



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σχολή Γεωπονικών Επιστημών

Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος

Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας

**«Μοριακή ταυτοποίηση αυτοφυών ειδών ορχιδέας του
Πηλίου»**

Ονοματεπώνυμο Φοιτήτριας (Α.Μ.)

Άρτεμις Αθανασίου, 02263

Επιβλέπων Καθηγητής

Παναγιώτης Μαδέσης

Επίκουρος Καθηγητής Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας

Βόλος, 2023

**«Μοριακή ταυτοποίηση αυτοφυών ειδών ορχιδέας του
Πηλίου»**

«Molecular identification of wild orchids from Pelion»

Η εξεταστική επιτροπή αποτελείται από τους:

Μαδέσης Παναγιώτης , Επίκουρο Καθηγητή Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας

Λεβίζου Ευθυμία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Φυτών

Σφουγγάρης Αθανάσιος, Καθηγητή Διαχείρισης Οικοτόπων και Βιοποικιλότητας

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε, στο τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος της σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και συγκεκριμένα στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, κατά τα έτη 2022-2023.

Η ολοκλήρωση της παρούσας πτυχιακής δε θα μπορούσε να επιτευχθεί χωρίς την πολύτιμη βοήθεια του κύριου Μαδέση Παναγιώτη, Επίκουρο Καθηγητή Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας. Είμαι πολύ ευγνώμων για την προθυμία του να μου προσφέρει τις γνώσεις του και να με βοηθήσει να αντιμετωπίσω οποιοδήποτε πρόβλημα προέκυπτε καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω επίσης όπως και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, κυρία Λεβίζου Ευθυμία και κύριο Σφουγγάρη Αθανάσιο, για τον χρόνο που αφιέρωσαν στην αξιολόγηση και τη βαθμολόγηση της πτυχιακής μου διατριβής. Ένα βαθύ ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω και στην κυρία Τσίντζου Γεωργία, Χημικό MSc και υποψήφια διδάκτορα του τμήματος για την άριστη μας συνεργασία αλλά και για τις αμέτρητες φορές που χρειάστηκα τη βοήθεια και την καθοδήγηση της και δε δίστασε ποτέ να μου τα προσφέρει. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, για την υποστήριξη τους και την παρουσία τους πάντα στο πλευρό μου.

Περίληψη

Το DNA barcoding ή αλλιώς γραμμοκωδικοποίηση του DNA είναι μια μέθοδος αναγνώρισης και ταυτοποίησης διαφόρων ειδών με βάση συντηρημένων περιοχών DNA στο γονιδίωμα τους. Ανάλογα με τον τύπο του οργανισμού, επιλέγονται οι αντίστοιχες κατάλληλες περιοχές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν και να δώσουν αποτελέσματα. Η οικογένεια των ορχιδοειδών χαρακτηρίζεται από χιλιάδες διαφορετικά είδη, με μεγάλη ποικιλομορφία, τα οποία είναι κυρίως αυτοφυή ενώ λίγα αποτελούν καλλιεργούμενα. Λόγω της μεγάλης αυτής ποικιλομορφίας, η συμβατική μέθοδος αναγνώρισης με βάση μορφολογικά στοιχεία δεν αποδίδει πάντα αξιόπιστα αποτελέσματα. Η ακριβής αναγνώριση και ταυτοποίηση τους ωστόσο χρήζει απαραίτητη εξαιτίας της απειλής με εξαφάνιση που βιώνουν κάποια είδη και του παράνομου εμπορίου. Στην παρούσα εργασία, συλλέχθηκαν 39 δείγματα αυτοφυών ορχιδεών από την περιοχή της Κερασίας, Μαγνησίας και με βάση τη ριβοσωμική περιοχή ITS2 του πυρηνικού DNA, ταυτοποιήθηκαν και αναγνωρίστηκαν επιτυχώς σε επίπεδο είδους.

Λέξεις κλειδιά: DNA barcoding, ορχιδοειδή, ITS2

Abstract

DNA barcoding is a method of identifying different species based on conserved DNA regions in their genome. Depending on the type of organism, the corresponding suitable regions that can be used and give results are selected. The orchidaceae family is characterized by thousands of different species, with great diversity, which are mostly native while a few are cultivated. Due to this great diversity, the conventional identification method based on morphological elements does not always give reliable results. However, their accurate identification is necessary because of the threat of extinction experienced by some species and illegal trade. In the present paper, 39 samples of native orchids were collected from the region of Kerasia, Magnesia and based on the ITS2 ribosomal region of the nuclear DNA, they were successfully identified to species level.

Key words: DNA barcoding, orchidaceae, ITS2

Περιεχόμενα

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	IX
Εισαγωγή	1
Ορχιδέα.....	1
2.Εξάπλωση – Ενδιατήματα.....	1
3.Συμποδιακή – Μονοποδιακή Ανάπτυξη	1
4.Μορφολογικά στοιχεία	2
4.1 Φύλλο.....	2
4.2 Βλαστός	2
4.3 Ριζικό σύστημα.....	2
4.4 Άνθος	3
4.5 Σπόρος & Μυκόρριζα	4
5. Κατανομή ορχιδέας στον Ελλαδικό χώρο.....	4
5.1 Κερασιά Μαγνησίας	5
6. DNA barcoding	6
6.1 DNA barcoding σε ορχιδέες.....	7
6.2 Περιοχή ITS2	7
7. Τεχνικές Μοριακής Βιολογίας	8
7.1 Απομόνωση DNA με το πρωτόκολλο CTAB	8
7.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	9
7.3 PCR.....	10
7.4 Αλληλούχιση Sanger	11
8.Υλικά και Μέθοδοι.....	13
8.1 Υλικά	13
8.2 Όργανα.....	13
8.3 Μέθοδοι	14
8.3.1 Δειγματοληψία από την Κερασιά Μαγνησίας.....	14
8.3.2 Απομόνωση DNA με το πρωτόκολλο CTAB.....	14

8.3.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης	15
8.3.4 Υπολογισμός συγκέντρωσης DNA με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου	17
8.3.5 Αραίωση DNA.....	17
8.3.6 Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).....	17
9. Αποτελέσματα	18
9.1 Αποτελέσματα απομόνωσης DNA με το πρωτόκολλο CTAB	18
9.2 Αποτελέσματα υπολογισμού συγκέντρωσης DNA με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου	20
9.3 Αποτελέσματα αραίωσης DNA.....	22
9.4 Αποτελέσματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με τη χρήση του εκκινητή ITS2.....	23
9.5 Αποτελέσματα αλληλούχισης δειγμάτων.....	24
9.6 Αποτελέσματα αντιστοίχισης των αλληλουχιών στο Εθνικό Κέντρο Βιοτεχνολογικής Πληροφόρησης των ΗΠΑ (NCBI)	49
9.7 Αποτελέσματα συνοπτικά.....	58
10. Συμπεράσματα.....	59
11. Βιβλιογραφία.....	60
11.1 Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία	60
11.2 Βιβλιογραφία Ιστοσελίδων.....	63
11.3 Βιβλιογραφία Εικόνων.....	63

Πίνακας Εικόνων

Εικόνα 1: Τυπικό άνθος ορχιδέας (Van Der Cingel, 2001)	4
Εικόνα 2: <i>Orchis provincialis</i> , Κέντρο Έρευνας και Προστασίας της αυτοφυούς Ορχιδέας στο Βόρειο Πήλιο, 2010)	5
Εικόνα 3: <i>Ophrys mammosa</i> , Κέντρο Έρευνας και Προστασίας της αυτοφυούς Ορχιδέας στο Βόρειο Πήλιο, 2013)	6
Εικόνα 4: <i>Neotinea lactea</i> , Κέντρο Έρευνας και Προστασίας της αυτοφυούς Ορχιδέας στο Βόρειο Πήλιο, 2010)	6
Εικόνα 5: Ηλεκτροφόρηση με gel Αγαρόζης (Bhatia & Dahiya, 2015)	10
Εικόνα 6: Τα στάδια της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολύμεράσης (PCR) (Papanastassopoulou, 1997)	11

Εικόνα 7: Η μέθοδος αλληλουχίας Sanger σε 7 βήματα. (1) Το θραύσμα dsDNA μετουσιώνεται σε δύο θραύσματα ssDNA. (2) Ένα θραύσμα ssDNA πολλαπλασιάζεται σε εκατομμύρια αντίγραφα. (3) Πρόσδεση ενός εκκινητή που είναι συμπληρωματικός ως προς το ένα άκρο του τμήματος. (4) Τα θραύσματα προστίθενται σε τέσσερα διαλύματα πολυμεράσης. Κάθε διάλυμα περιέχει τους τέσσερις τύπους βάσεων αλλά μόνο έναν τύπο νουκλεοτιδίου τερματισμού. (5) Η αλυσίδα μεγαλώνει έως ότου προστεθεί τυχαία ένα νουκλεοτίδιο τερματισμού. (6) Τα προκύπτοντα θραύσματα dsDNA αναδιατάσσονται για να ληφθεί μια σειρά ssDNA διαφόρων μηκών. (7) Τα θραύσματα διαχωρίζονται μέσω ηλεκτροφόρησης και προκύπτουν οι αλληλουχίες (Gauthier, 2007).....	12
Εικόνα 8: Αποτελέσματα απομόνωσης DNA με το πρωτόκολλο CTAB για τα δείγματα 1-19	19
Εικόνα 9: Αποτελέσματα απομόνωσης DNA με το πρωτόκολλο CTAB για τα δείγματα 20-22	19
Εικόνα 10: Αποτελέσματα απομόνωσης DNA με το πρωτόκολλο CTAB για τα δείγματα 23-30	19
Εικόνα 11: Αποτελέσματα απομόνωσης DNA με το πρωτόκολλο CTAB για τα δείγματα 31-34	20
Εικόνα 12: Αποτελέσματα απομόνωσης DNA με το πρωτόκολλο CTAB για τα δείγματα 35-39	20
Εικόνα 13: Αποτελέσματα ενίσχυσης των δειγμάτων DNA 1-35 με τη χρήση του εκκινητή ITS2.....	24
Εικόνα 14: Αποτελέσματα ενίσχυσης των δειγμάτων DNA 36-39 με τη χρήση του εκκινητή ITS2.....	24
Εικόνα 15: Εικόνα δείγματος 1.....	25
Εικόνα 16: Εικόνα δείγματος 2.....	25
Εικόνα 17: Εικόνα δείγματος 3.....	26
Εικόνα 18: Εικόνα δείγματος 4.....	27
Εικόνα 19: Εικόνα δείγματος 5.....	27
Εικόνα 20: Εικόνα δείγματος 6.....	28
Εικόνα 21: Εικόνα δείγματος 7.....	29
Εικόνα 22: Εικόνα δείγματος 8.....	29
Εικόνα 23: Εικόνα δείγματος 9.....	30
Εικόνα 24: Εικόνα δείγματος 10.....	31
Εικόνα 25: Εικόνα δείγματος 11.....	31
Εικόνα 26: Εικόνα δείγματος 12.....	32
Εικόνα 27: Εικόνα δείγματος 13.....	32
Εικόνα 28: Εικόνα δείγματος 14.....	33
Εικόνα 29: Εικόνα δείγματος 15.....	34
Εικόνα 30: Εικόνα δείγματος 16.....	34
Εικόνα 31: Εικόνα δείγματος 17.....	35
Εικόνα 32: Εικόνα δείγματος 18.....	35
Εικόνα 33: Εικόνα δείγματος 19.....	36
Εικόνα 34: Εικόνα δείγματος 20.....	37
Εικόνα 35: Εικόνα δείγματος 21.....	37
Εικόνα 36: Εικόνα δείγματος 22.....	38
Εικόνα 37: Εικόνα δείγματος 23.....	38

Εικόνα 38: Εικόνα δείγματος 24.....	39
Εικόνα 39: Εικόνα δείγματος 25.....	40
Εικόνα 40: Εικόνα δείγματος 26.....	40
Εικόνα 41: Εικόνα δείγματος 27.....	41
Εικόνα 42: Εικόνα δείγματος 28.....	41
Εικόνα 43: Εικόνα δείγματος 29.....	42
Εικόνα 44: Εικόνα δείγματος 30.....	43
Εικόνα 45: Εικόνα δείγματος 31.....	43
Εικόνα 46: Εικόνα δείγματος 32.....	44
Εικόνα 47: Εικόνα δείγματος 33.....	45
Εικόνα 48: Εικόνα δείγματος 34.....	45
Εικόνα 49: Εικόνα δείγματος 35.....	46
Εικόνα 50: Εικόνα δείγματος 36.....	47
Εικόνα 51: Εικόνα δείγματος 37.....	47
Εικόνα 52: Εικόνα δείγματος 38.....	48
Εικόνα 53: Εικόνα δείγματος 39.....	49

Πίνακας Πινάκων

Πίνακας 1: Master mix για PCR.....	18
Πίνακας 2: Set up για PCR.....	18
Πίνακας 3: Αποτελέσματα φασματοφωτομέτρησης και υπολογισμός συγκέντρωσης δειγμάτων	22
Πίνακας 4: Αραιώσεις δειγμάτων	23
Πίνακας 5: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 1 στο NCBI	49
Πίνακας 6: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 2 στο NCBI	50
Πίνακας 7: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 3 στο NCBI	50
Πίνακας 8: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 4 στο NCBI	50
Πίνακας 9: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 5 στο NCBI	50
Πίνακας 10: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 6 στο NCBI	50
Πίνακας 11: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 7 στο NCBI	51
Πίνακας 12: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 8 στο NCBI	51
Πίνακας 13: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 9 στο NCBI	51
Πίνακας 14: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 10 στο NCBI	51
Πίνακας 15: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 11 στο NCBI	52
Πίνακας 16: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 12 στο NCBI	52
Πίνακας 17: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 13 στο NCBI	52
Πίνακας 18: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 14 στο NCBI	52
Πίνακας 19: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 15 στο NCBI	53
Πίνακας 20: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 16 στο NCBI	53
Πίνακας 21: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 17 στο NCBI	53
Πίνακας 22: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 18 στο NCBI	53
Πίνακας 23: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 19 στο NCBI	54

Πίνακας 24: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 20 στο NCBI	54
Πίνακας 25: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 21 στο NCBI	54
Πίνακας 26: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 22 στο NCBI	54
Πίνακας 27: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 23 στο NCBI	54
Πίνακας 28: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 24 στο NCBI	55
Πίνακας 29: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 25 στο NCBI	55
Πίνακας 30: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 26 στο NCBI	55
Πίνακας 31: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 27 στο NCBI	55
Πίνακας 32: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 28 στο NCBI	56
Πίνακας 33: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 29 στο NCBI	56
Πίνακας 34: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 30 στο NCBI	56
Πίνακας 35: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 31 στο NCBI	56
Πίνακας 36: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 32 στο NCBI	57
Πίνακας 37: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 33 στο NCBI	57
Πίνακας 38: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 34 στο NCBI	57
Πίνακας 39: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 35 στο NCBI	57
Πίνακας 40: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 36 στο NCBI	58
Πίνακας 41: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 37 στο NCBI	58
Πίνακας 42: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 38 στο NCBI	58
Πίνακας 43: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 39 στο NCBI	58
Πίνακας 44: Αποτελέσματα.....	59

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

DNA: Deoxyribonucleic acid (Δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ)

RNA: Ribonucleic acid (ΡΙβονουκλεϊκό οξύ)

PCR: Polymerase Chain Reaction (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης)

dNTPs: deoxyriboNucleotide Triphosphates (τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια)

ITS2: Internal Transcribed Spacer 2 (Ενδομεταγραφόμενη περιοχή 2)

CBOL: International Barcode Of Life Consortium

Εισαγωγή

Ορχιδέα

1.Γενικά

Οι ορχιδέες συγκροτούν τη μεγάλη οικογένεια μονοκοτυλήδων φυτών, Orchidaceae. Η οικογένεια αυτή αποτελείται από 25.000 διαφορετικά είδη και μαζί με την οικογένεια Asteraceae, θεωρούνται οι μεγαλύτερες οικογένειες ανθοφόρων φυτών (Givnish et al., 2015; Chase, 2015). Μαζί με το γρασίδι θεωρούνται από τα πιο εξελιγμένα μονοκοτυλήδονα φυτά. Τα πολύ εξειδικευμένα άνθη των ορχιδεών, οι σπόροι τους με την ιδιότητα να διασπείρονται σε μεγάλες αποστάσεις και τα πολλά και διαφορετικά ενδιαιτήματα στα οποία μπορούν να αναπτυχθούν υποστηρίζουν αυτή τη θεωρία (Pridgeon, 2001).

2.Εξάπλωση – Ενδιαιτήματα

Η προέλευση της ορχιδέας πιθανώς να είναι κάποια περιοχή της Ασίας και με την πάροδο των χρόνων να εξαπλώθηκε και στον υπόλοιπο κόσμο (Withner, 1959). Σαν οικογένεια, έχουν παρουσία σε οποιοδήποτε μέρος μπορεί να υποστηρίξει κάποια μορφή βλάστησης. Ωστόσο, δείχνουν μια προτίμηση σε τροπικές περιοχές (Dixon et al., 2003). Πέρα από αυτές τις περιοχές που χαρακτηρίζονται από μεγάλους πληθυσμούς, ορχιδοειδή συναντώνται και σε ψυχρότερες περιοχές. Οι ορχιδέες των τροπικών περιοχών παρουσιάζουν μια συνεχή ανάπτυξη αλλά υπάρχουν και εποχιακά είδη. Τα είδη αυτά παρόλο που αναφέρονται ως εποχιακά, δεν επηρεάζονται από τις εποχές, παραδείγματος χάρη, χειμώνα ή καλοκαίρι, αλλά από τις θερμές και ξηρές περιόδους που επικρατούν κατά τη διάρκεια του χρόνου (Withner, 1959).

