCR έγινε σε τελικό όγκο 50μl και χρησιμοποιήθηκαν ως DNA-μήτρα 3 δείγματα ξύλου από την απομόνωση που κάναμε με το kit Nucleospin Plant II. Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν, φαίνονται στους Πίνακες 27,28 που ακολουθούν.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μl)
H ₂ O	185
<i>KappaTaq</i> buffer	25
dNTPS	1
GH39F primer	7,25
GH39R primer	5,5
<i>KappaTaq</i> DNA polymerase	1

Πίνακας 27: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την Touchdown PCR.

	Nucleospin Plant II			Negative
	1	2	3	4
DNA template	1 μl	2 μl	4 μl	-
H ₂ O	3 μl	2 μl	-	4 μl

Πίνακας 28: Πόσοιτες από τα DNA templates που χρησιμοποιούνται στην Touchdown PCR.

• 9^η TOUCHDOWN PCR

Χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές GH39F και GH39R. Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση *KappaTaq* και οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων φαίνονται στον Πίνακα 29:

Αντιδραστήρια	Αρχικές συγκεντρώσεις	Τελικές συγκεντρώσεις
<i>KappaTaq</i> buffer	10X	1X
dNTPs	2.5mM	250μM
GH39F primer	20,6μM	0,6μM
GH39R primer	27,2μM	0,6μM
<i>KappaTaq</i> DNA polymerase	5u/μl	1unit

Πίνακας 29: Οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της Touchdown PCR με την *KappaTaq* DNA πολυμεράση για την ενίσχυση γονιδίων ημικυτταρίνης.

Η αντίδραση της Touchdown PCR έγινε σε τελικό όγκο 50μl και χρησιμοποιήθηκαν ως DNA-μήτρα 3 δείγματα ξύλου από την απομόνωση που κάναμε με το kit Nucleospin Plant II και 3 δείγματα ξύλου από την απομόνωση που κάναμε με το kit Nucleospin Soil. Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν, φαίνονται στους Πίνακες 30,31 που ακολουθούν.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (μl)
H ₂ O	280
<i>KappaTaq</i> buffer	40
dNTPS	10
GH39F primer	11,6
GH39R primer	8,8
<i>KappaTaq</i> DNA polymerase	1,6

Πίνακας 30: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την Touchdown PCR.

	Nucleospin Plant II			Nucleospin Soil			Negative
	1	2	3	4	5	6	7
DNA template	2 μ l	4 μ l	6 μ l	1 μ l	2 μ l	3 μ l	-
H ₂ O	4 μ l	2 μ l	-	5 μ l	4 μ l	3 μ l	6 μ l

Πίνακας 31: Πόσοιτες από τα DNA templates που χρησιμοποιούνται στην Touchdown PCR.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Ηλεκτροφόρηση

Μετά από κάθε απομόνωση DNA ακολουθεί για κάθε δείγμα ηλεκτροφόρηση, η ηλεκτροχημική μέθοδος διαχωρισμού ηλεκτρικά φορτισμένων σωματιδίων (συνήθως νουκλεϊνικής ή πρωτεϊνικής φύσης) από ένα μίγμα τους. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης χωρίζεται σε τρία στάδια:

1. Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης, κατάλληλης συγκέντρωσης για το μέγεθος των μορίων του DNA που επιθυμούμε να διαχωρίσουμε.
2. Τοποθέτηση των δειγμάτων στις θέσεις υποδοχής τους στο πήκτωμα και εφαρμογή της κατάλληλης ηλεκτρικής τάσης στη δεξαμενή ηλεκτροφόρησης για τη βέλτιστη χρονική περίοδο για τον διαχωρισμό των μορίων DNA.
3. Χρώση του πηκτώματος (αν αυτή δεν έχει πραγματοποιηθεί κατά το στάδιο παρασκευής του) με κατάλληλες ουσίες που προσδένονται στο DNA και στη συνέχεια άμεση παρατήρηση και φωτογράφησή του σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

