

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Γεωπονικών Επιστημών
Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού Περιβάλλοντος
Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας



« Μοριακή Ταυτοποίηση αυτοφύων φυτών του Πήλιου »

Ονοματεπώνυμο Φοιτήτριας (Α.Μ.)

Χρυσανθοπούλου Χριστίνα (02401)

Επιβλέπων Καθηγητής

Μαδέσης Παναγιώτης

Επίκουρος Καθηγητής Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας

Βόλος , 2023

« Μοριακή Ταυτοποίηση αυτοφυών φυτών του Πήλιου »

« Molecular identification of wild plants 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

Υπεύθυνη Δήλωση

«Πιστοποιώ ότι είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής διατριβής που εκπονήθηκε σύμφωνα με τον Κανονισμό Εκπόνησης Πτυχιακής Εργασίας του Τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος»

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος στη Σχολή Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και ειδικότερα στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας κατά τα έτη 2022-2023. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Μαδέση Παναγιώτη, Επίκουρο Καθηγητή Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας που με δέχτηκε στο εργαστήριο, αλλά και για την ανάθεση του θέματος. Θα ήθελα να του εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για τη πολύτιμη καθοδήγηση, την εύρυθμη συνεργασία, όπως και την προθυμία που διέθετε ως προς την επεξήγηση αποριών που προέκυπταν κατά τη πραγματοποίηση του πειράματος. Φυσικά, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την κ. Τσίντζου Γεωργία, Χημικό και Υποψήφια Διδάκτορα του Τμήματος για τις συμβουλές, την απεριόριστη βοήθεια που μου προσέφερε και για το ευχάριστο κλίμα που πάντα φρόντιζε να υπάρχει στο Εργαστήριο. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της Επιτροπής κ. Λεβίζου Ευθυμία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φυσιολογίας Φυτών και τον κ. Σφουγγάρη Αθανάσιο, Καθηγητή Διαχείρισης Οικοτόπων και Βιοποικιλότητας. Η διατριβή αυτή αφιερώνεται στους γονείς μου για την στήριξη και την εμπιστοσύνη όλων αυτών των χρόνων, στους οποίους θα ήθελα να εκφράσω και ένα μεγάλο ευχαριστώ. Η διεκπεραίωση της εργασίας αυτής δεν θα ήταν εφικτή χωρίς την απαραίτητη υποστήριξη των δικών μου ανθρώπων και της Άριας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια η προστασία της Βιοποικιλότητας, έχει αποκτήσει ιδιαίτερη σημασία και παγκόσμια διάσταση ιδιαίτερα ενόψει των κλιματικών αλλαγών που ήδη συντελούνται. Η διατήρηση της βιοποικιλότητας είναι συνυφασμένη με την βιωσιμότητα και την ευημερία, καθώς βελτιστοποιείται η αειφορική διαχείριση των πόρων μέσω του σεβασμού του περιβάλλοντος και της διατήρησης της. Σε παγκόσμια κλίμακα καταβάλλονται προσπάθειες χαρτογράφησης της βιοποικιλότητας. Οι τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας χαρακτηρίζονται από ευρύ φάσμα εφαρμογών και διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο ενισχύοντας το έργο αυτό. Ειδικότερα, μεγάλη αξία παρουσιάζει η ανάπτυξη του γραμμωτού κώδικα DNA και η αξιοποίηση ορισμένων τμημάτων του γονιδιώματος που ενδείκνυται για τον σκοπό αυτό όπως οι περιοχές trnL και ITS2 που χρησιμοποιήθηκαν για την διεκπεραίωση του συγκεκριμένου πειράματος. Απώτερος σκοπός της τρέχουσας πτυχιακής διατριβής, είναι η μοριακή ταυτοποίηση αυτοφυών φυτών που συλλέχθηκαν από περιοχή του Άγιου Ονούφριου στο Πήλιο, στα πλαίσια αξιολόγησης και γνωστοποίησης της Βιοποικιλότητας στη τοποθεσία αυτή. Έτσι, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία 18 διαφορετικών φυτικών δειγμάτων των οποίων το DNA απομονώθηκε και μέσω κατάλληλων διαδικασιών επιτεύχθηκε η αλληλούχισή του και εντέλει η αναγνώριση των φυτών σε μοριακό επίπεδο.