3.Συμποδιακή – Μονοποδιακή Ανάπτυξη

Τα ορχιδοειδή χωρίζονται σε δύο ομάδες ανάλογα με τον τρόπο ανάπτυξης. Υπάρχει ο συμποδιακός τρόπος ανάπτυξης, στον οποίο από τους μασχαλιαίους οφθαλμούς ενός ριζώματος προκύπτουν οι βλαστοί του φυτού. Είδη που αναπτύσσονται έτσι, χαρακτηρίζονται επίσης και από την παρουσία παχιών βλαστών και ψευδοβολβών και εναέριων ή προσκολλημένων ριζών. Στον μονοποδιακό τρόπο, το κορυφαίο μερίστωμα είναι το σημείο από το οποίο προκύπτουν τα φύλλα. Τα είδη αυτής της ομάδας δε χαρακτηρίζονται από ψευδοβολβούς και ριζώματα. Έχουν ομοιότητες όμως με την πρώτη ομάδα ως προς τις ρίζες (Stern, 2014).

4.Μορφολογικά στοιχεία

4.1 Φύλλο

Ανάμεσα στα διάφορα είδη ορχιδέας συναντώνται διάφορα είδη φύλλων. Από λογχοειδή ως ωοειδή αλλά γενικά απλά και όχι σύνθετα. Το μέγεθος τους μπορεί να κυμαίνεται από χιλιοστά έως μέτρα. Υπάρχουν είδη στα οποία η παρουσία των φύλλων κατά την άνθηση δεν είναι απαραίτητη. Υπάρχουν και είδη τα οποία στερούνται γενικά τα φύλλα και επιτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό της φωτοσύνθεσης στις εναέριες ρίζες. Η διάταξη των φύλλων διαφέρει από είδος σε είδος, στους πρωτόγονους πληθυσμούς ωστόσο, συναντάται κυρίως η σπειροειδής φυλλοταξία. Η βάση των φύλλων συνήθως περιβάλλει τον βλαστό του φυτού ή παίρνει τη μορφή βράκτιου φύλλου. Όσον αφορά τον μίσχο των φύλλων, σπάνια παρατηρείται η απουσία του. Οι δύο πλευρές των φύλλων της ορχιδέας διαφέρουν. Η άνω πλευρά συνήθως έχει μια σκούρα απόχρωση πράσινου. Είναι πιθανό όμως να υπάρχουν και διαφορετικοί χρωματισμοί ανάλογα με την παρουσία ανθοκυανών και τη διακύμανση της συγκέντρωσης τους (Stern, 2014). Τέλος, όσον αφορά το χημικό τους προφίλ, πληθώρα ειδών χαρακτηρίζεται από έντονη περιεκτικότητα στη φλαβονή c γλυκοσίδη και σε φλαβονόλες (Williams, 1979).

4.2 Βλαστός

Σχετικά με τους βλαστούς, η μορφή τους είναι είτε λεπτή είτε ψευδοβολβώδης. Η λεπτή μορφή θυμίζει μπαστούνι ή καλάμι και συχνά παρουσιάζει διακλαδώσεις. Η ψευδοβολβώδης χαρακτηρίζει κυρίως επιφυτικά είδη. Είναι διογκωμένοι βλαστοί και έχουν το ρόλο αποθήκευσης νερού. Ως προς το σχήμα κυμαίνεται από κυλινδρικό έως σφαιρικό. Ψευδοβολβοί δε συναντώνται σε χερσαία είδη. Υπάρχουν επίσης και πραγματικοί κόνδυλοι οι οποίοι βρίσκονται στην επιφάνεια τους εδάφους ή ημιβυθισμένοι. Έχουν επίσης αποθηκευτικό ρόλο. Τέλος, αληθινοί βλαστικοί κόνδυλοι συναντώνται σπανίως στην οικογένεια Orchidaceae (Stern, 2014).

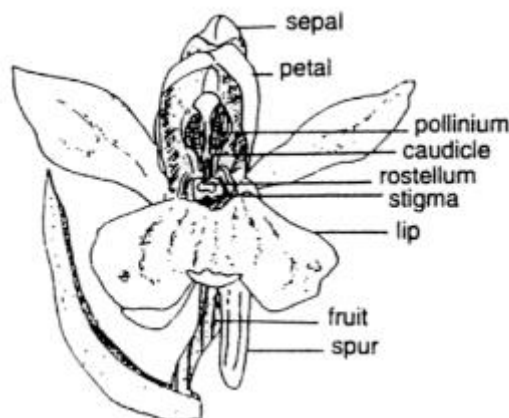
4.3 Ριζικό σύστημα

Για την επιβίωση των διαφορετικών ειδών ορχιδέας στις διάφορες περιοχές όπου έχουν εξαπλωθεί, οι ρίζες τους εμφανίζουν πολλές τροποποιήσεις ως προς την μορφολογία, την ανατομία και τη φυσιολογία τους. Διαθέτουν τις κλασικές απορροφητικές ρίζες μέσω των οποίων απορροφούν θρεπτικά συστατικά και νερό από το έδαφος. Πέρα από αυτές, υπάρχουν οι εναέριες ρίζες μέσω των οποίων

αποσπούν συστατικά από φύλλα τα οποία έχουν πέσει στο έδαφος. Ανάλογα με το υπόστρωμα στο οποίο αναπτύσσεται το φυτό, οι εναέριες ρίζες τροποποιούνται ανάλογα ως προς τη μορφολογία και την ανατομία τους. Σε είδη με ελάχιστα ή καθόλου φύλλα, αυτές οι ρίζες εκτελούν και το έργο της φωτοσύνθεσης. Άλλες δομές που συναντώνται σε διάφορα είδη είναι τα ριζικά φυμάτια και οι ριζικοί κόνδυλοι. Στα ριζικά φυμάτια έχει παρατηρηθεί η ύπαρξη διαρκώς ανοιχτών στομάτων τα οποία εικάζεται ότι χρησιμεύουν στην ανταλλαγή αερίων όταν η ρίζα αναπτύσσεται σε πολύ υγρά εδάφη. Όσον αφορά τους ριζικούς κονδύλους, στα περισσότερα είδη είναι επενδυμένοι με μια δομή που αναφέρεται ως *verlamen*. Το *verlamen* αποτελείται από 1-20 στιβάδες κυττάρων και είναι μια εξειδικευμένη επιδερμίδα. Εκτός από τους κονδύλους, επενδύει και άλλα ριζικά τμήματα όπως τις απορροφητικές ρίζες. Τέλος, υπάρχουν και είδη που είναι εξ' ολοκλήρου μυκοτροφικά και στερούνται τελείως τις ρίζες (Stern, 2014).

4.4 Άνθος

Το άνθος της ορχιδέας αποτελείται από τρία σέπαλα, τρία πέταλα και τα αναπαραγωγικά της όργανα συγχωνευμένα σε μια δομή που αναφέρεται ως στήλη. Ο αρχικός ρόλος των σέπαλων είναι να προστατεύσουν το μπουμπούκι. Όταν αυτό ανοίξει τότε τα σέπαλα μεγαλώνουν και αποκτούν χρώμα. Λόγω αυτής της αλλαγής στην όψη τους, θυμίζουν πέταλα. Όσον αφορά τα πέταλα, τα δύο συνήθως έχουν παρόμοια μορφή ενώ το ένα ξεχωρίζει και αναφέρεται ως χείλος (*lip*) ή *labellum*. Το *labellum* έχει διαφορετικό μέγεθος, ιδιαίτερα μοτίβα και παρουσιάζει διογκώσεις που μοιάζουν με κάλλους. Η μορφή του *labellum* και ίσως όλου του άνθους είναι έτσι σχεδιασμένη ώστε να προσελκύει επικονιαστές (Withner, 1959). Σε ορισμένα είδη μάλιστα, το *labellum* επηρεάζει τον επικονιαστή κάνοντας ένα είδος κίνησης (Van Der Cingel, 2001). Η επικονίαση του άνθους έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός λοβού, ο οποίος όταν αναπτυχθεί περιέχει πολλούς σπόρους (Withner, 1959).



Εικόνα 1: Τυπικό άνθος ορχιδέας (Van Der Cingel, 2001)

4.5 Σπόρος & Μυκόρριζα

Οι σπόροι της ορχιδέας είναι τόσο μικροί σε μέγεθος που θυμίζουν σκόνη. Μπορούν εύκολα με τη βοήθεια του ανέμου και του νερού να μεταφερθούν σε μακρινές αποστάσεις (Withner, 1959). Το έμβρυο που προκύπτει από τους σπόρους της ορχιδέας στερείται ρίζα και κοτυληδόνες (Rasmussen et al., 2014). Γι' αυτό τα σπορόφυτα ορχιδέας, παρουσιάζουν μια ιδιαιτερότητα σε σχέση με άλλα φυτικά είδη. Ενώ, γενικά η ανάπτυξη των σπορόφυτων στηρίζεται σε αποθέματα φωτοσυνθετικών προϊόντων που προέρχονται από το μητρικό φυτό, τα σπορόφυτα ορχιδέας χρειάζονται επίσης υδατάνθρακες που εξασφαλίζουν μέσω συμβιωτικών σχέσεων με ευεργετικούς μύκητες (Rasmussen et al., 2007).

5. Κατανομή ορχιδέας στον Ελλαδικό χώρο

Η Ελλάδα διαθέτει μια ευνοϊκή γεωγραφική θέση και γεωμορφολογία για την ανάπτυξη πληθώρας φυτικών ειδών. Πολλά γένη ορχιδέας όπως τα *Ophrys*, *Orchis* και *Serapias* αρέσκονται σε ασβεστούχα εδάφη (Stern, 2014). Έτσι, σε οικοσυστήματα που χαρακτηρίζονται από αυτά, όπως, φρύγανα και δάση θερμόφιλων κωνοφόρων δέντρων, αναπτύσσονται και έντονοι πληθυσμοί αυτών. Σε βόρειες περιοχές με μεγάλο υψόμετρο το γένος *Ophrys* δε συναντάται έντονα ενώ γένη όπως *Orchis* και *Neottia* έχουν έντονη παρουσία. Ορχιδέες βόρειας προέλευσης μπορεί να βρεθούν επίσης σε μεγάλα υψόμετρα αλλά σε συγκεκριμένα ενδιαίτηματα όπως δάση οξιάς και Πεύκης. Δάση νορβηγικής ελάτης θεωρούνται φτωχά σε χλωρίδα ορχιδέας καθώς πέρα από τα είδη *Neottia cordata* και *Corallorhiza trifida* δεν αναπτύσσονται συνήθως άλλα. Δάση συγγενικά με αυτά της οξιάς, όπως τα δάση βουλγαρικής ελάτης, που εντοπίζονται στην κεντρική Ελλάδα αποτελούν ενδιαίτηματα πολλών

ορχιδοειδών. Στο νότιο τμήμα της Ελλάδας, όπου οι καλοκαιρινοί μήνες συνοδεύονται από ξηρασία υπάρχουν δάση αναπτυσσόμενα σε ασβεστούχα εδάφη όπως δάση μαύρης Πεύκης. Σε αυτά και σε υποαλπικά λιβάδια αναπτυσσόμενα σε ασβεστολιθικά υποστρώματα συναντώνται μεγάλοι πληθυσμοί ορχιδοειδών. Τέλος, σε βάλτους και υγρά λιβάδια κυριαρχεί το γένος *Dactylorhiza* (Tsiftsis, 2018)

5.1 Κερασιά Μαγνησίας

Η Κερασιά Μαγνησίας εντοπίζεται στο βορειοδυτικό τμήμα του Πηλίου και συχνά αναφέρεται ως το χωριό της ορχιδέας. Βρίσκεται στα 118 μέτρα και αποτελεί τοποθεσία για το Κέντρο Έρευνας και Προστασίας της αυτοφυούς Ορχιδέας στο Βόρειο Πήλιο. Η δράση του κέντρου ξεκίνησε το 2012 με αποτέλεσμα την φωτογράφιση, καταγραφή, ταυτοποίηση και ανάδειξη 43 διαφορετικών ειδών αυτοφυούς ορχιδέας. Ανάμεσα σε αυτά, είδη όπως τα *Orchis provincialis*, *Ophrys mammosa*, *Neotinea fackel* και άλλα. Το έργο τους συνεχίζεται μέχρι και σήμερα ξεκινώντας τους μήνες Ιανουάριο- Φεβρουάριο στοχεύοντας στην παρατήρηση των πρώιμων ποικιλιών συνεχίζοντας ως τον Απρίλιο- Μάιο που είναι η περίοδος ανθοφορίας για τα περισσότερα είδη. Οι αυτοφυείς ορχιδέες συναντώνται σε διάφορους φυσικούς οικότοπους όπως λιβάδια, δάση οξυάς και φρύγανα αλλά και σε ανθρωπογενή οικοσυστήματα όπως καλλιεργούμενους αγρούς (Κέντρο Έρευνας και Προστασίας της αυτοφυούς Ορχιδέας στο Βόρειο Πήλιο).



Εικόνα 2: *Orchis provincialis*, Κέντρο Έρευνας και Προστασίας της αυτοφυούς Ορχιδέας στο Βόρειο Πήλιο, 2010)



Εικόνα 3: *Ophrys mammosa*, Κέντρο Έρευνας και Προστασίας της αυτοφυούς Ορχιδέας στο Βόρειο Πήλιο, 2013)



Εικόνα 4: *Neotinea lactea*, Κέντρο Έρευνας και Προστασίας της αυτοφυούς Ορχιδέας στο Βόρειο Πήλιο, 2010)

6. DNA barcoding

Το 2003, ο Paul Herbert και η ερευνητική του ομάδα πρότειναν μια νέα μέθοδο ταυτοποίησης και αναγνώρισης διαφόρων ειδών. Η μέθοδος αυτή γνωστή ως γραμμοκωδικοποίηση του DNA ή αλλιώς DNA barcoding αποτελεί πλέον μια διεθνή πρωτοβουλία την οποία ηγείται το International Barcode of Life Consortium ή εν συντομία CBOL (CBOL). Το DNA barcoding αφορά τη χρήση μιας μικρής τυποποιημένης περιοχής του γονιδιώματος ως γραμμωτό κώδικα μέσω του οποίου θα

είναι δυνατός ο χαρακτηρισμός του κάθε είδους. Για ζωικούς οργανισμούς και έντομα, η γονιδιακή περιοχή που χρησιμοποιείται είναι η CO1 (cytochrome c oxidase 1) η οποία εντοπίζεται στο μιτοχονδριακό DNA. Στους φυτικούς οργανισμούς, η περιοχή αυτή δεν είναι εξίσου αποτελεσματική. Ο ρυθμός μετάλλαξης είναι αργός και μέσω της περιοχής αυτής τα φυτικά είδη δε διακρίνονται με ακρίβεια. Έτσι, προτάθηκε η χρήση του συνδυασμού των περιοχών matK και rbcL του χλωροπλαστικού DNA (Xiwen et al., 2014). Συνεπώς στους φυτικούς οργανισμούς, η μέθοδος του DNA barcoding ξεκινά με την απομόνωση του DNA από ένα δείγμα φυτικού ιστού. Έπειτα, από το συνολικό γονιδίωμα χρειάζονται μόνο οι γονιδιακές περιοχές του χλωροπλαστικού DNA. Έτσι, με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών και τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, αυτές οι περιοχές απομονώνονται και ενισχύονται (CBOL).

6.1 DNA barcoding σε ορχιδέες

Πολλά είδη αυτοφυών ορχιδοειδών απειλούνται λόγω ανθρώπινου παράγοντα. Αυτός ο παράγοντας συνδέεται είτε με την καταστροφή των ενδιαιτημάτων τους προς εκμετάλλευση της γης για καλλιέργεια ή για βόσκηση, είτε λόγω της έντονης συλλογής τους (Hosomi, 2012). Η ακριβής αναγνώριση και ταξινόμηση των ειδών μπορεί να βελτιώσει τη βιολογία διατήρησης τους και να προάγει τη βιώσιμη χρήση τους. Η αναγνώριση ειδών με το συμβατικό τρόπο όσον αφορά τις ορχιδέες θεωρείται αναξιόπιστη λόγω του γεγονότος ότι οι μορφολογικοί χαρακτήρες των ορχιδοειδών παρουσιάζουν μεγάλη παραλλαγή. Μέσα σε ένα είδος εμφανίζεται συχνά υβριδισμός. Ένα είδος ορχιδέας επικονιάζεται με τη γύρη ορχιδέας άλλου είδους (με την προϋπόθεση ότι τα είδη ανήκουν στο ίδιο γένος) με αποτέλεσμα την αλλαγή των μορφολογικών χαρακτήρων του. Ακόμη και αν δεν υπάρχει υβριδισμός, παραλλαγή αυτών εντός ενός είδους παρουσιάζονται ούτως ή άλλως. Τέλος, η συμβατική αναγνώριση δεν έχει βάση σε φυτά τα οποία στερούνται άνθος. Για όλους αυτούς τους λόγους, η μέθοδος του DNA barcoding βρίσκει άμεση εφαρμογή για την αναγνώριση και χαρακτηρισμό των ορχιδοειδών με σκοπό τη διατήρησή τους και τον έλεγχο της χρήσης τους (Hye Min et al., 2013).