Για τη δημιουργία του πηκτώματος αναμιγνύεται αγαρόζη σε σκόνη με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα TBE και το μίγμα θερμαίνεται μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη. Στη συνέχεια, το μίγμα τοποθετείται σε κατάλληλο εκμαγείο και προστίθενται εξαρτήματα που μοιάζουν με χτένες και δημιουργούν τα μικρά βοθρία υποδοχής του δείγματος. Το πήκτωμα εμβαπτίζεται στο λουτρό ηλεκτροφόρησης σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (TAE ή TBE) και με τη βοήθεια τροφοδοτικού εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Το ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται οδηγεί τα αρνητικά φορτισμένα μόρια του DNA να κινηθούν προς την κάθοδο. Η ηλεκτρική τάση ασκείται για τον βέλτιστο χρόνο που απαιτείται για τον διαχωρισμό των μορίων του DNA. Η προσθήκη κατάλληλων χρωστικών επιτρέπει την παρατήρηση των διαχωρισμένων μορίων DNA σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

4.1.1 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης μετά από απομόνωση DNA

- Μετά την **1^η Απομόνωση DNA** από τα κονιορτοποιήμενα δείγματα 1 και 2 έγινε με τη βοήθεια του kit **Genomic DNA from Soil Nucleospin kit** (Macherey-Nagel, Germany).

1^η Ηλεκτροφόρηση: Χρησιμοποιήθηκαν 100ml TBE, 0,8gr αγάροζη, 5μl Midori Green Advance DNA Stain(αντίστοιχη του βρωμιούχου αιθιδίου) , 2μl green loading buffer και 5μl ladder 100bp. Από τα δείγματα 1 και 2 χρησιμοποιήσαμε 1,5μl και 2,5μl αντίστοιχα. Η ηλεκτροφόρηση δεν έδειξε ζώνες.

2^η Ηλεκτροφόρηση: Χρησιμοποιήσαμε 100ml TBE, 0,8gr αγάροζη, 5μl Midori Green Advance DNA Stain(αντίστοιχη του βρωμιούχου αιθιδίου) , 2μl loading buffer και 5μl ladder 100bp. Από το δείγμα 1 χρησιμοποιήσαμε 4μl και από το δείγμα 2 χρησιμοποιήσαμε 2,5μl και 6μl. Επίσης, φορτώσαμε και από τα υπερκείμενα των δειγμάτων 1 και 2 από 10μl. Η ηλεκτροφόρηση έδειξε αχνές ζώνες στα υπερκείμενα των δειγμάτων, αλλά οι ζώνες υποδείκνυαν πως επρόκειτο για RNA και όχι DNA.

3^η Ηλεκτροφόρηση: Χρησιμοποιήθηκαν 100ml TBE, 100 μl βρωμιούχου αιθιδίου, 0,8gr αγάροζης και ladder 100bp. Από τα δείγματα 1 και 2 χρησιμοποιήσαμε 5 μl από το 1 και 8 μl από 2 Η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 120volt. Δεν υπήρξαν αποτελέσματα.

- Μετά την **2^η Απομόνωση DNA** από το κονιορτοποιημένο δείγμα 5 βασίστηκε στο **“Identification and Characterization of a Cellulase-Enconding Gene from Buffalo Rumen Metagenomic Library”**.

4^η Ηλεκτροφόρηση: Χρησιμοποιήθηκαν 100ml TBE, 0,8gr αγάροζη, 100μl βρωμιούχου αιθιδίου , 2μl loading buffer και 3μl ladder 250bp. Προστέθηκαν 10μl από το δείγμα 5. Δεν υπήρξαν αποτελέσματα.

5^η Ηλεκτροφόρηση: Πραγματοποιήθηκε πρώτα καθαρισμός του δείγματος 5 με ισοπροπανόλη και παγωμένη αιθανόλη 70% και έπειτα πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση με 100ml TBE, 0,8gr αγάροζη, 100μl βρωμιούχου αιθιδίου , 2μl loading buffer 3μl ladder 250bp και 10μl από το δείγμα 5. Δεν υπήρξαν αποτελέσματα.

- Μετά την **3^η Απομόνωση DNA** από το κονιορτοποιήμενο δείγμα 3 έγινε με τη βοήθεια του kit **Genomic DNA from Soil Nucleospin kit** (Macherey-Nagel, Germany).