Λέξεις κλειδιά : Βιοποικιλότητα, CTAB απομόνωση, trnL, ITS2 και DNA Barcoding

ABSTRACT

Over the course of the past years, protecting biodiversity has grown to be of worldwide and great importance due to climate changes already taking place. The retention of biodiversity is intertwined with sustainability and well-being, as sustainable resource management is optimized through respect for the environment and its conservation. On a global scale, effort is being made to map biodiversity. Molecular biology techniques are characterized by a wide spectrum of applications, and they play a crucial role in reinforcing this effort. More specifically, the development of the DNA barcode and the utilization of certain parts of the genome indicated for this purpose such as the trnL and ITS2 regions used to process this experiment are of great value. The aim of this thesis is molecular identification of native plants collected from the area of Agios Onoufrios in Pelion, in the context of evaluating and communicating the biodiversity at this location. Thus, sampling of 18 different plants was

conducted, the DNA of whose was isolated and, ultimately, through appropriate procedures the sequencing and the identification of these plants at a molecular level was made possible.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ:	1
1.2. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ.....	1
1.2.1. DNA ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΕ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ CTAB:.....	1
1.2.2. ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ:.....	6
1.2.3. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ:	7
1.2.4. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗ:.....	9
1.2.5. ΓΡΑΜΜΩΤΟΣ ΚΩΔΙΚΑΣ ΤΟΥ DNA:	10
1.2.5.1. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΜΕΝΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΗΣ 2:.....	11
1.2.5.2. ΕΣΩΝΙΟ trnL:	11
1.2.6. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ SANGER:.....	12
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ:	13
2.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ - ΌΡΓΑΝΑ - ΥΛΙΚΑ	13
2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	16
2.2.1. ΤΟΠΟΘΕΣΙΑ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΦΥΤΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ:	16
2.2.1.1. ΤΡΟΠΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ:.....	17
2.2.2. ΜΕΘΟΔΟΣ CTAB:	17
2.2.3. ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ:.....	19
2.2.4. ΑΡΑΙΩΣΗ:.....	20
2.2.5. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ:.....	21
2.2.5.1. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΜΕ trnL:.....	22
2.2.5.2. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΜΕ ITS2:.....	23
2.2.6. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗ:.....	25
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:	28
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:.....	56
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	58
5.1. ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:	58
5.2. ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:	62
5.3. ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ:.....	62
5.4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΕΙΚΟΝΩΝ:	62

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Περιγραφή του ρόλου που διαδραματίζει το αντιδραστήριο CTAB στην κυτταρική λύση. (Α) Παρατήρηση της υδρόφιλης κεφαλής του απορρυπαντικού και του υδρόφοβου άκρου. (Β) Το υδρόφιλο τμήμα απαντάται εξωτερικά, ενώ το μη πολικό ή υδρόφοβο εσωτερικά. (Γ) Απεικόνιση κυτταρικής μεμβράνης που αποτελείται από αμφιπαθή λιπίδια στα οποία απαντάται ενσωματωμένη πρωτεΐνη. (Δ) Τα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης συλλαμβάνονται από το αντιδραστήριο CTAB (Jadhav K.P. et al., 2015).....	3
Εικόνα 2. Περιγραφή των σταδίων της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (Garibyan L. & Avashia N., 2013).....	8
Εικόνα 3. Απεικόνιση συσκευής Ηλεκτροφόρησης (Τροποποιημένη από Drabik A. et al., 2013).....	10
Εικόνα 4. Παρουσίαση της τεχνικής Sanger σε 7 στάδια. (1) Το dsDNA υφίσταται μετουσίωση και προκύπτουν δυο θραύσματα ssDNA. (2) Ένα θραύσμα ssDNA πολλαπλασιάζεται σε εκατομμύρια αντίγραφα. (3) Ο εκκινητής προσδένεται στο άκρο του ένα κλώνου και αρχίζει η υβριδοποίηση. (4) Τα θραύσματα διαχωρίζονται σε 4 διαλύματα, στα οποία εμπεριέχεται το ένζυμο DNA πολυμεράση και τα τέσσερα δεοξυριβονουκλεοτίδια. Σε κάθε διάλυμα απαντάται συγκέντρωση ενός εκ των τεσσάρων νουκλεοτιδίων τερματισμού. (5) Η επιμήκυνση της αλυσίδας από την πολυμεράση συνεχίζεται μέχρι την τυχαία προσθήκη του νουκλεοτιδίου τερματισμού. (6) Τα προκύπτοντα θραύσματα dsDNA αναδιατάσσονται για να ληφθεί μια σειρά ssDNA διαφόρων μηκών. (7) Τα θραύσματα μέσω της ηλεκτροφόρησης διαχωρίζονται και προκύπτουν οι αλληλουχίες (Τροποποιημένη από Gauthier M. G., 2007).....	13
Εικόνα 5. Παράθεση της τοποθεσία συλλογής δειγμάτων μέσω των χαρτών της Google που προσδιορίζεται από τις συντεταγμένες (39.38699 , 22.97724) και απαντάται στον Άγιο Ονούφριο. Συγκεκριμένα, η περιοχή δειγματοληψίας υποδεικνύεται από το κόκκινο περίγραμμα, πλησίον των καταρρακτών.....	17
Εικόνα 6. Φασματοφωτόμετρο BioPhotometer, το οποίο έχει προσαρμοστεί για τη μέτρηση dsDNA.....	20
Εικόνα 7. Θερμοκυκλοποιητής PCR Fast Gene, του οποίου οι συνθήκες έχουν ρυθμιστεί για την διεξαγωγή PCR με τον εκκινητή ITS2.....	25
Εικόνα 8. Συσκευή Ηλεκτροφόρησης SCIE – PLAS.....	27

Εικόνα 9. Gel Αγαρόζης, το οποίο πρόκειται να τοποθετηθεί στη συσκευή Ηλεκτροφόρησης. Απαντάται μέσα στο καλούπι και διακρίνονται τα πηγαδάκια.	27
Εικόνα 10. Στο πρώτο πηγαδάκι απαντάται ο ladder, ο οποίος έχει σχηματίσει τις χαρακτηριστικές ζώνες. Εν συνεχεία, βρίσκονται διαδοχικά τα δείγματα 1 έως 4.	29
Εικόνα 11. Στην πρώτη θέση έχει τοποθετηθεί το δείγμα 5, ενώ στα υπόλοιπα πηγαδάκια απαντώνται με τη σειρά τα τελευταία 13 δείγματα. Παρατηρείται πως στη 4η θέση, το δείγμα 8 δεν έχει σχηματίσει αντίστοιχες ζώνες. Συνεπώς, δεν έχει απομονωθεί DNA, γεγονός που οδήγησε στον αποκλεισμό του από την PCR.	29
Εικόνα 12. Αποτέλεσμα PCR με το ζεύγος εκκινητών trnL για τα δείγματα 1 - 17. Στη πρώτη θέση απαντάται ο ladder, ενώ μεταξύ αυτού και του πρώτου δείγματος παρεμβάλλεται ένα κενό πηγαδάκι. Το 2 ^ο και 6 ^ο δείγμα θα εξαιρεθούν από την διαδικασία αλληλούχισης και της PCR που ακολουθεί με τον ITS2, καθώς φαίνεται πως δεν έχει πολλαπλασιαστεί το DNA..	31
Εικόνα 13. Αποτέλεσμα PCR με το ζεύγος εκκινητών ITS2 για τα δείγματα 1 - 15. Στη πρώτη θέση έχει τοποθετηθεί ο ladder, ενώ μεταξύ αυτού και του πρώτου δείγματος παρεμβάλλεται ένα κενό πηγαδάκι. Το 1 ^ο δείγμα αποφασίστηκε να μην σταλεί για αλληλούχιση, καθώς η ποσότητα του DNA που πολλαπλασιάστηκε είναι εξαιρετικά μικρή. Αυτό αποδεικνύεται φαίνεται μέσω της Ηλεκτροφόρησης.....	31
Εικόνα 14. Δείγμα 1, <i>Anemone coronaria</i> , Ranunculaceae	33
Εικόνα 15. Δείγμα 2, <i>Bellis perennis</i> , Asteraceae.....	35
Εικόνα 16. Δείγμα 3, <i>Orchis purpurea</i> , Orchidaceae	37
Εικόνα 17. Δείγμα 4, <i>Orchis anthropophora</i> , Orchidaceae	39
Εικόνα 18. Δείγμα 5, <i>Ranunculus bulbosus</i> , Ranunculaceae.....	41
Εικόνα 19. Δείγμα 6, <i>Securigera varia</i> , Fabaceae	43
Εικόνα 20. Δείγμα 7, <i>Phlomis fruticosa</i> , Lamiaceae.....	44
Εικόνα 21. Δείγμα 8, <i>Carex flacca</i> , Cyperaceae.....	46
Εικόνα 22. Δείγμα 11, <i>Geranium robertianum</i> , Geraniaceae.....	51