6.2 Περιοχή ITS2

Η περιοχή ITS2 βρίσκεται στην περιοχή που κωδικοποιεί το ριβοσωμικό RNA. Πιθανώς, ο ρόλος της έγκειται στο να ρυθμίσει τη μεταγραφή των ενεργών

ριβοσωμικών υπομονάδων με την παροχή δομικών στοιχείων για την ορθή προεπεξεργασία του RNA. Πρόσφατα, η περιοχή ITS2 προτάθηκε ως ο τυπικός γραμμωτός κώδικας για την αναγνώριση φυτικών ειδών με έμφαση τα φαρμακευτικά φυτά. Η διάκριση αυτή στηρίζεται στην ευκολία σχεδιασμού καθολικών εκκινητών λόγω των συντηρημένων περιοχών που διαθέτει, στην εύκολη και ακριβή διάκριση ακόμα και στενά συγγενικών ειδών λόγω της ικανής μεταβλητότητας της και τέλος λόγω της εύκολης ενίσχυσης της (Shangguo et al., 2015). Οι περιοχές matK, rcbL και ITS, προτείνονται γενικώς από τον CBOL ως δείκτες για barcoding. Η περιοχή ITS2 ξεχωρίζει διότι πέρα από το DNA barcoding, ενδείκνυται και για την ταξινόμηση ορχιδοειδών (Rohimah, 2021).

7. Τεχνικές Μοριακής Βιολογίας

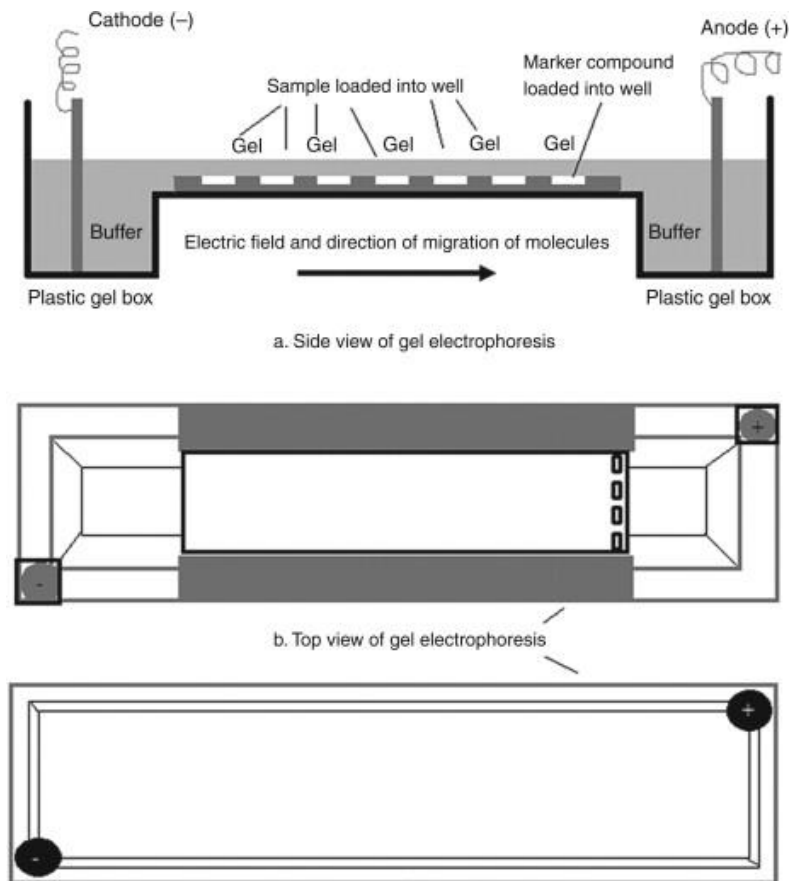
7.1 Απομόνωση DNA με το πρωτόκολλο CTAB

Το πρωτόκολλο CTAB αναπτύχθηκε το 1980 για την απομόνωση και καθαρισμό του DNA που προέρχεται από φυτικούς ιστούς. Το πρωτόκολλο είναι αποτελεσματικό για μεγάλο αριθμό αγγειόσπερμων φυτών, τόσο μονοκότυλων όσο και δικότυλων (Doyle, 1987). Κατά την έναρξη, είναι απαραίτητο να διαλυθεί επαρκώς το φυτικό δείγμα. Αυτό κανονικά γίνεται με τη χρήση υγρού αζώτου ώστε το δείγμα να παραμένει παγωμένο και το DNA να μην υποστεί κάποια βλάβη. Με γουδί και γουδοχέρι ακολουθεί η λειοτριβήση του φυτικού ιστού. Στα πλαίσια του εργαστηρίου, η χρήση του υγρού αζώτου θεωρείται επικίνδυνη, οπότε η διάλυση του φυτικού ιστού γίνεται χωρίς αυτό. Έπειτα, το λειοτριβημένο δείγμα μεταφέρεται σε σωλήνα eppendorf όπου προστίθεται και το ρυθμιστικό διάλυμα CTAB με β-μερκαπτοαιθανόλη. Το διάλυμα CTAB οδηγεί στην κυτταρική λύση με αποδιάταξη του κυτταρικού τοιχώματος και τον διαχωρισμό του DNA από πολυσακχαρίτες. Αποτρέπει επίσης, δευτερογενείς μεταβολίτες να εμπλακούν με την απομόνωση του DNA (Heikrujam J. Et al., 2020 ; ZYMORESEARCH). Ο ρόλος της β-μερκαπτοαιθανόλης έγκειται στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών από το DNA μετουσιώνοντας τις. Βοηθά επίσης, στην απομάκρυνση των πολυφαινόλων (AboulMaaty N.AF. & Oraby H.AS., 2019 ; Konisberg W., 1972). Αφού το δείγμα επωαστεί και φυγοκεντρηθεί, η υπερκείμενη φάση που δεν περιέχει φυτικό ιστό μεταφέρεται σε νέο σωλήνα όπου γίνεται και η επεξεργασία με το χλωροφόρμιο. Η χρήση του χλωροφορμίου έχει ως σκοπό να δημιουργήσει δύο διαφορετικές φάσεις, μια υδάτινη και μια οργανική. Μέσω φυγοκέντρωσης, τα μη πολικά μόρια μεταφέρονται στην οργανική φάση αφήνοντας

στην υδάτινη το DNA και άλλα πολικά μόρια (Heikrujam J. Et al., 2020). Η οργανική φάση που περιέχει τα ανεπιθύμητα μόρια απορρίπτεται και η διαδικασία με το χλωροφόρμιο επαναλαμβάνεται άλλη μια φορά ώστε το DNA να έχει διαχωριστεί πλήρως από τα μη πολικά μόρια. Έπειτα, στην υδάτινη φάση όπου υπάρχει το DNA προστίθενται οξικό νάτριο, ισοπροπανόλη και Rnase A. Το οξικό νάτριο και η ισοπροπανόλη βοηθούν στην καθίζηση του DNA. Το οξικό νάτριο εξουδετερώνοντας τα αρνητικά φορτία και η ισοπροπανόλη αφαιρώντας το νερό που βρίσκεται γύρω από τις φωσφορικές ομάδες που διαθέτει το DNA . Έτσι, το DNA θα καθιζάνει.(Heikrujam J. Et al., 2020 ; ZYMORESEARCH). Η Rnase A προστίθεται για να κατακερματίσει τυχόν τμήματα RNA υδρολύοντας τον 3',5' – φωσφοδιεστερικό δεσμό μεταξύ των νουκλεοτιδίων τους (Roberts G.C. et al., 1969). Το ίζημα του DNA υπόκειται σε πλύση με τη χρήση 70% αιθανόλης ώστε να αφαιρεθούν τα άλατα (Tan S. C., & Yiar B. C., 2009). Μετά από δύο τέτοιες πλύσεις, το DNA επαναιωρείται σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris EDTA μέσα στο οποίο θα διατηρηθεί (ZYMORESEARCH).

7.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των μορίων DNA και RNA με βάση το μέγεθος τους. Η διαδικασία γίνεται σε ένα πήκτωμα αгарόζης το οποίο διαθέτει πόρους μέσα από τους οποίους κινούνται τα μόρια σε ταχύτητα ανάλογη του μεγέθους τους. Έτσι, τα μεγάλα μόρια καθυστερούν ενώ τα μικρότερα κινούνται ταχύτερα. Το πήκτωμα αгарόζης τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης μέσα σε ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα. Κατά την παρασκευή του πηκτώματος, χρησιμοποιούνται ειδικά καλούπια, τα οποία δημιουργούν τις θέσεις στις οποίες τοποθετούνται τα δείγματα, τα λεγόμενα πηγαδάκια. Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού, στην οποία οφείλεται η κίνηση των μορίων. Το πήκτωμα τοποθετείται στη συσκευή, με τα πηγαδάκια να βρίσκονται στον αρνητικό πόλο της συσκευής. Έτσι, όταν εφαρμοστεί η διαφορά δυναμικού, τα αρνητικά φορτισμένα μόρια θα κινηθούν από τον αρνητικό στον θετικό πόλο. Κατά αυτήν την κίνηση θα γίνει ο διαχωρισμός τους (Tropp, 2014).

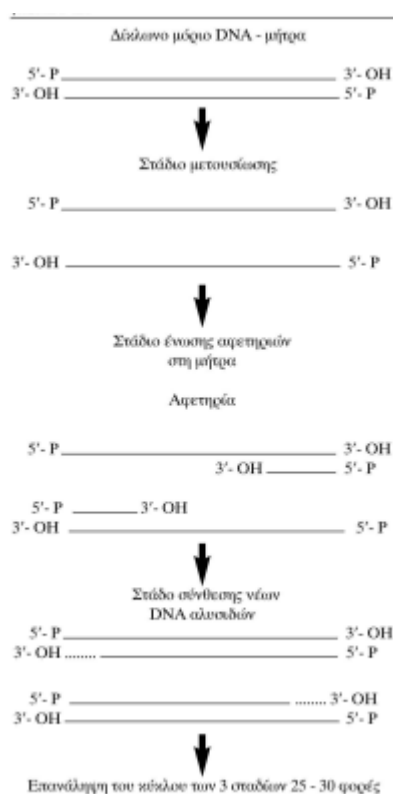


Εικόνα 5: Ηλεκτροφόρηση με gel Αγαρόζης (Bhatia & Dahiya, 2015)

7.3 PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια τεχνική που επινοήθηκε από τον Kary B. Mullis το 1983. Η τεχνική αυτή βρίσκει εφαρμογή όταν είναι επιθυμητό, μια αλληλουχία DNA να πολλαπλασιαστεί *in vitro*, δηλαδή χωρίς τη μεσολάβηση ζωντανών κυττάρων. Έτσι, είναι εφικτό από ένα αντίγραφο μιας αλληλουχίας DNA να προκύψουν μέχρι και εκατομμύρια ίδια. Για το σκοπό αυτό, είναι αναγκαίο η αλληλουχία του DNA να είναι γνωστή ώστε να σχεδιαστούν οι ανάλογοι συνθετικοί εκκινητές οι οποίοι θα εμφανίζουν συμπληρωματικότητα με μία από τις αλυσίδες του DNA (Saiki et al., 1988). Η συμπληρωματικότητα αυτή εμφανίζεται στα άκρα της αλληλουχίας που πρόκειται να ενισχυθεί και οι εκκινητές προσδένονται έτσι ώστε τα 3' άκρα τους να είναι αντίθετα το ένα με το άλλο και να πλαισιώνουν την περιοχή ενδιαφέροντος. Τα 5' άκρα τους είναι τοποθετημένα προς την εξωτερική πλευρά της αλληλουχίας και καθορίζουν τα αντίστοιχα άκρα και γι' αυτή (Tropp, 2014). Γενικά, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πέρα από την παρουσία των κατάλληλων εκκινητών και του δείγματος DNA που αναφέρθηκαν απαιτεί επίσης, τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια, ένα κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και μια Taq DNA

πολυμεράση. Η συγκεκριμένη πολυμεράση έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus* απ' όπου έχει πάρει και το όνομα της. Το συγκεκριμένο βακτήριο επιβιώνει σε πολύ θερμές συνθήκες. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο η συγκεκριμένη πολυμεράση χρησιμοποιείται σε αυτήν την αντίδραση. Μπορεί να αντέξει τις έντονες αυξομειώσεις της θερμοκρασίας που απαιτούνται για την ενίσχυση του DNA (Chien et al., 1976). Οι διακυμάνσεις αυτές της θερμοκρασίας συναντώνται κατά τη διάρκεια ενός κύκλου της PCR και πραγματοποιούνται χάρη σε ειδικά μηχανήματα που ονομάζονται θερμικοί κυκλοποιητές. Σε έναν κύκλο περιλαμβάνονται τρία στάδια, η αποδιάταξη του DNA, η προσαρμογή των εκκινητών στις κατάλληλες θέσεις του και τέλος η επιμήκυνση τους. Σε αυτά τα τρία στάδια, τα δείγμα εκτίθενται και σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Μέσω των συνεχών εναλλαγών της επιτυγχάνεται η ενίσχυση του DNA. Κάθε νέο μόριο DNA που σχηματίζεται χρησιμεύει ως μήτρα για τον σχηματισμό επόμενων αντίγραφων έως ότου επιτευχθεί η επιθυμητή ποσότητα. (Saiki, 1985; Saiki et al., 1988; Tropp, 2014).

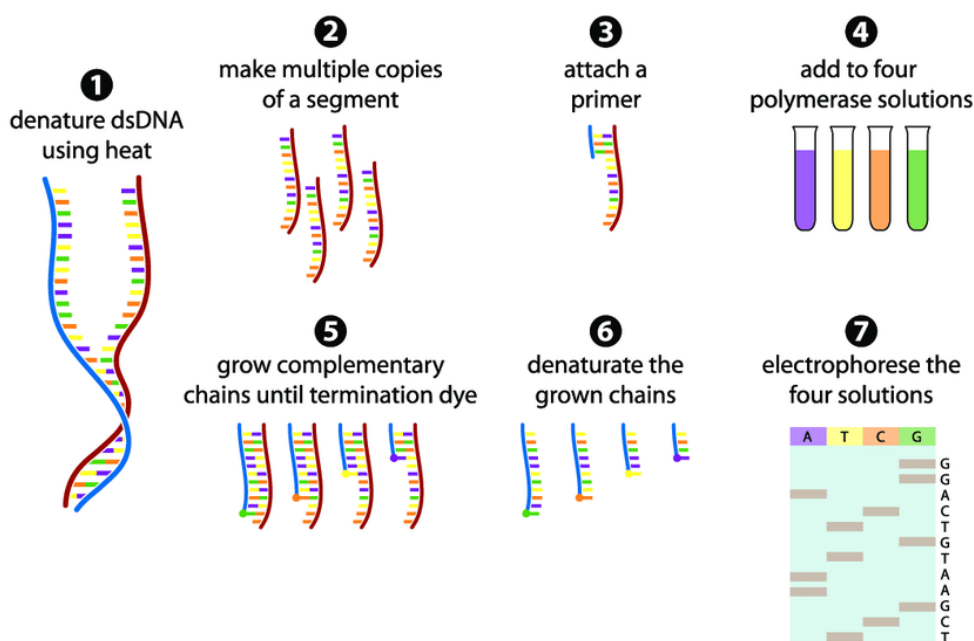


Εικόνα 6: Τα στάδια της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολύμεράσης (PCR) (Papanastassopoulou, 1997)

7.4 Αλληλούχιση Sanger

Η αλληλούχιση Sanger αφορά τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του DNA με τη μέθοδο τερματισμού αλυσίδας διδεοξυνουκλεοτιδίων (Ronaghi, 2001). Η μέθοδος

αυτή αναπτύχθηκε το 1977 από τον Frederick Sanger και τους συνεργάτες του (Sanger et al., 1977) και αποτελεί μια από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους αλληλούχισης. Αναλυτικότερα, βασίζεται στον τερματισμό της αλυσίδας από την DNA πολυμεράση καθ' όλη τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA που προκαλείται από την τυχαία αφομοίωση διδεοξυνουκλεοτιδίων. Η αλληλούχιση Sanger μπορεί να προσδιορίσει με ακρίβεια της τάξης του 99,99%, αλληλουχίες σύντομης ανάγνωσης όπως για παράδειγμα αλληλουχίες DNA με περισσότερα από 500 νουκλεοτίδια (Shendure & Ji, 2008). Ωστόσο, υπάρχουν περιορισμοί στη χρήση αυτής της μεθόδου (Gharizadeh et al, 2007). Ένας από αυτούς, που θεωρείται και ο μεγαλύτερος, είναι ότι σε περίπτωση ανάγνωσης μεγαλύτερης αλληλουχίας απαιτείται η χρήση gel ή πολυμερών ώστε να διαχωριστούν τυχόν επισυναπτόμενα τμήματα DNA. Ακόμη, για την παράλληλη ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων, τα θραύσματα DNA πρέπει να κλωνοποιηθούν σε βακτήρια για μεγαλύτερες αλληλουχίες. Τέλος, η ολική αυτοματοποίηση των μεθόδων προετοιμασίας των δειγμάτων παρουσιάζει δυσκολίες και επίσης σε μέθοδος χαρακτηρίζεται από μεγάλο κόστος. (Ansorge, 2009; Hall, 2007).



Εικόνα 7: Η μέθοδος αλληλουχίας Sanger σε 7 βήματα. (1) Το θραύσμα dsDNA μετουσιώνεται σε δύο θραύσματα ssDNA. (2) Ένα θραύσμα ssDNA πολλαπλασιάζεται σε εκατομμύρια αντίγραφα. (3) Πρόσδεση ενός εκκινητή που είναι συμπληρωματικός ως προς το ένα άκρο του τμήματος. (4) Τα θραύσματα προστίθενται σε τέσσερα διαλύματα πολυμεράσης. Κάθε διάλυμα περιέχει τους τέσσερις τύπους βάσεων αλλά μόνο έναν τύπο νουκλεοτιδίου τερματισμού. (5) Η αλυσίδα μεγαλώνει έως ότου προστεθεί τυχαία ένα νουκλεοτίδιο τερματισμού. (6) Τα προκύπτοντα θραύσματα dsDNA αναδιατάσσονται για να ληφθεί μια

σειρά ssDNA διαφόρων μηκών. (7) Τα θραύσματα διαχωρίζονται μέσω ηλεκτροφόρηση και προκύπτουν οι αλληλουχίες (Gauthier, 2007).