6^η Ηλεκτροφόρηση: Χρησιμοποιήθηκαν 100ml TBE, 0,8gr αγάροζη, 100μl βρωμιούχου αιθιδίου , 2μl loading buffer και 3μl ladder 250bp. Προσθέσαμε 10μl από το δείγμα 3 και 10μl από το υπερκείμενο του δείγματος 3. Δεν υπήρξαν αποτελέσματα

- Μετά την **4^η Απομόνωση DNA** από τα κονιορτοποιήμενα δείγματα 8 και 8' έγινε με τη βοήθεια του kit **Genomic DNA from Plant II Nucleospin kit** (Macherey-Nagel, Germany)

7^η Ηλεκτροφόρηση: Χρησιμοποιήθηκαν 100ml TBE, 0,8gr αγάροζη, 100μl βρωμιούχου αιθιδίου, 2μl loading buffer και 3μl ladder 250bp. Προστέθηκαν 10μl από το δείγμα 8 και 10μl από το δείγμα 8'. Δεν υπήρξαν αποτελέσματα.

- Μετά την **5^η Απομόνωση DNA** από το κονιορτοποιήμενο δείγμα 9 έγινε με τη βοήθεια του kit **Genomic DNA from Soil Nucleospin kit** (Macherey-Nagel, Germany).

8^η Ηλεκτροφόρηση: Χρησιμοποιήθηκαν 100ml TBE, 0,8gr αγάροζη, 100μl βρωμιούχου αιθιδίου, 2μl loading buffer και 3μl ladder 250bp. Προσθέσαμε 10μl από το δείγμα 9. Δεν υπήρξαν αποτελέσματα.

- Μετά την **6^η Απομόνωση DNA** από τα κονιορτοποιήμενα δείγματα 2, 2', 7, 7' έγινε με τη βοήθεια του kit **Genomic DNA from Plant II Nucleospin kit** (Macherey-Nagel, Germany).

9^η Ηλεκτροφόρηση: Χρησιμοποιήθηκαν 100ml TBE, 0,8gr αγάροζη, 100μl βρωμιούχου αιθιδίου, 2μl loading buffer και 3μl ladder 250bp. Προσθέσαμε 10μl από τα δείγματα 2,2',7,7'. Δεν υπήρξαν αποτελέσματα.



Εικόνα 19: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης μετά την απομόνωση DNA από το δείγμα ξύλου.

4.1.2 Αποτελέσματα ηλεκτροφορήσεων μετά από Touchdown PCR

- Μετά την **1^η TOUCHDOWN PCR**

10^η Ηλεκτροφόρηση: Χρησιμοποιήθηκαν 100ml TBE, 0,8gr αγάροζη, 100μl βρωμιούχου αιθιδίου, 2μl loading buffer και 3μl ladder 250bp. Προστέθηκαν 8μl από κάθε PCR δείγμα. Δεν υπήρξαν αποτελέσματα.

- Μετά την **2^η TOUCHDOWN PCR**

11^η Ηλεκτροφόρηση: Χρησιμοποιήθηκαν 100ml TBE, 0,8gr αγάροζη, 100μl βρωμιούχου αιθιδίου, 2μl loading buffer και 3μl ladder 250bp. Προστέθηκαν 8μl από κάθε PCR δείγμα. Δεν υπήρξαν αποτελέσματα.

- Μετά την **3^η TOUCHDOWN PCR**

12^η Ηλεκτροφόρηση: Χρησιμοποιήθηκαν 100ml TBE, 0,8gr αγάροζη, 100μl βρωμιούχου αιθιδίου, 2μl loading buffer και 3μl ladder 250bp. Προστέθηκαν 8μl από κάθε PCR δείγμα. Δεν υπήρξαν αποτελέσματα.

- Μετά την **4^η TOUCHDOWN PCR**

13^η Ηλεκτροφόρηση: Χρησιμοποιήθηκαν 100ml TBE, 0,8gr αγάροζη, 100μl βρωμιούχου αιθιδίου, 2μl loading buffer και 3μl ladder 250bp. Προστέθηκαν 8μl από κάθε PCR δείγμα. Δεν υπήρξαν αποτελέσματα.