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<i>Πίνακας 1. Αντιδραστήρια - Όργανα - Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για το πρωτόκολλο απομόνωσης με τη μέθοδο CTAB.</i>	14
<i>Πίνακας 2. Αντιδραστήρια - Όργανα - Υλικά για τη Φασματοφωτομέτρηση.</i>	14
<i>Πίνακας 3. Αντιδραστήρια - Όργανα - Υλικά για τη διαδικασία της Ηλεκτροφόρησης.</i>	15
<i>Πίνακας 4. Αντιδραστήρια - Όργανα - Υλικά που αξιοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης.</i>	15
<i>Πίνακας 5. Ποσότητα που αναλογεί σε κάθε αντιδραστήριο για την PCR με trnL.....</i>	22
<i>Πίνακας 6. Οι συνθήκες που απαιτούνται για την πλήρωση ενός κύκλου PCR με trnL</i>	23
<i>Πίνακας 7. Ποσότητα που αναλογεί σε κάθε αντιδραστήριο για την PCR με ITS2</i>	23
<i>Πίνακας 8. Οι συνθήκες που απαιτούνται για την πλήρωση ενός κύκλου PCR με ITS2</i>	24
<i>Πίνακας 9. Αποτελέσματα Φασματοφωτομέτρησης</i>	28
<i>Πίνακας 10. Αραιώσεις Δειγμάτων.....</i>	30
<i>Πίνακας 11. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 1 στην χλωροπλαστική περιοχή trnL.....</i>	32
<i>Πίνακας 12. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 2 στην χλωροπλαστική περιοχή trnL.....</i>	33
<i>Πίνακας 13. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 2 στο πυρηνικό γονιδίωμα ITS2</i>	34
<i>Πίνακας 14. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 3 στην χλωροπλαστική περιοχή trnL.....</i>	36
<i>Πίνακας 15. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 3 στο πυρηνικό γονιδίωμα ITS2.....</i>	36
<i>Πίνακας 16. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 4 στην χλωροπλαστική περιοχή trnL.....</i>	38
<i>Πίνακας 17. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 4 στο πυρηνικό γονιδίωμα ITS2.....</i>	39
<i>Πίνακας 18. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 5 στην χλωροπλαστική περιοχή trnL.....</i>	40