8.Υλικά και Μέθοδοι

8.1 Υλικά

- MIDORI Green DIRECT της εταιρίας NIPPON Genetics EUROPE
- 50bp DNA Ladder της εταιρίας NEW ENGLAND BioLabs Inc.
- Ρυθμιστικό διάλυμα TRIS acetate- EDTA (TAE 1x)
- Agarose Type I: Low EEO της εταιρίας SIGMA
- Taq DNA Polymerase της εταιρίας invitrogen by Thermo Fisher Scientific
- 50 Mm MgCl₂ της εταιρίας invitrogen by Thermo Fisher Scientific
- PCR Rxn Buffer της εταιρίας invitrogen by Thermo Fisher Scientific
- Εκκινητής ITS2F1 της εταιρίας Biolegio
- Εκκινητής ITS2R2 της εταιρίας Biolegio
- Πάγος
- DNTPs – μείγμα νουκλεοτιδίων
- Νερό για έγχυση (Water for injection) της εταιρίας DEMO S.A.
- 2x CTAB buffer
- 2- Mercaptoethanol της εταιρίας MP Biomedicals, LLC
- Chloroform BioChemica της εταιρίας PanReac Applichem
- Isopropanol
- Sodium acetate της εταιρίας Mallinckrodt
- Ethanol absolute for analysis της εταιρίας Supelco
- 1x TE Buffer (Tris, EDTA)
- Rnase A (50 mg) της εταιρίας Macherey – Nagel GmbH & Co. KG

8.2 Όργανα

- Πιπέτες της εταιρίας NICHIRYO
- Φυγόκεντρος Micro Centrifuge Fast Gene της εταιρίας Nippon Genetics Europe
- Συσκευή Vortex της εταιρίας Nippon Genetics Europe
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας της εταιρίας MRC Ltd
- Θερμοκυκλοποιητής PCR Fast Gene της εταιρίας Nippon Genetics Europe

- Ξηρό θερμαντικό λουτρό της εταιρίας BIOLINE scientific
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης SCIE-PLAS
- Πηγή ηλεκτρικού ρεύματος PowerPlus 300V για ηλεκτροφόρηση της εταιρίας fisherbrand
- Καλούπι πηκτώματος
- Γουδί
- Γουδοχέρι
- Κυψελίδες
- Φασματοφωτόμετρο BioPhotometer της εταιρίας Eppendorf- Netheier- Hinz GmbH

8.3 Μέθοδοι

8.3.1 Δειγματοληψία από την Κερασιά Μαγνησίας

Το φυτικό τμήμα που χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα στο πείραμα είναι το φύλλο. Για τη δειγματοληψία λοιπόν, χρησιμοποιήθηκε ψαλίδι για την κοπή φύλλων από διάφορα αυτοφυή φυτά ορχιδέας στη δεδομένη περιοχή. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε ώστε το φυτό από το οποίο προέρχονταν το δείγμα να μείνει όσο πιο άθικτο γινόταν, ειδάλλως το εκάστοτε φυτό μπορεί να οδηγούνται σε ενδεχόμενο θάνατο που πιθανώς να επηρέαζε τη βιοποικιλότητα του ενδιαιτήματος. Από κάθε φυτό παραλαμβάνονταν 1-2 φύλλα τα οποία τοποθετούνταν σε ειδικά σακουλάκια δειγματοληψίας και αριθμούνταν. Ο τελικός αριθμός δειγμάτων ήταν 39. Τέλος, η διατήρηση τους έγινε στους -20°C έως ότου ξεκίνησε η πραγματοποίηση του πειράματος.

8.3.2 Απομόνωση DNA με το πρωτόκολλο CTAB

Η διαδικασία που πρόκειται να περιγραφεί, ακολουθήθηκε κατά τον ίδιο τρόπο για κάθε ένα από τα 39 δείγματα ορχιδέας..

Για την έναρξη του πρωτόκολλου CTAB απαιτήθηκε η λειοτρίβηση του ιστού. Για λόγους ασφάλειας των φοιτητών, στο εργαστήριο δε χρησιμοποιείται υγρό άζωτο με το οποίο συνήθως διεξάγεται η λειοτρίβηση. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

Ο ιστός τοποθετήθηκε μέσα στο γουδί μαζί με 400 μl CTAB Buffer. Με το γουδοχέρι, λειοτριβήθηκε ο ιστός και τοποθετήθηκε σε σωλήνα eppendorf

χωρητικότητας 2 ml. Άλλα 400 µl CTAB Buffer προστέθηκαν στο γουδί για να 'ξεπλύνουν' ότι έχει απομείνει από τον λειοτριβημένο ιστό και τοποθετήθηκαν επίσης στον ίδιο σωλήνα eppendorf μαζί με 10 µl β-μερκαπτοαιθανόλης. Με το όργανο Vortex έγινε η ανάδευση όλων των περιεχομένων εντός του σωλήνα eppendorf. Το δείγμα στη συνέχεια επώαστηκε σε ξηρό θερμαντικό λουτρό στους 65 °C για 30 λεπτά. Με το πέρας των 30 λεπτών, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά σε 13000 rpm. Έπειτα, λήφθηκε το υπερκείμενο υγρό και τοποθετήθηκε σε νέο σωλήνα eppendorf των 2 ml. Σε αυτό το στάδιο, προστέθηκαν 800 µl χλωροφόρμιο και ακολούθησε η ανάδευση του δείγματος με το όργανο Vortex. Τοποθετήθηκε ξανά στη φυγόκεντρο για 20 λεπτά σε 7000 rpm και η διαδικασία με το χλωροφόρμιο έγινε άλλη μια φορά. Η υπερκείμενη φάση μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα eppendorf των 1,5 ml και εκεί προστέθηκε όγκος ισοπροπανόλης ίσος με τα 2/3 του όγκου του δείγματος και όγκος οξικού νατρίου ίσος με το 1/10 του όγκου του δείγματος. Το μείγμα αναδεύτηκε καλά και τοποθετήθηκε στους -20 °C για ένα βράδυ. Την επόμενη μέρα, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά σε 10000 rpm και το υπερκείμενο υγρό απορρίφτηκε. Ακολούθησαν 2 πλύσεις του περιεχόμενου του σωλήνα eppendorf με 70% αιθανόλη ως εξής: Τα 1000 µl αιθανόλης προστέθηκαν στον σωλήνα eppendorf, έγινε φυγοκέντρωση για 10 λεπτά σε 13000 rpm και τέλος απορρίφτηκε το υπερκείμενο υγρό. Όταν οι δύο πλύσεις ολοκληρώθηκαν και η υπολειπόμενη αιθανόλη εξατμίστηκε, προστέθηκαν στο δείγμα 50 µl 1x TE Buffer και 2 µl Rnase A. Το δείγμα τοποθετήθηκε στους 37 °C για 30 λεπτά με 1 ώρα. Τέλος, με τη χρήση της πιπέτας, διαλύθηκε τυχόν ίζημα που παρέμεινε.

8.3.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης εφαρμόστηκε στο πείραμα σε δύο σημεία. Πρώτον, μετά την απομόνωση του DNA μέσω του πρωτόκολλου CTAB και δεύτερον μετά την εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Και στα δύο αυτά σημεία, ο τρόπος παρασκευής του πηκτώματος έγινε με τον ίδιο τρόπο. Δηλαδή, σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας (0,01) ζυγίστηκαν 0,4 g αγαρόζης. Η ποσότητα αυτή μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη των 100 ml και στη συνέχεια προστέθηκαν 40 ml Buffer (TAE 1%). Η κωνική φιάλη τοποθετήθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων και στους 50 °C περίπου πραγματοποιήθηκε η πρώτη ανάδευση και ξανά τοποθετήθηκε στον φούρνο έως ότου φτάσει τους 85 °C για να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη. Το διάλυμα της αγαρόζης αφέθηκε να κρυώσει μέχρι να φτάσει περίπου

τους 50 °C και έπειτα τοποθετήθηκε σε ειδικό καλούπι έως ότου σταθεροποιηθεί. Σε κάθε διεξαγωγή ηλεκτροφόρησης, ανάλογα με το πλήθος των δειγμάτων, απαιτούνταν διαφορετικός αριθμός πηκτωμάτων είτε ίδιου μεγέθους είτε διαφορετικού. Ο τρόπος παρασκευής που περιγράφηκε παραπάνω αφορά πήκτωμα μεγάλου μεγέθους. Για πήκτωμα μικρότερου μεγέθους ο τρόπος παρασκευής ήταν ο ίδιος απλά σε ποσότητες των 0,2 g αγαρόζης και 20 Ml Buffer (TAE 1%) και σε μικρότερο καλούπι. Όταν τα πηκτώματα αγαρόζης σταθεροποιούνταν, τοποθετούνταν μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου βυθίζονταν σε Buffer TAE 1% για τη διεξαγωγή της ηλεκτροφόρησης.

Όσον αφορά τον τρόπο με τον οποίο τα δείγματα τοποθετούνταν στο πήκτωμα, υπήρχαν μικρές διαφορές ανάμεσα στα δείγματα που περιείχαν το DNA που προήλθε από την απομόνωση με το πρωτόκολλο CTAB και στα δείγματα που περιείχαν το ενισχυμένο DNA που προήλθε από τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Στην πρώτη περίπτωση, η ανάμειξη των δειγμάτων DNA μαζί με τη χρωστική Midori green direct πραγματοποιήθηκε σε ένα κομμάτι parafilm. Πιο αναλυτικά, με κάθε δείγμα DNA ποσότητας 5 Ml αναμειγνύονταν και 1 Ml χρωστικής. Η ίδια διαδικασία με τις ίδιες ποσότητες εφαρμόστηκε και για τον Ladder. Τέλος, το κάθε μείγμα DNA-χρωστικής και το μείγμα Ladder- χρωστικής τοποθετήθηκαν στις μικρές εσοχές του πηκτώματος γνωστές ως πηγαδάκια. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 100 Volt για 25 λεπτά.

Στη δεύτερη περίπτωση, η ανάμειξη των δειγμάτων DNA μαζί με την ίδια χρωστική πραγματοποιήθηκε εκτός εργαστηρίου. Αυτό συνέβη διότι, τα ενισχυμένα, μέσω της PCR, δείγματα DNA περιείχαν επίσης και ποσότητες των εκκινήτων. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται στο DNA barcoding θεωρούνται καθολικοί και έτσι υπήρχε κίνδυνος επιμόλυνσης του εργαστηρίου. Έτσι, σε 39 eppendorf των 1,5 Ml τοποθετήθηκε από 0,5 Ml χρωστική. Εκτός εργαστηρίου, προστέθηκε και αναμείχθηκε σε κάθε ένα από αυτά 3 Ml DNA. Το μείγμα Ladder- χρωστικής παρασκευάστηκε κανονικά στο εργαστήριο με ποσότητες 3 Ml Ladder και 0,5 Ml χρωστικής. Το μείγμα αυτό καθώς και τα μείγματα DNA- χρωστικής τοποθετήθηκαν στα πηγαδάκια του πηκτώματος. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 100 Volt για 20 λεπτά.

8.3.4 Υπολογισμός συγκέντρωσης DNA με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου

Αρχικά, το φασματοφωτόμετρο ρυθμίστηκε για φωτομέτρηση DNA. Στην εσοχή του φασματοφωτόμετρου, τοποθετήθηκε κυψελίδα που περιείχε 500 Μl ddH₂O για να πραγματοποιηθεί η τυφλή μέτρηση του οργάνου. Έπειτα, έγινε η μέτρηση των δειγμάτων, λαμβάνοντας την ένδειξη του στα 260 nm όπου απορροφά μέγιστα το DNA. Η μέτρηση των δειγμάτων έγινε προσθέτοντας 5 Μl δείγματος DNA και 495 Μl ddH₂O σε κυψελίδα και τοποθέτηση της στην εσοχή του οργάνου.

8.3.5 Αραίωση DNA

Σκοπός της αραίωσης είναι όλα τα δείγματα να αποκτήσουν ίδια συγκέντρωση. Επίσης, δείγματα με μεγάλη συγκέντρωση κατά την ηλεκτροφόρηση θα εμφάνιζαν πολύ φωτεινές ζώνες με αποτέλεσμα να μην είναι εφικτό να εξαχθούν συμπεράσματα. Μέσω της αραίωσης αυτό το πρόβλημα λύνεται.

Οι αραιώσεις έγιναν έτσι ώστε όλα τα δείγματα να έχουν τελικό όγκο 25 Μl και τελική συγκέντρωση DNA 40 ng Μl⁻¹.

8.3.6 Μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Στο παρόν πείραμα, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των εκκινητών its2F1 και its2R2. Οι αλληλουχίες των παραπάνω εκκινητών είναι οι εξής:

its2F1: 3'ATGCGATACTTGGTGTGAAT5'

its2R2: 3'GACGCTTCTCCAGACTACAAT5'

Η T_M των its2 εκκινητών σύμφωνα με τους υπολογισμούς του Oligo Calc είναι η Basic ίση με 47,7 °C.

Στους εκκινητές εφαρμόστηκε αραίωση αναμειγνύοντας 5 Μl του κάθε εκκινητή με 45 Μl H₂O.

Το Master Mix που συντέθηκε ήταν το εξής:

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
Buffer	105 Μl

H ₂ O	745,5 Ml
MgCl ₂ (1,5Mm)	31,5 Ml
d-NTPs (0,2Mm)	21 Ml
Taq (5 Unit)	21 Ml
its2F1 (0,5Mm)	42 Ml
its2R2 (0,5Mμ)	42 Ml

Πίνακας 1: Master mix για PCR

Έπειτα, το μίγμα διαχωρίστηκε σε 39 ίσες ποσότητες των 23 Ml, οι οποίες τοποθετήθηκαν η κάθε μια σε ένα ειδικό σωλήνα PCR (100 Ml) και έπειτα στον κάθε ένα προστέθηκαν 2 Ml από το κάθε δείγμα. Οι σωλήνες PCR τοποθετήθηκαν στον θερμοκυκλωποιητή για την διεξαγωγή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Το μηχάνημα εκτέλεσε 35 κύκλους, εκ των οποίων ο κάθε ένας κύκλος έθετε τα δείγματα στις παρακάτω συνθήκες:

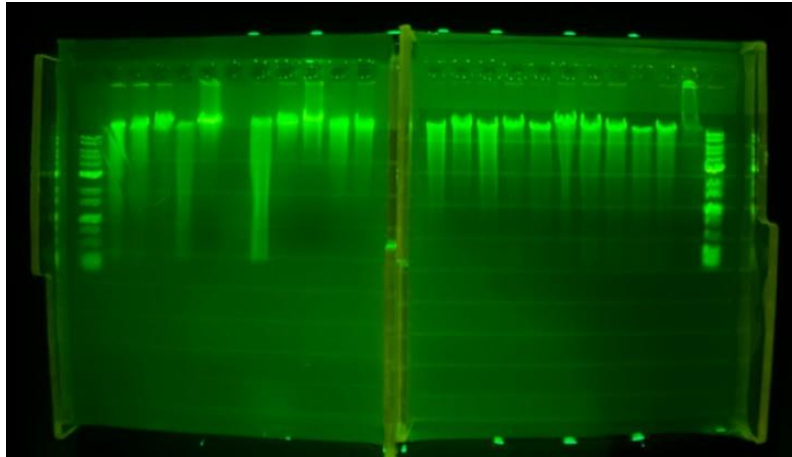
Βήματα	Θερμοκρασίες	Χρόνος
Αρχική Αποδιάταξη	94 °C	3min
Αποδιάταξη	94 °C	30sec
Θερμοκρασία Υβριδισμού	52 °C	30sec
Επιμήκυνση	72 °C	1min
Τελική Επιμήκυνση	72 °C	5min

Πίνακας 2: Set up για PCR

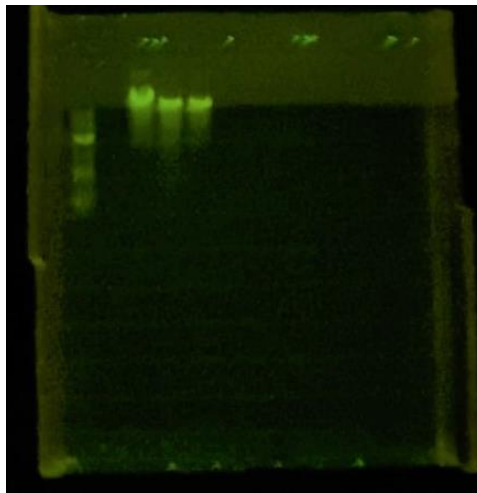
9. Αποτελέσματα

9.1 Αποτελέσματα απομόνωσης DNA με το πρωτόκολλο CTAB

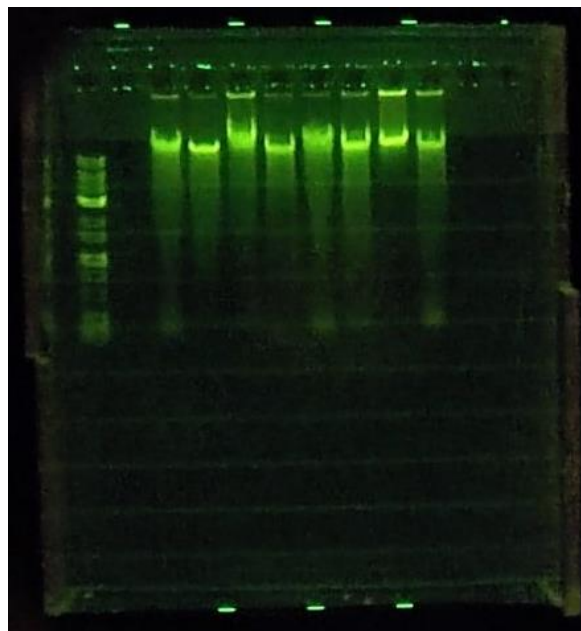
Μέσω της απομόνωσης DNA με το πρωτόκολλο CTAB προέκυψε το γενομικό DNA του κάθε δείγματος. Για τον έλεγχο της επιτυχίας της μεθόδου και της ποιότητας του DNA που απομονώθηκε, τα δείγματα που προέκυψαν ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης.