- Μετά την **5^η TOUCHDOWN PCR**

14^η Ηλεκτροφόρηση: Χρησιμοποιήθηκαν 100ml TBE, 0,8gr αγάροζη, 100μl βρωμιούχου αιθιδίου, 2μl loading buffer και 3μl ladder 250bp. Προστέθηκαν 8μl από κάθε PCR δείγμα. Δεν υπήρξαν αποτελέσματα.

- Μετά την **6^η TOUCHDOWN PCR**

15^η Ηλεκτροφόρηση: Χρησιμοποιήθηκαν 100ml TBE, 0,8gr αγάροζη, 100μl βρωμιούχου αιθιδίου, 2μl loading buffer και 3μl ladder 250bp. Προστέθηκαν 8μl από κάθε PCR δείγμα. Δεν υπήρξαν αποτελέσματα.

- Μετά την **7^η TOUCHDOWN PCR**

16^η Ηλεκτροφόρηση: Χρησιμοποιήθηκαν 100ml TBE, 0,8gr αγάροζη, 100μl βρωμιούχου αιθιδίου, 2μl loading buffer και 3μl ladder 250bp. Προστέθηκαν 8μl από κάθε PCR δείγμα. Δεν υπήρξαν αποτελέσματα.

- Μετά την **8^η TOUCHDOWN PCR**

17^η Ηλεκτροφόρηση: Χρησιμοποιήθηκαν 100ml TBE, 0,8gr αγάροζη, 100μl βρωμιούχου αιθιδίου, 2μl loading buffer και 3μl ladder 250bp. Προστέθηκαν 8μl από κάθε PCR δείγμα. Δεν υπήρξαν αποτελέσματα.

- Μετά την **9^η TOUCHDOWN PCR**

18^η Ηλεκτροφόρηση: Χρησιμοποιήθηκαν 100ml TBE, 0,8gr αγάροζη, 100μl βρωμιούχου αιθιδίου, 2μl loading buffer και 3μl ladder 250bp. Προστέθηκαν 8μl από κάθε PCR δείγμα. Δεν υπήρξαν αποτελέσματα.



Εικόνα 20: Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης μετά την απομόνωση DNA από δείγμα ξύλου σε συνδυασμό με Touchdown PCR.

4.2 Φασματοφωτομετρική Ανάλυση

Μετά από κάθε απομόνωση DNA ακολουθεί επίσης για κάθε δείγμα φασματοφωτομετρική ανάλυση, για να εκτιμηθεί η ποιότητα και η καθαρότητα του απομονωμένου υλικού και να υπολογιστεί τη συγκέντρωσή του. Η μέθοδος της φασματοφωτομετρίας βασίζεται στην ιδιότητα των μορίων να απορροφούν εκλεκτικά μέρος της ακτινοβολίας του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Για κάθε χημική ένωση υπάρχει ένα χαρακτηριστικό μήκος κύματος (λ_{\max}) στο οποίο εμφανίζει τη μέγιστη απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Τα νουκλεϊκά οξέα εμφανίζουν το μέγιστο της απορρόφησής τους στα 260 nm

Η ανάλυση γίνεται στα 260nm όπου και απορροφούν τα νουκλεϊκά οξέα. 1 μονάδα απορρόφησης στα 260nm αντιστοιχεί σε:

- 50μg/ml δίκλωνου DNA
- 40μg/ml μονόκλωνου DNA ή RNA
- ~20μg/ml ολιγονουκλεοτιδίων

Ο λόγος OD_{260}/OD_{280} δίνει την καθαρότητα του δείγματος. Όταν $OD_{260}/OD_{280} = 1,8$ τότε έχουμε DNA. Όταν $OD_{260}/OD_{280} = 2$ τότε έχουμε RNA. Επίσης, ο τύπος $C_{(\mu g/ml)} = OD_{260} * \text{Συντελεστής αραίωσης} * 50$ μας δίνει τη συγκέντρωση του DNA.

Στην κουβέτα χαλαζία τοποθετούνται 200μl υλικό.