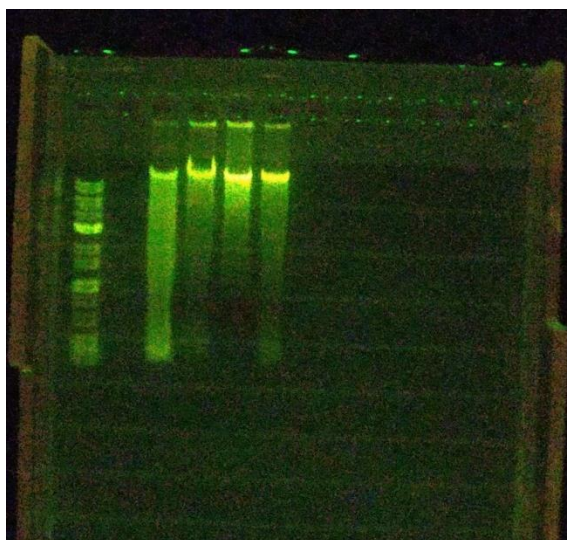
Εικόνα 8: Αποτελέσματα απομόνωσης DNA με το πρωτόκολλο CTAB για τα δείγματα 1-19



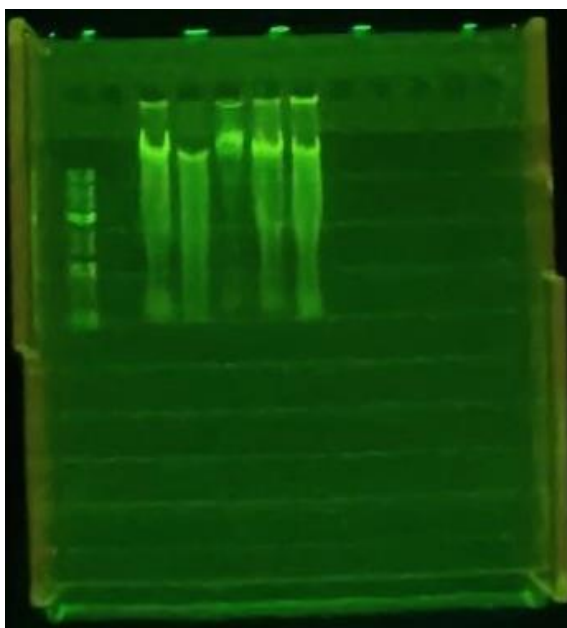
Εικόνα 9: Αποτελέσματα απομόνωσης DNA με το πρωτόκολλο CTAB για τα δείγματα 20-22



Εικόνα 10: Αποτελέσματα απομόνωσης DNA με το πρωτόκολλο CTAB για τα δείγματα 23-30



Εικόνα 11: Αποτελέσματα απομόνωσης DNA με το πρωτόκολλο CTAB για τα δείγματα 31-34



Εικόνα 12: Αποτελέσματα απομόνωσης DNA με το πρωτόκολλο CTAB για τα δείγματα 35-39

9.2 Αποτελέσματα υπολογισμού συγκέντρωσης DNA με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου

Μέσω της χρήσης του φασματοφωτόμετρου, προκύπτουν για κάθε δείγμα η απορρόφηση στα 260 nm και ο λόγος της απορρόφησης στα 260 nm προς την αντίστοιχη στα 280 nm.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του DNA κάθε δείγματος έγινε με βάση τον τύπο:

$$C \text{ (ng } \mu\text{l}^{-1}) = A_{260} \times 50 \times 100$$

Δείγμα	A260	A260/280	C
1	0,081	1,71	405
2	0,072	1,66	360
3	0,071	1,76	355
4	0,037	1,28	185
5	0,01	3,42	50
6	0,039	1,79	195
7	0,038	2,69	190
8	0,09	1,65	450
9	0,036	2,66	180
10	0,084	2,15	420
11	0,02	1,48	100
12	0,025	1,71	125
13	0,018	1,45	90
14	0,008	1,14	40
15	0,018	1,62	90
16	0,012	3,06	60
17	0,011	2,72	55
18	0,016	8,01	80
19	0,054	1,41	270
20	0,019	2,33	95
21	0,019	1,65	95
22	0,008	2,64	40
23	0,047	6,52	235
24	0,019	1,66	95
25	0,075	1,27	375
26	0,067	1,26	335
27	0,13	2,14	650
28	0,024	1,3	120
29	0,066	1,19	330
30	0,036	2,68	180
31	0,02	1,48	100
32	0,02	1,48	100
33	0,02	1,48	100

34	0,02	1,48	100
35	0,286	1,85	400
36	0,076	2,18	380
37	0,26	2,12	400
38	0,128	1,91	400
39	0,151	1,76	400

Πίνακας 3: Αποτελέσματα φασματοφωτομέτρησης και υπολογισμός συγκέντρωσης δειγμάτων

9.3 Αποτελέσματα αραίωσης DNA

Για τον υπολογισμό του όγκου δείγματος DNA που χρειάστηκε για την κάθε αραίωση, χρησιμοποιήθηκε ο τύπος:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

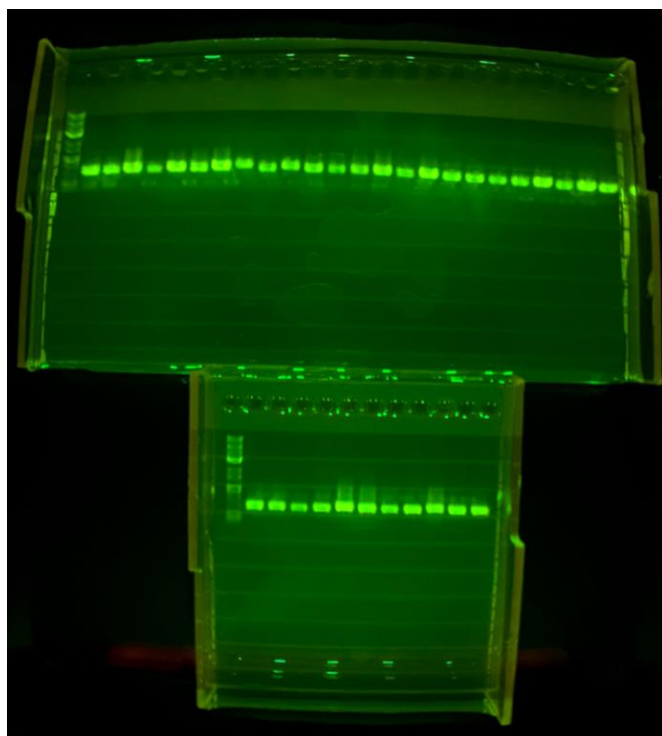
Δείγμα	C (ng/μL)	VDNA (μL)	VH20 (μL)
1	405	2,47	22,5
2	360	2,78	22,2
3	355	2,82	22,2
4	185	5,41	19,6
5	50	20,00	5,0
6	195	5,13	19,9
7	190	5,26	19,7
8	450	2,22	22,8
9	180	5,56	19,4
10	420	2,38	22,6
11	100	10,00	15,0
12	125	8,00	17,0
13	90	11,11	13,9
14	40	25,00	0,0
15	90	11,11	13,9
16	60	16,67	8,3
17	55	18,18	6,8
18	80	12,50	12,5
19	270	3,70	21,3

20	95	10,53	14,5
21	95	10,53	14,5
22	40	25,00	0,0
23	235	4,26	20,7
24	95	10,53	14,5
25	375	2,67	22,3
26	335	2,99	22,0
27	650	1,54	23,5
28	120	8,33	16,7
29	330	3,03	22,0
30	180	5,56	19,4
31	100	10,00	15,0
32	100	10,00	15,0
33	100	10,00	15,0
34	100	10,00	15,0
35	400	2,50	22,5
36	380	2,63	22,4
37	400	2,50	22,5
38	400	2,50	22,5
39	400	2,50	22,5

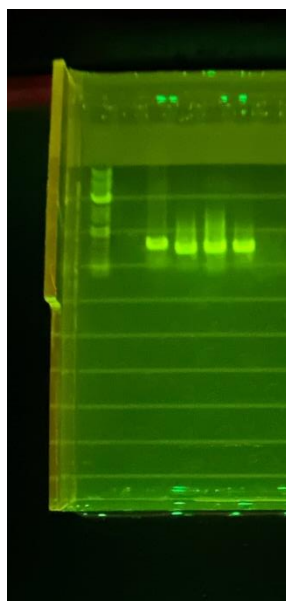
Πίνακας 4: Αραιώσεις δειγμάτων

9.4 Αποτελέσματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με τη χρήση του εκκινητή ITS2

Για τον έλεγχο της επιτυχίας της ενίσχυσης των τμημάτων DNA με τη χρήση του εκκινητή ITS2 εφαρμόστηκε ξανά ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.



Εικόνα 13: Αποτελέσματα ενίσχυσης των δειγμάτων DNA 1-35 με τη χρήση του εκκινητή ITS2



Εικόνα 14: Αποτελέσματα ενίσχυσης των δειγμάτων DNA 36-39 με τη χρήση του εκκινητή ITS2

9.5 Αποτελέσματα αλληλούχισης δειγμάτων

Τα δείγματα που προέκυψαν από τη μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης στην εταιρεία ceMIA για την εύρεση των αλληλουχιών τους με ακρίβεια.

Δείγμα 1



Εικόνα 15: Εικόνα δείγματος 1

GCGCCCGAGGCCAATCGGCCAAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCAAGCGTT
GCGTCGCTTCGTGCCATCACCACCCTCCATTTCGGTGTGTTGGTGCAGGCTC
GAATGTGAAGAGTGGTTCGCCGTGCTAATTGGTGCGACGGACTGAAGAGT
GGGTTGTTGTCCTCATGGCCACGATCGACAAGGGGTGGACGTATGCCACG
AGCACGGCCAAACAATGTCCCATGGTGGCCTGAGGAAGCTTAAACATCCC
AGGTGAACCCAAACCCACATGCCGCACAACAAGCGGTGCCTTGGAATGCG
ACCCCAGGATGGGCGGGGACACCCGCCGAGTTTAAGCATATCAATAAGCG
GAGGAGAAGAACTTAAGAGGATTCCCTTAGTAACGGCGAGCGAACCGG
GATCGGCCCAGCATGGGAATCGGGTTGCCATGTAGCAGCTCGAATTGT

Δείγμα 2



Εικόνα 16: Εικόνα δείγματος 2

CCAATCGGCCAAGGGGACGTCTGCCTGGGCGTCAAGCGTTGCGTCGCTTC
GTGCCATCACCACCCTCCATTTCGGTGTGTTGGTGCAGGCTCGAATGTGAA
GAGTGGTTCGCCGTGCTAATTGGTGCGACGGACTGAAGAGTGGGTTGTTG
TCCTCATGGCCACGATCGACAAGGGGTGGACGTATGCCACGAGCACGGCC
AAACAATGTCCCATGGTGGCCTGAGGAAGCTTAAACATCCCAGGTGAACC

CAAACCCACATGCCGCACAACAAGCGGTGCCTTGGAATGCGACCCCAGGA
TGGGCGGGGACACCCGCCGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAA
GAAACTTAAGAGGATTCCCTTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGATCGGCCC
AGCATGGGAATCGGGTTGCCATGTAGCAGCTCGAATTGTA

Δείγμα 3



Εικόνα 17: Εικόνα δείγματος 3

CCAGCTGGCCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTGTGTCGCTCC
ATAGGACCTTCGCTGCAATGCGGTTGTCTTATTCAGGATGCGGAGAATGG
CCTGTCATGCGCTGATGTGTGGCTGGCTGAAGAGCGAGATGATACTGTCT
AGGCAACGGTCGATTAATGGGTGGGATGGAAGCCCCAGTTGATTCATCGT
CAGTTTGTTTTGACAGTTTTCCACATAACCCAACACAATTGTCATCACAAG
ACAATTGACATGTGACCCCAGGATGGGCGGGATGACCCGCTGAGTTTAAG
CATATCATTAACCGGAGGAGAAGAACTTACAAGGATTCCCCTAGTAACG
GCGAGCGAACCGGGATTTGCCAGCTTGGAATCGGGCTGCTTTTGCGGC
TCGAATTGTA

Δείγμα 4



Εικόνα 18: Εικόνα δείγματος 4

CCAGCTGGCCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTGAATCGCTCC
ATAAGACCTTCGATGCTATGCGGTGGTCTTATCTAGGATGCGGGGAATGG
CCCGTCATGCGCTAATGTGTGGCAGGCTGAAGAGCGGGATGATTTTCTCTT
GGCAATGATCGATTAATGGGTGGGATGGAAGCCTCGGTTGATCCTATCAT
CGTCAGGTTGCTTTGAGAAAGCTGTGCATATCCCGGCCTAACCTAACTCAC
TTGTCCTTGGAAGACAATTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGGTGACC
CGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACGAGGA
TTCCCCTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGATTTGCCCAGCATGGGAATCGG
GCTGCTATGCGGCTCGAA

Δείγμα 5



Εικόνα 19: Εικόνα δείγματος 5

CCAGCTGGCCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTGAATCGCTCC
ATAAGACCTTCGATGCTATGCGGTGGTCTTATCTAGGATGCGGGGAATGG
CCCGTCATGCGCTAATGTGTGGCAGGCTGAAGAGCGGGATGATTTTCTCTT
GGCAATGATCGATTAATGGGTGGGATGGAAGCCTCGGTTGATCCTATCAT
CGTCAGGTTGCTTTGAGAAAGCTGTGCATATCCCGGCCTAACCTAACTCAC
TTGTCCTTGGAAGACAATTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGGTGACC

CGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACGAGGA
TTCCCCTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGATTTGCCCAGCATGGGAATCGG
GCTGCTATGCGGCTCGAAT

Δείγμα 6



Εικόνα 20: Εικόνα δείγματος 6

CCAGCTGGCCAAGGGCACGTCCGCTTGGGCGTCAAGCATTGAGTCGCTCC
ACAGGTCATCTCTATGAGGTGGGCATCTGGGATGCGGAGAATGGCC
CGTCATGCGTTGAGGTGTGGCCGGCTGAAGAGAGGGATGCTTTTATCTTG
GCAACGGTCGATTAATGGTTGGGATGGAAGCCCCAGTTGATCCTCTTCAT
CTTCACGTTGCTTTGAGAGAGCTGTACATTTCTAAGTAACCCAATGCAATT
GTCAATACAAGATAGTTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGGTGACCCG
CTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACAAGGATTC
CCCTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGATCAGCCCAGCTTGGGAATCGGGTT
GCTTTGCGGCTCGAATT

Δείγμα 7



Εικόνα 21: Εικόνα δείγματος 7

CCAGCTGGCCAAGGGCACGTCCGCTTGGGCGTCAAGCATTGAGTCGCTCC
 ACAGGTCACTCATCTCTATGAGGTGGGCATCTGGGATGCGGAGAATGGCC
 CGTCATGCGTTGAGGTGTGGCCGGCTGAAGAGAGGGATGCTTTTATCTTG
 GCAACGGTCGATTAATGGTTGGGATGGAAGCCCCAGTTGATCCTCTTCAT
 CTTACGTTGCTTTGAGAGAGCTGTACATTTCTAAGTAACCCAATGCAATT
 GTCAATACAAGATAGTTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGGTGACCCG
 CTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACAAGGATTC
 CCCTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGATCAGCCCAGCTTGGGAATCGGGTT
 GCTTTGCGGCTCGAATTGT

Δείγμα 8



Εικόνα 22: Εικόνα δείγματος 8

CCAGCTGGCCAAGGGCACGTCCGCTTGGGCGTCAAGCATTGAGTCGCTCC
ACAGGTCACTCATCTCTATGAGGTGGGCATCTGGGATGCGGAGAATGGCC
CGTCATGCGTTGAGGTGTGGCCGGCTGAAGAGAGGGATGCTTTTATCTTG
GCAACGGTCGATTAATGGTTGGGATGGAAGCCCCAGTTGATCCTCTTCAT
CTTCACGTTGCTTTGAGAGAGCTGTACATTTCTAAGTAACCCAATGCAATT
GTCAATACAAGATAGTTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGGTGACCCG
CTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACAAGGATTC
CCCTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGATCAGCCCAGCTTGGGAATCGGGTT
GCTTTGCGGCTCGAATT

Δείγμα 9



Εικόνα 23: Εικόνα δείγματος 9

CCAGCTGGCCAAGGGCACGTCCGCTTGGGCGTCAAGCATTGAGTCGCTCC
ACAGGTCACTCATCTCTATGAGGTGGGCATCTGGGATGCGGAGAATGGCC
CGTCATGCGTTGAGGTGTGGCCGGCTGAAGAGAGGGATGCTTTTATCTTG
GCAACGGTCGATTAATGGTTGGGATGGAAGCCCCAGTTGATCCTCTTCAT
CTTCACGTTGCTTTGAGAGAGCTGTACATTTCTAAGTAACCCAATGCAATT
GTCAATACAAGATAGTTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGGTGACCCG
CTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACAAGGATTC
CCCTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGATCAGCCCAGCTTGGGAATCGGGTT
GCTTTGCGGCTCGAATT

Δείγμα 10



Εικόνα 24: Εικόνα δείγματος 10

CCAGCTGGCCAAGGGCACGTCCGCTTGGGCGTCAAGCATTGAGTCGCTCC
 ACAGGTCATCTCTATGAGGTGGGCATCTGGGATGCGGAGAATGGCC
 CGTCATGCGTTGAGGTGTGGCCGGCTGAAGAGAGGGATGCTTTTATCTTG
 GCAACGGTCGATTAATGGTTGGGATGGAAGCCCCAGTTGATCCTCTTCAT
 CTTACGTTGCTTTGAGAGAGCTGTACATTTCTAAGTAACCCAATGCAATT
 GTCAATACAAGATAGTTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGGTGACCCG
 CTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACAAGGATTC
 CCCTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGATCAGCCCAGCTTGGGAATCGGGTT
 GCTTTGCGGCTCGAAT

Δείγμα 11



Εικόνα 25: Εικόνα δείγματος 11

CCAGCTGGCCAAGGGCACGTCCGCTTGGGCGTCAAGCATTGAGTCGCTCC
 ACAGGTCATCTCTATGAGGTGGGCATCTGGGATGCGGAGAATGGCC
 CGTCATGCGTTGAGGTGTGGCCGGCTGAAGAGAGGGATGCTTTTATCTTG
 GCAACGGTCGATTAATGGTTGGGATGGAAGCCCCAGTTGATCCTCTTCAT
 CTTACGTTGCTTTGAGAGAGCTGTACATTTCTAAGTAACCCAATGCAATT
 GTCAATACAAGATAGTTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGGTGACCCG

CTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACAAGGATTC
CCCTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGATCAGCCCAGCTTGGGAATCGGGTT
GCTTTGCGGCTCGAAT

Δείγμα 12



Εικόνα 26: Εικόνα δείγματος 12

CCAGCCGGCCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTGTGTCGCTCC
ATAGGACCTTCGCGGCTACGCGGCTGTTCTTATCAGGGATGCGGAAAAGG
GCCTGTCATGCGCTTATGTGTGGCTGGCTGAAAAGCGGGATGATACTCTCT
TGGCAATGGCCAATTAAGGGGTGGAATGGAACCCCCGTTGATTCATCGTC
CGGTTGCTCTGAAAAATTATTGGATATTCCAGCTATAACCCAATACAATTG
TCATTGCAAAACAGTTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGATGACCCGC
TAAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAAACTTACAAGGATTCC
CCTAGTAACGGCAAGCGAACCGGGATTTGCCAGCTGGGAAATCGGGCTG
CTTTTGCGGCTCGAATT

Δείγμα 13



Εικόνα 27: Εικόνα δείγματος 13

CCAGCCGGCCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTGTGTCGCTCC
ATAGGACCTTCGCGGCTACGCGGCTGTCTTATCATGGATGCGGAGAATGG

CCTGTCATGCGCTTATGTGTGGCTGGCTGAAGAGCGGGATGATACTCTCTT
GGCAATGGCCGATTAATGGGTGGGATGGAAGCCCCGTTGATTCATCGTCC
GGTTGCTCTGAGAAATTATTGGATATTCCAGCTATAACCCAATACAATTGT
CATTGCAAGACAGTTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGATGACCCGCT
GAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACGAGGATTCCC
CTAGTAACGGCGAGCGAACCAGGGATTTGCCAGCTTGGGAATCGGGCTGC
TTTTGCGGCTCGAATT

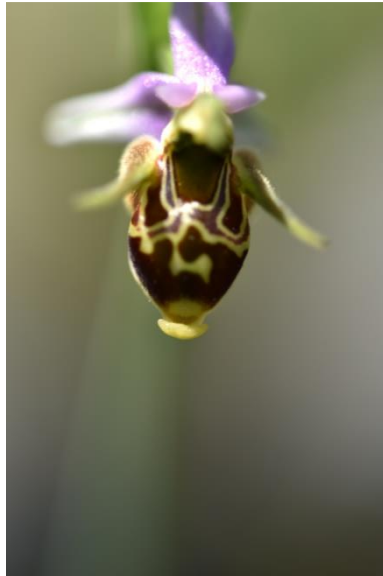
Δείγμα 14



Εικόνα 28: Εικόνα δείγματος 14

CCAGCCGGCCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTGTGTCGCTCC
ATAGGACCTTCGCGGCTACGCGGCTGTCTTATCATGGATGCCGAAAATGG
CCTGGCATGCGCTTATGTGTGGCTGGCTGAAGAACGGGATGATACTCTCTT
GGCAATGGCCGATTAATGGGTGGGAAGGAAGCCCCGTTGAATCCTCCTCC
GGTTGCTCTGAAAAATTATTGGATATTCCCCTATTACCCAATACAATTGT
CATTGCAAGACAGTTGACATGCCACCCCCGGATGGGCGGGATGACCCGCT
TAATTTAAGCATATCAATAAGCGGAAGAAAAGAACTTACCAAGATTCCC
CTAATAACGGCCAGCGAACCAGGGATTTGCCAGCTTGGGAATCGGGCTGCT
TTTGCGCTCAATT

Δείγμα 15



Εικόνα 29: Εικόνα δείγματος 15

CCAGCTGGCCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTAAATCGCTCC
 ATAAGACGCCCCGATGCTACGAGCGTTCTTATCTAGGATGCGGAGTGTGGC
 CCGTCATGCGATCATGTGTGGCAGGCTGAAGAGCGGGATGATTTTCTCTT
 GGCAATGATCGATTAATGGGTGGGATGAAAGCCGTAGTTGTTCCCTCTTCAT
 CATCAGGTTGTTATGAGAAAGCCGTGCATTTCCCATCTAACCCAATTCAAT
 TGTCTTCTGACAAATTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGGTGACCCGC
 TGAGTTTAAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACAAGGATTCC
 CCTAGTAACGGCGAGCGAACC GGGATTTGCCCAGCATGGGAATCGAGCTG
 CTGTGCGGCTCGAAT

Δείγμα 16



Εικόνα 30: Εικόνα δείγματος 16

CCAGCTGGCCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTAAATCGCTCC
ATAAGACGCCCCGATGCTACGAGCGTTCTTATCTAGGATGCGGAGTGTGGC
CCGTCATGCGATCATGTGTGGCAGGCTGAAGAGCGGGATGATTTTCTCTT
GGCAATGATCGATTAATGGGTGGGATGAAAGCCGTAGTTGTTCTCTTCAT
CATCAGGTTGTTATGAGAAAGCCGTGCATTTCCCATCTAACCCAATTCAAT
TGTCTTCTGACAAATTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGGTGACCCGC
TGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACAAGGATTCC
CCTAGTAACGGCGAGCGAACC GG GATTTGCCCAGCATGGGAATCGAGCTG
CTGTGCGGCTCGAATT

Δείγμα 17



Εικόνα 31: Εικόνα δείγματος 17

CCAGCTGGCCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTAAATCGCTCC
ATAAGACGCCCCGATGCTACGAGCGTTCTTATCTAGGATGCGGAGTGTGGC
CCGTCATGCGATCATGTGTGGCAGGCTGAAGAGCGGGATGATTTTCTCTT
GGCAATGATCGATTAATGGGTGGGATGAAAGCCGTAGTTGTTCTCTTCAT
CATCAGGTTGTTATGAGAAAGCCGTGCATTTCCCATCTAACCCAATTCAAT
TGTCTTCTGACAAATTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGGTGACCCGC
TGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACAAGGATTCC
CCTAGTAACGGCGAGCGAACC GG GATTTGCCCAGCATGGGAATCGAGCTG
CTGTGCGGCTCGAATT

Δείγμα 18



Εικόνα 32: Εικόνα δείγματος 18

CCAGCTGGCCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTAAATCGCTCC
ATAAGACGCCCCGATGCTACGAGCGTTCTTATCTAGGATGCGGAGTGTGGC
CCGTCATGCGATCATGTGTGGCAGGCTGAAGTGCGGGATGATTTTCTCAT
GGCAATGATCGATTAATGGGTGGGATGAAAGCCGTAGTTGTTCTCTTCAT
CATCAGGTTGTTATGAGAAAGCCGTGCATTTCCCATCTAACCCAATTCAAT
TGTCTTCTGACAAATTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGGTGACCCGC
TGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACAAGGATTCC
CCTAGTAACGGCGAGCGAACC GGGATTTGCCCAGCATGGGAATCGAGCTG
CTGTGCGGCTCGAATTG

Δείγμα 19



Εικόνα 33: Εικόνα δείγματος 19

CCAGCTGGCCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTAAATCGCTCC
ATAAGACGCCCCGATGCTACGAGCGTTCTTATCTAGGATGCGGAGTGTGGC
CCGTCATGCGATCATGTGTGGCAGGCTGAAGAGCGGGATGATTTTCTCTT
GGCAATGATCGATTAATGGGTGGGATGAAAGCCGTAGTTGTTCTCTTCAT
CATCAGGTTGTTATGAGAAAGCCGTGCATTTCCCATCTAACCCAATTCAAT
TGTCTTCTGACAAATTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGGTGACCCGC
TGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACAAGGATTCC
CCTAGTAACGGCGAGCGAACC GGGATTTGCCCAGCATGGGAATCGAGCTG
CTGTGCGGCTCGAATTG

Δείγμα 20



Εικόνα 34: Εικόνα δείγματος 20

CCAGCTGGCCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTAAATCGCTCC
ATAAGACGCCCCGATGCTACGAGCGTTCTTATCTAGGATGCGGAGTGTGGC
CCGTCATGCGATCATGTGTGGCAGGCTGAAGAGCGGGATGATTTTCTCTT
GGCAATGATCGATTAATGGGTGGGATGAAAGCCGTAGTTGTTCTCTTCAT
CATCAGGTTGTTATGAGAAAGCCGTGCATTTCCCATCTAACCCAATTCAAT
TGTCTTCTGACAAATTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGGTGACCCGC
TGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACAAGGATTCC
CCTAGTAACGGCGAGCGAACC GG GATTTGCCCAGCATGGGAATCGAGCTG
CTGTGCGGCTCGAATT

Δείγμα 21



Εικόνα 35: Εικόνα δείγματος 21

CAGCTGGCCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTGTGTCGCTCCA
TAGGACCTTCGCTGGTATGCGGTTGTCCTATATAGGATGCGGAGAATGGC
CTGTCATGCGTTGATGTGTGGCTGGCTGAAGAGCGGGATGATACTCTCCT
GGCAATGGTCGATTAATGGGTGGGATGGAAGCCCCAGTGATTCATCGTCA
GGTTGCCTTGAGAAGTTTTTGCATTTTCCAGCTAACCCAACACAATTGTCA

TTACAAGACAATTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGATGACCCGCTGA
GTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACGAGGATTCCCCT
AGTAACGGCGAGCGAACCGGGATTTGCCAGCTTGGAATCGGGTTGCTT
TTGCGGCTCGAATT

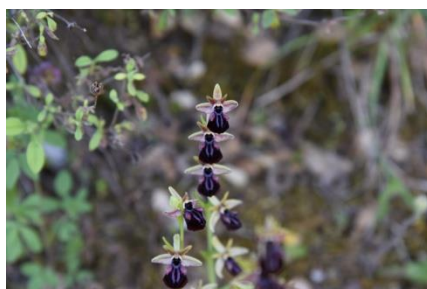
Δείγμα 22



Εικόνα 36: Εικόνα δείγματος 22

CCAGCTGGCCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTGTGTCGCTCC
ATAGGACCTTCGCTGGTATGCGGTTGTCCTATATAGGATGCGGAGAATGG
CCTGTCATGCGTTGATGTGTGGCTGGCTGAAGAGCGGGATGATACTCTCCT
GGCAATGGTCGATTAATGGGTGGGATGGAAGCCCCAGTGATTCATCGTCA
GGTTGCCTTGAGAAGTTTTTGCATTTTCCAGCTAACCCAACACAATTGTCA
TTACAAGACAATTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGATGACCCGCTGA
GTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACGAGGATTCCCCT
AGTAACGGCGAGCGAACCGGGATTTGCCAGCTTGGAATCGGGTTGCTT
TTGCGGCTCGAATTGTA

Δείγμα 23



Εικόνα 37: Εικόνα δείγματος 23

CCAGCTGGCCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTAAATCGCTCC
ATAAGACGCCCCGTTGCTACGAGCGTTCTTATCTAGGATGCGGAGTGTGGC
CCGTCATGCGATCATGTGTGGCAGGCTGAAGAGCGGGATGATTTTCTCTT
GGCAATGATCGATTAATGGGTGGGATGAAAGCCGTAGTTGTTCTCTTCAT
CATCAGGTTGTTATGAGAAAGCCGTGCATTTCCCATCTAACCCAATTCAAT
TGCTTTCTGACAAATTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGGTGACCCGC
TGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACAAGGATTCC
CCTAGTAACGGCGAGCGAACC GGGATTTGCCAGCATGGGAATCGAGCTG
CTGTGCGGCTCGAATT

Δείγμα 24



Εικόνα 38: Εικόνα δείγματος 24

CCAGCCGGCCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTGTGTCGCTCC
ATAGGACCTTCGCGGCTACGCGGCTGTCTTATCATGGATGCGGAGAATGG
CCTGTCATGCGCTTATGTGTGGCTGGCTGAAGAGCGGGATGATACTCTCTT
GGCAATGGCCGATTAATGGGTGGGATGGAAGCCCCGTTGATTCATCGTCC
GGTTGCTCTGAGAAATTATTGGATATTCCAGCTATAACCCAATACAATTGT
CATTGCAAGACAGTTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGATGACCCGCT
GAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACGAGGATTCCC
CTAGTAACGGCGAGCGAACC GGGATTTGCCAGCTTGGGAATCGGGCTGC
TTTTGCGGCTCGAATTGT

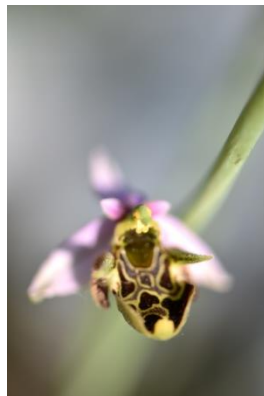
Δείγμα 25



Εικόνα 39: Εικόνα δείγματος 25

CCAGCTGGCCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTAAATCGCTCC
ATAAGACGCCCCGATGCTACGAGCGTTCTTATCTAGGATGCGGAGTGTGGC
CCGTCATGCGATCATGTGTGGCAGGCTGAAGAGCGGGATGATTTTCTCTT
GGCAATGATCGATTAATGGGTGGGATGAAAGCCGTAGTTGTTCTCTTCAT
CATCAGGTTGTTATGAGAAAGCCGTGCATTTCCCATCTAACCCAATTCAAT
TGTCTTCTGACAAATTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGGTGACCCGC
TGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACAAGGATTCC
CCTAGTAACGGCGAGCGAACCAGGATTTGCCCATGGGAATCGAGCTG
CTGTGCGGCTCGAAT

Δείγμα 26



Εικόνα 40: Εικόνα δείγματος 26

CCAGCTGGCCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTAAATCGCTCC
ATAAGACGCCCCGATGCTACGAGCGTTCTTATCTAGGATGCGGAGTGTGGC
CCGTCATGCGATCATGTGTGGCAGGCTGAAGAGCGGGATGATTTTCTCTT
GGCAATGATCGATTAATGGGTGGGATGAAAGCCGTAGTTGTTCTCTTCAT
CATCAGGTTGTTATGAGAAAGCCGTGCATTTCCCATCTAACCCAATTCAAT
TGTCTTCTGACAAATTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGGTGACCCGC
TGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACAAGGATTCC

CCTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGATTTGCCCAGCATGGGAATCGAGCTG
CTGTGCGGCTCGAATTG

Δείγμα 27



Εικόνα 41: Εικόνα δείγματος 27

CCAGCTGGCCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTAAATCGCTCC
ATAAGACGCCCCGATGCTACGAGCGTTCTTATCTAGGATGCGGAGTGTGGC
CCGTCATGCGATCATGTGTGGCAGGCTGAAGAGCGGGATGATTTTCTCTT
GGCAATGATCGATTAATGGGTGGGATGAAAGCCGTAGTTGTTCTCTTCAT
CATCAGGTTGTTATGAGAAAGCCGTGCATTTCCCATCTAACCCAATTCAAT
TGTTCTTGACAAATTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGGTGACCCGC
TGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACAAGGATTCC
CCTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGATTTGCCCAGCATGGGAATCGAGCTG
CTGTGCGGCTCGAATTG

Δείγμα 28



Εικόνα 42: Εικόνα δείγματος 28

CCAGCTGGCCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTAAATCGCTCC
ATAAGACGCCCCGATGCTACGAGCGTTCTTATCTAGGATGCGGAGTGTGGC
CCGTCATGCGATCATGTGTGGCAGGCTGAAGAGCGGGATGATTTTCTCTT
GGCAATGATCGATTAATGGGTGGGATGAAAGCCGTAGTTGTTCTCTTCAT