4.2.1 Φασματοφωτομετρική Ανάλυση μετά από απομόνωση DNA

- Μετά την **1^η Απομόνωση DNA** από τα κονιορτοποιήμενα δείγματα 1 και 2 έγινε με τη βοήθεια του kit **Genomic DNA from Soil Nucleospin kit** (Macherey-Nagel, Germany).

1^η Φωτομέτρηση:

	Ποσότητα υλικού	H ₂ O	Απορρόφηση	Συγκέντρωση DNA
Δείγμα 1	10μl	190 μl	0.328	382ng/ μl
Δείγμα 2	10 μl	190 μl	0.472	472ng/ μl

- Μετά την **2^η Απομόνωση DNA** από το κονιορτοποιημένο δείγμα 5 βασίστηκε στο **“Identification and Characterization of a Cellulase-Encoding Gene from Buffalo Rumen Metagenomic Library”**.

2^η Φωτομέτρηση στα 260nm

	Ποσότητα υλικού	H ₂ O	Απορρόφηση	Συγκέντρωση DNA
Δείγμα 5	5μl	195 μl	0.976	1952μg/ml
Δείγμα 5(μετά από τον καθαρισμό)	5μl	195 μl	0,823	1646 μg/ml

- Μετά την **3^η Απομόνωση DNA** από το κονιορτοποιήμενο δείγμα 3 έγινε με τη βοήθεια του kit **Genomic DNA from Soil Nucleospin kit** (Macherey-Nagel, Germany).

3^η Φωτομέτρηση στα 260nm

	Ποσότητα υλικού	H ₂ O	Απορρόφηση	Συγκέντρωση DNA
Δείγμα 3	5μl	195 μl	0.003	6μg/ml

- Μετά την **4^η Απομόνωση DNA** από τα κονιορτοποιήμενα δείγματα 8 και 8' έγινε με τη βοήθεια του kit **Genomic DNA from Plant II Nucleospin kit** (Macherey-Nagel, Germany)

4^η Φωτομέτρηση στα 260nm

	Ποσότητα υλικού	H ₂ O	Απορρόφηση	Συγκέντρωση DNA
Δείγμα 8	5μl	195 μl	0.006	12μg/ml
Δείγμα 8'	5μl	195 μl	0,023	46μg/ml

- Μετά την **5^η Απομόνωση DNA** από το κονιορτοποιήμενο δείγμα 9 έγινε με τη βοήθεια του kit **Genomic DNA from Soil Nucleospin kit** (Macherey-Nagel, Germany).

5^η Φωτομέτρηση στα 260nm

	Ποσότητα υλικού	H ₂ O	Απορρόφηση	Συγκέντρωση DNA
Δείγμα 9	5μl	195 μl	0,323	646μg/ml

- Μετά την **6^η Απομόνωση DNA** από τα κονιορτοποιήμενα δείγματα 2, 2', 7, 7' έγινε με τη βοήθεια του kit **Genomic DNA from Plant II Nucleospin kit** (Macherey-Nagel, Germany).

6^η Φωτομέτρηση στα 260nm

	Ποσότητα υλικού	H ₂ O	Απορρόφηση	Συγκέντρωση DNA
Δείγμα 2	5μl	195 μl	0.029	0,058 μg/ml
Δείγμα 2'	5μl	195 μl	0.012	0,024 μg/ml
Δείγμα 7	5μl	195 μl	0,009	0,018 μg/ml
Δείγμα 7'	5μl	195 μl	0,001	0,002 μg/ml

5. Συζήτηση

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η μελέτη δείγματος ξύλου και η απομόνωση DNA από αυτό το δείγμα, αποτελεί μία αρκετά δύσκολη διαδικασία από μόνη της. Πόσο μάλλον όταν πρόκειται για δείγμα ξύλου, το οποίο προέρχεται από ένα απολιθωμένο δάσος πολλών εκατομμυρίων χρόνων.

Η συγκεκριμένη μελέτη πάνω σε δείγμα ξύλου από το δάσος Bückabrány δεν οδήγησε σε σαφή αποτελέσματα. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA, η οποία μάλιστα ενισχύθηκε με Touchdown PCR και εκφυλισμένους εκκινητές, σχεδιασμένους για γονίδια ημικυτταρινασών. Τα αποτελέσματα θα μπορούσαμε να πούμε ότι ήταν διφορούμενα. Από τη μία οι ηλεκτροφορήσεις που πραγματοποιήθηκαν δεν έδωσαν κάποιο αποτέλεσμα, καθώς σε καμία από αυτές δεν υπήρξε κάποια ζώνη που να μαρτυρά ότι η απομόνωση του DNA από το δείγμα ξύλου ήταν επιτυχής. Από την άλλη, σε κάποιες από τις φασματοφωτομετρικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν η απομόνωση του DNA φαινόταν επιτυχημένη, με τη συγκέντρωση του DNA μάλιστα να φαίνεται αρκετά υψηλή.

Θα μπορούσαν λοιπόν μελλοντικά να πραγματοποιηθούν τα ίδια πειράματα με διαφορετικά kit απομόνωσης, διαφορετικές συνθήκες PCR και διαφορετικούς εκφυλισμένους εκκινητές για τη μελέτη της ποικιλότητας των γονιδίων ημικυτταρινασών ή ακόμα και άλλων γονιδίων. (π.χ. γονιδίων κυτταρινασών)

Τέλος, μελλοντικά θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν και πειράματα μικροβιακής ποικιλότητας, μελετώντας αυτά τα εκτεταμένα σημάδια βιοαλλοίωσης που παρουσιάζει το ξύλο από το απολιθωμένο δάσος Bückabrány. Με τη χρήση οπτικής και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας θα μπορούσαν να σαρωθούν διάφορα δείγματα ξύλου και να εντοπιστούν συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί που οφείλονται στην αλλοίωση του ξύλου.

6. Βιβλιογραφία

[1]Bardet M, Pournou A, Fossil wood from the Miocene and Oligocene epoch: chemistry and morphology, 2015 Jan;53(1):9-14

[2]Bjor dal CG., Nilsson T., Daniel G., Microbial decay of waterlogged archaeological wood found in Sweden. Applicable to archaeology and conservation (1999) International Biodeterioration and Biodegradation, 43 (1-2),pp. 63-73

[3]Blanchette RA, A review of microbial deterioration found in archaeological wood from different environments (2000) International Biodeterioration and Biodegradation, 46 (3), °pp. 189-204

[4]Causen CA., Bacterial association with decaying wood: a review (1996) Intrnational Biodeterioration and Biodegradation, 37 (1-2), pp. 101-107

[5]Colombini MP., Luceiko J.J., Modugno F., Orlandi M., Tolppa E-L., Zoia L., A multi-analytical studt of degradation of lignin in archaeological waterlogged wood (2009) Talanta, 80 (1), opp.61-70

[6]Jana Gelbrich, Bacterial wood degradation- A study of chemical changes in wood and growth conditions of bacteria

[7]Kazmer M, The Miocene Bükkabrány fossil forest in Hungary Field observations and project outline (2008) Hantkeniana (6), °pp.229-224

[8]Kazmer M, Structure of the 7 Ma Bukkabrány fossil forest in Hungary (2011) Jpn.J.Bot Vol 19 Nos. 1-2 p.47-54

[9]Zhang H-B., Yang M.-X., Tu R.Unexpecteddly high bacterial diversity in decaying wood of a conifer as revealed by a molecular method (2008) International Biodeterioration and Biodegradation, 62 (4), opp.471-474

[10]Κακάνη Ε., Αυγουστίνος Α., Ματθιόπουλος Κ., Εργαστηριακός Οδηγός Μοριακής Βιολογία II

[11]Νικολούλη Αικατερίνη, ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΟΚΑΡΥΩΤΙΚΗΣ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑ ΞΥΛΟΥ ΠΟΥ ΕΜΦΑΝΙΖΕΙ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΛΛΟΙΩΣΗ ΑΠΟ ΤΟ ΑΠΟΛΙΘΩΜΕΝΟ ΔΑΣΟΣ Bükkabrány, 2012

[12]Τεήσα Τούφα, Μελέτη συνεργιστικής δράσης μίας GH61 οξειδάσης από το *Sporotrichum thermophile* κατά την υδρόλυση λιγνινοκυταρινούχων υποστρωμάτων, 2012