CATCAGGTTGTTATGAGAAAGCCGTGCATTTCCCATCTAACCCAATTCAAT
TGTCTTCTGACAAATTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGGTGACCCGC
TGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACAAGGATTCC
CCTAGTAACGGCGAGCGAACC GGGATTTGCCCAGCATGGGAATCGAGCTG
CTGTGCGGCTCGAATTG

Δείγμα 29



Εικόνα 43: Εικόνα δείγματος 29

CCAGCTGGCYGAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTGAATCGCTCC
ACAAGACCTTCGAAATTATGCGGCGGTCTTTTTTCGGATGCGGAGAATGG
CCCGTCGTGCGCTGATGTGCGGCGGGCTGAAGAGCGGGATGATTTTCTCT
TAGCACTGATCGATTAATTGGTGGGATGGAAGCCCCAGCTGATCCTCTTC
ATCGTCATGTTGCATTGAGAACGCTGTGCATTTCCCAGCTTAACCCAACTC
AATATTCAATAGAAGAAAATTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGATG
ACCCGCTGAATTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACGA
GGATTCCCCTAGTAACGGCGAGCGAACC GGGATCTGCCCAGCTTGGAAT
CGGGCTGCTCTGCGGCCCGAATTG

Δείγμα 30



Εικόνα 44: Εικόνα δείγματος 30

CCAGCTGGCCGAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTGAATCGCTCC
ACAAGACCTTCGAAATTATGCGGCGGTCTTTTTTTGGATGCGGAGAATGG
CCCGTCGTGCGCTGATGTGCGGCGGGCTGAAGAGCGGGATGATTTTCTCT
TAGCACTGATCGATTAATTGGTGGGATGGAAGCCCCAGCTGATCCTCTTC
ATCGTCATGTTGCATTGAGAACGCTGTGCATTTCCCAGCTTAACCCAACTC
AATATTCAATAGAAGAAAATTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGATG
ACCCGCTGAATTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACGA
GGATTCCCCTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGATCTGCCCAGCTTGGAAT
CGGGCTGCTCTGCGGCCCGAATT

Δείγμα 31



Εικόνα 45: Εικόνα δείγματος 31

CCAGCTGGCCGAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTGAATCGCTCC
ACAAGACCTTCGAAATTATGCGGCGGTCTTTTTTTGGATGCGGAGAATGG

CCCGTCGTGCGCTGATGTGCGGCGGGCTGAAGAGCGGGATGATTTTCTCT
TAGCACTGATCGATTAATTGGTGGGATGGAAGCCCCAGCTGATCCTCTTC
ATCGTCATGTTGCATTGAGAACGCTGTGCATTTCCCAGCTTAACCCAACTC
AATATTCAATAGAAGAAAATTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGATG
ACCCGCTGAATTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACGA
GGATTCCCCTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGATCTGCCCAGCTTGGAAT
CGGGCTGCTCTGCGGCCCGAATT

Δείγμα 32



Εικόνα 46: Εικόνα δείγματος 32

CCAGCTGGCCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTAAATCGCTCC
ATAAGACGCCCGATGCTACGAGCGTTCTTATCTAGGATGCGGAGTGTGGC
CCGTCATGCGATCATGTGTGGCAGGCTGAAGAGCGGGATGATTTTCTCTT
GGCAATGATCGATTAATGGGTGGGATGAAAGCCGTAGTTGTTTCCTCTTCAT
CATCAGGTTGTTATGAGAAAGCCGTGCATTTCCCATCTAACCCAATTCAAT
TGTCTTCTGACAAATTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGGTGACCCGC
TGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACAAGGATTCC
CCTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGATTTGCCCAGCATGGGAATCGAGCTG
CTGTGCGGCTCGAA

Δείγμα 33



Εικόνα 47: Εικόνα δείγματος 33

CCAATCGGCTAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCGTTGCATCGCTTC
 GTGCCGTCACCACACACCAATGGGCGTTGTCGTGCGGGCTCGAATGCGGA
 GAGTGGTCCGCCGTGCTCATCGGTGCGGCGGATTGAAGAGCGGGTTGTCG
 TCCTCATGGCCACGATCGACAAGGGGTGGACGGAAGCCACGAGCACGGC
 CAAACAGTGTCTCACGCTGGCCTGAGGACGATCATACATCCCCAGCGAAC
 CCAAATCCACACGCCGCGCCGCAAGCGGCGATTTGGAATGCGACCCCAGG
 ATGGGCGGGGCCACCCGCCGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGA
 AGAAACTTAAGAGGATTCCCCTAGTAACGGCGAGCGAACCAGGATCAGC
 CCAGCATGGGAATCGGGTTGCCATGTAGCAACCCGAATTG

Δείγμα 34



Εικόνα 48: Εικόνα δείγματος 34

CCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTGAATCGCTCCATAAGACC
TTCGATGCTATGCGGTGGTCTTATCTAGGATGCGGGGAATGGCCCGTCAT
GCGCTAATGTGTGGCAGGCTGAAGAGCGGGATGATTTTCTCTTGGCAATG
ATCGATTAATGGGTGGGATGGAAGCCTCGGTTGATCCTATCATCGTCAGG
TTGCTTTGAGAAAGCTGTGCATATCCCGGCCTAACCTAACTCACTTGTCCT
TGGAAGACAATTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGGTGACCCGCTGA
GTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACGAGGATTCCCCT
AGTAACGGCGAGCGAACC GGGATTTGCCCAGCATGGGAATCGGGCTGCTA
TGCGGCTCGAATTG

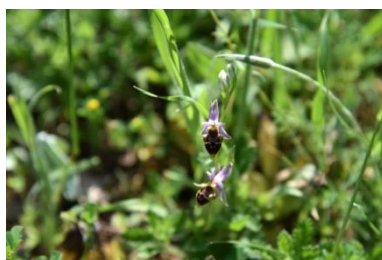
Δείγμα 35



Εικόνα 49: Εικόνα δείγματος 35

CCAGCTGGCCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTAAATCGCTCC
ATAAGACGCCCCGATGCTACGAGCGTTCTTATCTAGGATGCGGAGTGTGGC
CCGTCATGCGATCATGTGTGGCAGGCTGAAGAGCGGGATGATTTTCTCTT
GGCAATGATCGATTAATGGGTGGGATGAAAGCCGTAGTTGTTCCCTCTTCAT
CATCAGGTTGTTATGAGAAAGCCGTGCATTTCCCATCTAACCCAATTCAAT
TGTCTTCTGACAAATTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGGTGACCCGC
TGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACAAGGATTCC
CCTAGTAACGGCGAGCGAACC GGGATTTGCCCAGCATGGGAATCGAGCTG
CTGTGCGGCTCGAATT

Δείγμα 36



Εικόνα 50: Εικόνα δείγματος 36

CCAGCTGGCCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTAAATCGCTCC
ATAAGACGCCCCGATGCTACGAGCGTTCTTATCTAGGATGCGGAGTGTGGC
CCGTCATGCGATCATGTGTGGCAGGCTGAAGAGCGGGATGATTTTCTCTT
GGCAATGATCGATTAATGGGTGGGATGAAAGCCGTAGTTGTTCTCTTCAT
CATCAGGTTGTTATGAGAAAGCCGTGCATTTCCCATCTAACCCAATTCAAT
TGTCTTCTGACAAATTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGGTGACCCGC
TGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACAAGGATTCC
CCTAGTAACGGCGAGCGAACC GGATTTGCCCAGCATGGGAATCGAGCTG
CTGTGCGGCTCGAATT

Δείγμα 37



Εικόνα 51: Εικόνα δείγματος 37

CCAGCTGGCCGAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTGAATCGCTCC
ACAAGACCTTCGAAATTATGCGGCGGTCTTTTTTCGGATGCGGAGAATGG
CCCGTCGTGCGCTGATGTGCGGCGGGCTGAAGAGCGGGATGATTTTCTCT
TAGCACTGATCGATTAATTGGTGGGATGGAAGCCCCAACTGATCCTCTTC
ATCGTCATGTTGCATTGAGAACGCTGTGCATTTCCAGCTTAACCCAACTC

AATATTCAATAGAAGAAAATTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGATG
ACCCGCTGAATTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACGA
GGATTCCCCTAGTAACGGCGAGCGAACC GGGATCTGCCCAGCTTGGAAT
CGGGCTGCTCTGCGGCCCGAATT

Δείγμα 38



Εικόνα 52: Εικόνα δείγματος 38

CCAGCTGGCCGAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTGAATCGCTCC
ACAAGACCTTCGAAATTATGCGGCGGTCTTTTTTTGGATGCGGAGAATGG
CCCGTCGTGCGCTGATGTGCGGCGGGCTGAAGAGCGGGATGATTTTCTCT
TAGCACTGATCGATTAATTGGTGGGATGGAAGCCCCAGCTGATCCTCTTC
ATCGTCATGTTGCATTGAGAACGCTGTGCATTTCCCAGCTTAACCCAACTC
AATATTCAATAGAAGAAAATTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGATG
ACCCGCTGAATTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACGA
GGATTCCCCTAGTAACGGCGAGCGAACC GGGATCTGCCCAGCTTGGAAT
CGGGCTGCTCTGCGGCCCGAATTGT

Δείγμα 39



Εικόνα 53: Εικόνα δείγματος 39

CCAGCTGGCCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAAGCATTGTGTCGCTCC
 ATAGGACCTTCGCTGGTATGCGGTTGTCTATATAGGATGCGGAGAATGG
 CCTGTCATGCGTTGATGTGTGGCTGGCTGAAGAGCGGGATGATACTCTCCT
 GGCAATGGTCGATTAATGGGTGGGATGGAAGCCCCAGTGATTCATCGTCA
 GGTTGCCTTGAGAAGTTTTTGCATTTTCCAGCTAACCCAACACAATTGTCA
 TTACAAGACAATTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGATGACCCGCTGA
 GTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACGAGGATTCCCCT
 AGTAACGGCGAGCGAACCGGGATTTGCCAGCTTGGGAATCGGGTTGCTT
 TTGCGGCTCGAATTG

9.6 Αποτελέσματα αντιστοίχισης των αλληλουχιών στο Εθνικό Κέντρο Βιοτεχνολογικής Πληροφόρησης των ΗΠΑ (NCBI)

Μέσω του NCBI οι αλληλουχίες αντιστοιχίστηκαν με είδη με τα οποία εμφάνιζαν γενετικές ομοιότητες.

Δείγμα 1

Περιγραφή 1	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Neottia ovata</i>	601	4e-167	90,85%	MT78488.1
<i>Epipactis helleborine</i>	586	1e-162	90,74%	KX167315.1
<i>Limodorum abortivum</i>	582	2e-161	100,00%	KY512513.1

Πίνακας 5: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 1 στο NCBI

Δείγμα 2

Περιγραφή 2	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Neottia ovata</i>	579	2e-160	90,43%	MT784088.1
<i>Epipactis helleborine</i>	562	2e-155	90,30%	KX167315.1
<i>Limodorum</i>	558	3e-154	99,67%	KY512513.1

<i>abortivum</i>				
------------------	--	--	--	--

Πίνακας 6: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 2 στο NCBI

Δείγμα 3

Περιγραφή 3	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Anacamptis pyramidalis</i>	584	4e-162	92,16%	MT784105.1
Orchidaceae sp. SI4	501	4e-137	88,47%	MW422857.1
<i>Dactylorhiza incarnata</i>	446	2e-120	86,29%	KF454227.1

Πίνακας 7: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 3 στο NCBI

Δείγμα 4

Περιγραφή 4	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Orchis purpurea</i>	684	0,0	96,18%	MT784087.1
<i>Orchis mascula</i>	678	0,0	95,93%	KX167725.1
<i>Gymnadenia conopsea</i>	647	0,0	94,54%	MN221404.1

Πίνακας 8: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 4 στο NCBI

Δείγμα 5

Περιγραφή 5	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Orchis purpurea</i>	686	0,0	96,19%	MT784087.1
<i>Orchis mascula</i>	678	0,0	95,93%	KX167725.1
<i>Gymnadenia conopsea</i>	649	0,0	94,55%	MN221404.1

Πίνακας 9: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 5 στο NCBI

Δείγμα 6

Περιγραφή 6	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Serapias feldwegiana</i>	568	4e-157	100,00%	KY512489.1
<i>Serapias orientalis</i>	558	2e-154	100,00%	KY512512.1
<i>Serapias parviflora</i>	555	3e-153	100,00%	KY512509.1

Πίνακας 10: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 6 στο NCBI

Δείγμα 7

Περιγραφή 7	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession
-------------	-----------	----------	-------------	-----------

				Number
<i>Serapias feldwegiana</i>	568	4e-157	100,00%	KY512489.1
<i>Serapias orientalis</i>	558	2e-154	100,00%	KY512512.1
<i>Serapias parviflora</i>	555	3e-153	100,00%	KY512509.1

Πίνακας 11: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 7 στο NCBI

Δείγμα 8

Περιγραφή 8	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Serapias feldwegiana</i>	568	4e-157	100,00%	KY512489.1
<i>Serapias orientalis</i>	558	2e-154	100,00%	KY512512.1
<i>Serapias parviflora</i>	555	3e-153	100,00%	KY512509.1

Πίνακας 12: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 8 στο NCBI

Δείγμα 9

Περιγραφή 9	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Serapias feldwegiana</i>	568	4e-157	100,00%	KY512489.1
<i>Serapias orientalis</i>	558	2e-154	100,00%	KY512512.1
<i>Serapias parviflora</i>	555	3e-153	100,00%	KY512509.1

Πίνακας 13: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 9 στο NCBI

Δείγμα 10

Περιγραφή 10	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Serapias feldwegiana</i>	568	4e-157	100,00%	KY512489.1
<i>Serapias orientalis</i>	558	2e-154	100,00%	KY512512.1
<i>Serapias parviflora</i>	555	3e-153	100,00%	KY512509.1

Πίνακας 14: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 10 στο NCBI

Δείγμα 11

Περιγραφή 11	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Serapias feldwegiana</i>	568	4e-157	100,00%	KY512489.1

<i>Serapias orientalis</i>	558	2e-154	100,00%	KY512512.1
<i>Serapias parviflora</i>	555	3e-153	100,00%	KY512509.1

Πίνακας 15: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 11 στο NCBI

Δείγμα 12

Περιγραφή 12	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Anacamptis pyramidalis</i>	527	7e-145	89,52%	MT784105.1
Orchidaceae sp. AG-2017	508	2e-139	96,14%	KU931645.1
<i>Anacamptis morio</i> subsp. <i>champagneuxii</i>	414	6e-111	94,14%	AY364879.1

Πίνακας 16: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 12 στο NCBI

Δείγμα 13

Περιγραφή 13	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Anacamptis pyramidalis</i>	621	3e-173	93,56%	MT784105.1
Orchidaceae sp. AG-2017	562	2e-155	99,36%	KU931645.1
<i>Orchis mascula</i>	481	5e-131	87,62%	KX165496.1

Πίνακας 17: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 13 στο NCBI

Δείγμα 14

Περιγραφή 14	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Anacamptis pyramidalis</i>	484	4e-132	87,83%	MT784105.1
Orchidaceae sp. AG-2017	473	9e-129	94,21%	KU931645.1
<i>Anacamptis morio</i> subsp. <i>champagneuxii</i>	409	3e-109	93,75%	AY364879.1

Πίνακας 18: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 14 στο NCBI

Δείγμα 15

Περιγραφή 15	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Ophrys insectifera</i>	719	0,0	97,84%	KX166535.1
<i>Ophrys oestrifera</i> subsp. <i>phrygia</i>	586	1e-162	100,00%	MH050859.1
<i>Ophrys fusca</i>	579	2e-160	97,90%	MN750386.1

subsp. <i>delforgei</i>				
-------------------------	--	--	--	--

Πίνακας 19: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 15 στο NCBI

Δείγμα 16

Περιγραφή 16	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Ophrys insectifera</i>	719	0,0	97,84%	KX166535.1
<i>Ophrys oestrifera</i> subsp. <i>phrygia</i>	586	1e-162	100,00%	MH050859.1
<i>Ophrys fusca</i> subsp. <i>delforgei</i>	579	2e-160	97,90%	MN750386.1

Πίνακας 20: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 16 στο NCBI

Δείγμα 17

Περιγραφή 17	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Ophrys insectifera</i>	719	0,0	97,84%	KX166535.1
<i>Ophrys oestrifera</i> subsp. <i>phrygia</i>	586	1e-162	100,00%	MH050859.1
<i>Ophrys fusca</i> subsp. <i>delforgei</i>	579	2e-160	97,90%	MN750386.1

Πίνακας 21: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 17 στο NCBI

Δείγμα 18

Περιγραφή 18	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Ophrys insectifera</i>	708	0,0	97,36%	KX166535.1
<i>Ophrys oestrifera</i> subsp. <i>phrygia</i>	575	2e-159	99,37%	MH050859.1
<i>Ophrys fusca</i> subsp. <i>delforgei</i>	568	4e-157	97,31%	MN750386.1

Πίνακας 22: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 18 στο NCBI

Δείγμα 19

Περιγραφή 19	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Ophrys insectifera</i>	719	0,0	97,84%	KX166535.1
<i>Ophrys oestrifera</i> subsp. <i>phrygia</i>	586	1e-162	100,00%	MH050859.1
<i>Ophrys fusca</i>	579	2e-160	97,90%	MN750386.1

subsp. <i>delforgei</i>				
-------------------------	--	--	--	--

Πίνακας 23: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 19 στο NCBI

Δείγμα 20

Περιγραφή 20	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Ophrys insectifera</i>	719	0,0	97,84%	KX166535.1
<i>Ophrys oestrifera</i> subsp. <i>phrygia</i>	586	1e-162	100,00%	MH050859.1
<i>Ophrys fusca</i> subsp. <i>delforgei</i>	579	2e-160	97,90%	MN750386.1

Πίνακας 24: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 20 στο NCBI

Δείγμα 21

Περιγραφή 21	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Anacamptis pyramidalis</i>	761	0,0	100,00%	KX167290.1
Orchidaceae sp. SI4	573	8e-159	91,45%	MW422857.1
<i>Anacamptis</i> sp.SI2	508	2e-139	88,94%	MW422855.1

Πίνακας 25: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 21 στο NCBI

Δείγμα 22

Περιγραφή 22	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Anacamptis pyramidalis</i>	763	0,0	100,00%	KX167290.1
Orchidaceae sp. SI4	580	5e-161	91,53%	MW422857.1
<i>Anacamptis</i> sp. SI2	510	7e-140	88,97%	MW422855.1

Πίνακας 26: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 22 στο NCBI

Δείγμα 23

Περιγραφή 23	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Ophrys insectifera</i>	713	0,0	97,60%	KX166535.1
<i>Ophrys oestrifera</i> subsp. <i>phrygia</i>	580	5e-161	99,68%	MH050859.1
<i>Ophrys fusca</i> subsp. <i>delforgei</i>	573	9e-159	97,60%	MN750386.1

Πίνακας 27: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 23 στο NCBI

Δείγμα 24

Περιγραφή 24	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Anacamptis pyramidalis</i>	625	2e-174	93,59%	MT784105.1
Orchidaceae sp. AG-2017	562	2e-155	99,36%	KU931645.1
<i>Orchis mascula</i>	481	5e-131	87,62%	KX165496.1

Πίνακας 28: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 24 στο NCBI

Δείγμα 25

Περιγραφή 25	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Ophrys insectifera</i>	719	0,0	97,84%	KX166535.1
<i>Ophrys oestrifera</i> subsp. <i>phrygia</i>	586	1e-162	100,00%	MH050859.1
<i>Ophrys fusca</i> subsp. <i>delforgei</i>	579	2e-160	97,90%	MN750386.1

Πίνακας 29: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 25 στο NCBI

Δείγμα 26

Περιγραφή 26	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Ophrys insectifera</i>	713	0,0	97,60%	KX166535.1
<i>Ophrys oestrifera</i> subsp. <i>Phrygia</i>	580	5e-161	99,68%	MH050859.1
<i>Ophrys fusca</i> subsp. <i>delforgei</i>	573	9e-159	97,60%	MN750386.1

Πίνακας 30: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 26 στο NCBI

Δείγμα 27

Περιγραφή 27	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Ophrys insectifera</i>	719	0,0	97,84%	KX166535.1
<i>Ophrys oestrifera</i> subsp. <i>phrygia</i>	586	1e-162	100,00%	MH050859.1
<i>Ophrys fusca</i> subsp. <i>delforgei</i>	579	2e-160	97,90%	MN750386.1

Πίνακας 31: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 27 στο NCBI

Δείγμα 28

Περιγραφή 28	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Ophrys insectifera</i>	719	0,0	97,84%	KX166535.1
<i>Ophrys oestrifera</i> subsp. <i>phrygia</i>	586	1e-162	100,00%	MH050859.1
<i>Ophrys fusca</i> subsp. <i>delforgei</i>	579	2e-160	97,90%	MN750386.1

Πίνακας 32: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 28 στο NCBI

Δείγμα 29

Περιγραφή 29	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Himantoglossum affine</i>	568	4e-157	99,05%	KU931659.1
<i>Gymnadenia conopsea</i>	521	3e-143	88,92%	MN221404.1
<i>Himantoglossum hircinum</i>	518	4e-142	98,96%	KY512504.1

Πίνακας 33: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 29 στο NCBI

Δείγμα 30

Περιγραφή 30	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Himantoglossum affine</i>	577	7e-160	99,68%	KU931659.1
<i>Gymnadenia conopsea</i>	523	9e-144	89,13%	MN221404.1
<i>Himantoglossum jankae</i>	512	2e-140	100,00%	KJ596090.1

Πίνακας 34: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 30 στο NCBI

Δείγμα 31

Περιγραφή 31	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Himantoglossum affine</i>	577	7e-160	99,68%	KU931659.1
<i>Gymnadenia conopsea</i>	523	9e-144	89,13%	MN221404.1
<i>Himantoglossum jankae</i>	512	2e-140	100,00%	KJ596090.1

Πίνακας 35: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 31 στο NCBI

Δείγμα 32

Περιγραφή 32	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Ophrys</i>	719	0,0	97,84%	KX166535.1

<i>insectifera</i>				
<i>Ophrys oesrtifera</i> subsp. <i>phrygia</i>	586	1e-162	100,00%	MH050859.1
<i>Ophrys fusca</i> subsp. <i>delforgei</i>	579	2e-160	97,90%	MN750386.1

Πίνακας 36: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 32 στο NCBI

Δείγμα 33

Περιγραφή 33	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Cephalanthera longifolia</i>	675	0,0	100,00%	AY146447.1
<i>Cephalanthera damasonium</i>	647	0,0	98,63%	AY146446.1
<i>Neottia ovate</i>	553	1e-152	89,52%	MT784088.1

Πίνακας 37: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 33 στο NCBI

Δείγμα 34

Περιγραφή 34	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Orchis purpurea</i>	675	0,0	96,14%	MT784087.1
<i>Orchis mascula</i>	671	0,0	95,89%	MW422859.1
<i>Gymnadenia conopsea</i>	638	3e-178	94,47%	MN221404.1

Πίνακας 38: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 34 στο NCBI

Δείγμα 35

Περιγραφή 35	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Ophrys insectifera</i>	719	0,0	97,84%	KX166535.1
<i>Ophrys oestriifera</i> subsp. <i>phrygia</i>	586	1e-162	100,00%	MH050859.1
<i>Ophrys fusca</i> subsp. <i>delforgei</i>	579	2e-160	97,90%	MN750386.1

Πίνακας 39: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 35 στο NCBI

Δείγμα 36

Περιγραφή 36	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Ophrys insectifera</i>	719	0,0	97,84%	KX166535.1
<i>Ophrys oestriifera</i> subsp. <i>phrygia</i>	586	1e-162	100,00%	MH050859.1

<i>Ophrys fusca</i> subsp. <i>delforgei</i>	579	2e-160	97,90%	MN750386.1
--	-----	--------	--------	------------

Πίνακας 40: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 36 στο NCBI

Δείγμα 37

Περιγραφή 37	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Himantoglossum affine</i>	566	1e-156	99,05%	KU931659.1
<i>Gymnadenia conopsea</i>	518	4e-142	88,89%	MN221404.1
<i>Himantoglossum adriaticum</i>	512	2e-140	100,00%	KJ595991.1

Πίνακας 41: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 37 στο NCBI

Δείγμα 38

Περιγραφή 38	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Himantoglossum affine</i>	577	7e-160	99,68%	KU931659.1
<i>Gymnadenia conopsea</i>	527	7e-145	89,18%	MN221404.1
<i>Himantoglossum jankae</i>	512	4e-142	100,00%	KJ596090.1

Πίνακας 42: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 38 στο NCBI

Δείγμα 39

Περιγραφή 39	Max Score	E- value	Per. Ident.	Accession Number
<i>Anacamptis pyramidalis</i>	763	0,0	100,00%	KX167290.1
Orchidaceae sp. SI4	577	7e-160	91,49%	MW422857.1
<i>Gymnadenia conopsea</i>	497	5e-136	88,24%	MN221404.1

Πίνακας 43: Αντιστοίχιση αλληλουχίας δείγματος 39 στο NCBI

9.7 Αποτελέσματα συνοπτικά

Άγνωστο δείγμα	Μοριακά ταυτοποιημένο δείγμα
1	<i>Limodorum abortivum</i>
2	<i>Limodorum abortivum</i>
3	<i>Anacamptis pyramidalis</i>
4	<i>Orchis purpurea</i>
5	<i>Orchis purpurea</i>
6	<i>Serapias feldwegiana</i>
7	<i>Serapias feldwegiana</i>

8	<i>Serapiasfeldwegiana</i>
9	<i>Serapiasfeldwegiana</i>
10	<i>Serapiasfeldwegiana</i>
11	<i>Serapiasfeldwegiana</i>
12	<i>Anacamptis morio</i> subsp. <i>champagneuxii</i>
13	<i>Anacamptis pyramidalis</i>
14	<i>Anacamptis morio</i> subsp. <i>champagneuxii</i>
15	<i>Ophrys insectifera</i>
16	<i>Ophry sinsectifera</i>
17	<i>Ophry sinsectifera</i>
18	<i>Ophry sinsectifera</i>
19	<i>Ophry sinsectifera</i>
20	<i>Ophrys insectifera</i>
21	<i>Anacamptis pyramidalis</i>
22	<i>Anacamptis</i> sp. SI2
23	<i>Ophrys insectifera</i>
24	<i>Anacamptis pyramidalis</i>
25	<i>Ophrys insectifera</i>
26	<i>Ophrys insectifera</i>
27	<i>Ophrys insectifera</i>
28	<i>Ophrys insectifera</i>
29	<i>Himantoglossum affine</i>
30	<i>Himantoglossum affine</i>
31	<i>Himantoglossum affine</i>
32	<i>Ophrys insectifera</i>
33	<i>Cephalanthera longifolia</i>
34	<i>Orchis purpurea</i>
35	<i>Ophrys insectifera</i>
36	<i>Ophrys insectifera</i>
37	<i>Himantoglossum affine</i>
38	<i>Himantoglossum affine</i>
39	<i>Anacamptis pyramidalis</i>

Πίνακας 44: Αποτελέσματα

10. Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα του παραπάνω πειράματος οδήγησαν σε διάφορα συμπεράσματα. Αρχικά, τα ορχιδοειδή είναι φυτά στα οποία η μέθοδος απομόνωσης DNA με το πρωτόκολλο CTAB εμφανίζει αντιξοότητες. Ο λόγος σχετίζεται με τη φύση των φυτών που καθιστούν την κυτταρική λύση εξαιρετικά δύσκολη. Επίσης, τα απομονωμένα δείγματα DNA που προέκυψαν παρουσίασαν αρκετές προσμίξεις που φαίνονται καθαρά στο πήκτωμα αγαρόζης. Πέρα από το πήκτωμα αγαρόζης, το συμπέρασμα αυτό αποδεικνύεται και από το λόγο απορρόφησης στα 260 nm προς την αντίστοιχη στα 280 nm. Ο λόγος αυτός αποτελεί δείκτη ποιότητας του απομονωμένου DNA. Λόγος κοντά στην τιμή 1,8 σημαίνει καλή ποιότητα DNA. Ο λόγος πολλών

δειγμάτων απέχει σημαντικά από αυτήν την τιμή το οποίο συνεπάγεται σε χαμηλής ποιότητας DNA. Όσον αφορά το DNA barcoding εξελίχθηκε επιτυχώς. Με τη χρήση του εκκινητή ITS2, όλα τα δείγματα ενισχύθηκαν ικανοποιητικά και οι αλληλουχίες που προέκυψαν ήταν πολύ καλές με ελάχιστες ανακρίβειες. Έτσι, ήταν εφικτή και επιτυχής η αναγνώριση του κάθε δείγματος σε επίπεδο είδους όπως φαίνεται αναλυτικά στους παραπάνω πίνακες.

11. Βιβλιογραφία

11.1 Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

A. Chien, D. B. Edgar, J. M. Trela (1976), Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology*, 127 (3): 1550-7

Aboul- Maaty, N. AF., Oraby H. AS. (2019), Extraction of high- quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB- based method. *Bulletin of the National Research Centre*, 43, 25

Alec M. Pridgeon, Phillip J. Cribb, Mark W. Chase, Finn N. Rasmussen (2001), *Genera Orchidacearum: Volume 2: Orchidoideae (Part One)*, (1)

Ansorge, W. J. (2009), Next-generation DNA sequencing techniques. *New biotechnology*. *New biotechnology*, 25(4), 195-203.

Burton E. Tropp (2014), *Principles of Molecular Biology*, (157-159, 182-185)

Carl L. Withner (1959), What is an Orchid? (1-2)

Christine N. Williams (1979), The leaf flavonoids of the orchidaceae. *Phytochemistry*, Volume 18, Issue 5, Pages 803-813

Gharizadeh, B., Ghaderi, M., & Nyrén, P. (2007), Pyrosequencing technology for short DNA sequencing and whole genome sequencing. *生物物理*, 47(2), 129-132.

Hall, N. (2007), Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. *Journal of experimental biology*, 210(9), 1518-1525

Hanne N. Rasmussen, Finn N. Rasmussen (2007), Trophic relationships in orchid mycorrhiza – diversity and implications for conservation. *LANKESTERIANA* 7(1-2): 334-341

Hanne N. Rasmussen, Finn N. Rasmussen (2014), Seedling mycorrhiza: a discussion of origin and evolution in Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, Volume 175, Issue 3, July 2014, Pages 313–327

Heikrujam J., Kishor R., Behari Mazumder P. (2020), The Chemistry Behind Plant DNA Isolation Protocols. *Biochemical Analysis Tools, Methods for Bio- Molecules Studies*, Chapter 8, Pages 131-139

Hosomi S. T., Custodio C.C., Seaton P.T., Marks T.R., Machado- Neto N. B. (2012), Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds following storage. *In vitro Cellular & Developmental Biology- Plant*, Volume 48, Pages 127-136

Hye Min Kim, Sang – Hun Oh, Gauri Shankar Bhandari, Chan – Soo Kim, Chong – Wook Park (2013), DNA barcoding of Orchidaceae in Korea. *Molecular Ecology Resources*, Volume 14, Issue 3, Pages 499-507

J.J. Doyle and J.L. Doyle (1987), A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.

K. W. Dixon, S. P. Kelly, R. L. Barrett, P. J. Cribb (2003), Orchid conservation: a global perspective. *Orchid Conservation*, Chapter 1, Pages 1-24

Konigsberg W. (1972), Reduction of disulfide bonds in proteins with dithiothreitol. *Methods in enzymology*, Volume 25, Academic Press, Pages 185-188

Mark W. Chase, Kenneth M. Cameron, John V. Freundstein, Alec M. Pridgeon, Gerardo Salazar, Cassio van den Berg, Andre Schuiteman (2015), An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, Volume 177, Issue 2, Pages 151-174

Randall K. Saiki, David H. Gelfand, Susanne Stoffel, Stephen J. Scharf, Russel Higuchi, Glenn T. Horn, Kary B. Mullis, Henry A. Erlich (1988), Primer- Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, Volume 239, Issue 4839, Pages 487-491

Roberts, Gordon CK. et al. (1969), The mechanism of action of ribonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 62.4: Pages 1151-1158

Ronaghi, M. (2001), Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome research*, 11(1), 3-11

S. Rohimah, T. Ratnasari, M. Su'udi (2021), DNA barcoding of *Thrixspermum longipilosum* based on Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) region. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 743 012092

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350-1354

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977), DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences. Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467

Shangguo Feng, Yan Jiang, Shang Wang, Mengying Jiang, Zhe Chen, Qicai Ying, Huizhong Wang (2015), Molecular Identification of *Dendrobium* Species (*Orchidaceae*) Based on the DNA Barcode ITS2 Region and Its Application for Phylogenetic Study. *Int. J. Mol. Sci.* 16(9), 21975-21988

Shendure, J., & Ji, H. (2008), Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology*. *Nature biotechnology*, 26(10), 1135-1145

Spyros Tsiftsis, Zuzana Stipkova, Pavel Kindlmann (2018), Role of way of life, latitude, elevation and climate on the richness and distribution of orchid species. *Biodiversity and Conservation* 28, 75-96

Tan C. S., Yiap B. C. (2009), DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. Volume 2009, Article ID 574398

Thomas J. Givish, Daniel Spalink, Mercedes Ames, Stephanie P. Lyon, Steven J. Hunter, Alejandro Zuluaga, William J. D. Iles, Mark A. Clements, Mary T. K. Arroyo, James Leebens-Mack, Lorena Endara, Ricardo Kriebel, Kurt M. Neubig, W. Mark Whitten, Norris H. Williams, Kenneth M. Cameron (2015), Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. *Proc. R. Soc. B* 282: 20151553

Van Der Cingel N.A. (2001), An Atlas of Orchid Pollination: European Orchids

William Louis Stern (2014), Anatomy of the Monocotyledons Volume X: Orchidaceae

Xiwen Li, Yang Yang, Robert J. Henry, Maurizio Rossetto, Yitao Wang, Shilin Chen (2014), Plant DNA barcoding: from gene to genome. Biological Reviews, Volume 90, Issue 1, Pages 157-166

11.2 Βιβλιογραφία Ιστοσελίδων

<http://www.ibol.org/phase1/about-us/what-is-dna-barcoding/> (CBOL, DNA barcoding)

<https://zymoresearch.eu/blogs/blog/ctab-protocol-for-isolating-dna-from-plant-tissues> (Zymoresearch, CTAB Protocol)

<https://i91002.wixsite.com/orchids-pelion> (Κέντρο Έρευνας & Προστασίας της αυτοφυούς Ορχιδέας στο Βόρειο Πήλιο)

11.3 Βιβλιογραφία Εικόνων

Bhatia, S., & Dahiya, R. (2015). Concepts and techniques of plant tissue culture science. Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences, 121-156

Gauthier, M. G. (2007). Simulation of polymer translocation through small channels.

Papanastassopoulou, M. (1997). Polymerase chain reaction (PCR). Description of the method and its application in the detection of viruses. Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society, 48(2), 61-69.

Van Der Cingel N.A. (2001), An Atlas of Orchid Pollination: European Orchids