Πίνακας 19. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 5 στο πυρηνικό γονιδίωμα ITS2.....	41
Πίνακας 20. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 6 στην χλωροπλαστική περιοχή trnL.....	42
Πίνακας 21. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 6 στο πυρηνικό γονιδίωμα ITS2.....	43
Πίνακας 22. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 7 στην χλωροπλαστική περιοχή trnL.....	44
Πίνακας 23. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 8 στην χλωροπλαστική περιοχή trnL.....	45
Πίνακας 24. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 9 στην χλωροπλαστική περιοχή trnL.....	47
Πίνακας 25. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 9 στο πυρηνικό γονιδίωμα ITS2.....	47
Πίνακας 26. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 10 στην χλωροπλαστική περιοχή trnL.....	48
Πίνακας 27. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 10 στο πυρηνικό γονιδίωμα ITS2	49
Πίνακας 28. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 11 στην χλωροπλαστική περιοχή trnL.....	50
Πίνακας 29. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 11 στο πυρηνικό γονιδίωμα ITS2.....	50
Πίνακας 30. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 12 στην χλωροπλαστική περιοχή trnL.....	52
Πίνακας 31. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 13 στην χλωροπλαστική περιοχή trnL.....	52
Πίνακας 32. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 13 στο πυρηνικό γονιδίωμα ITS2.....	53
Πίνακας 33. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 14 στην χλωροπλαστική περιοχή trnL.....	54
Πίνακας 34. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 15 στην χλωροπλαστική περιοχή trnL.....	55
Πίνακας 35. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 15 στο πυρηνικό γονιδίωμα ITS2.....	56

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

1. CTAB: Cetyltrimethylammonium bromide (Βρωμιούχο κετυλο - τριμεθυλο - αμμώνιο)
2. DNA: Deoxyribonucleic acid (Δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ)
3. DNase: Deoxyribonuclease (Δεσοξυριβονουκλεάση)
4. dNTPs: deoxyriboNucleotide Triphosphates (Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια)
5. ITS2: Internal Transcribed Spacer 2 (Εσωτερικός Μεταγραφόμενος Διαχωριστής 2)
6. matK: Megakaryocyte – Associated Tyrosine Kinase
7. NIR: Near Infrared (Πλησίον του Υπέρυθρου)
8. PCR: Polymerase Chain Reaction (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης)
9. rcbL: Ribulose – 1,5 – bisphosphate carboxylase / oxygenase large subunit
10. RNA: Ribonucleic acid (ΡΙβονουκλεϊκό οξύ)
11. RNase: Ribonuclease (ΡΙβονουκλεάση)
12. Tm: Θερμοκρασία που περιέχει 50 % μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας.
13. UV: Ultraviolet (Υπεριώδης ακτινοβολία)
14. Vis: Visible (Ορατός)

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ:

Με μία σύντομη αναδρομή, ο Lovejoy το 1980 ήταν ο πρώτος από τον οποίο ειπώθηκε η έννοια της Βιολογικής Ποικιλότητας, μέσω της οποίας αποδίδονταν ο αριθμός των ειδών (Swingland I. R., 2001). Εντούτοις, με την πάροδο των ετών ο όρος της Βιοποικιλότητας προσεγγίζεται με έναν πιο πολυεπίπεδο τρόπο, καθώς σε αυτόν περιλαμβάνεται η γενετική ποικιλομορφία, η ποικιλότητα των ειδών και των οικοσυστημάτων (Primack R.B. et al., 2012). Δεν επιδέχεται αμφισβήτηση το γεγονός ότι η επιτυχία στην αναπαραγωγή, την ικανότητα να ανθίσταται σε ασθένειες και εντέλει την επιβίωση των οργανισμών - στις οικολογικές συνθήκες που ακατάπαυστα τροποποιούνται - έγκειται στην ύπαρξη γενετικής ποικιλότητας, η οποία απαντάται και ανάμεσα στα άτομα που εντάσσονται στο ίδιο είδος (Laikre L. et al., 2010). Από τα παραπάνω απορρέει το συμπέρασμα πως, για την διαίωνιση των ειδών κρίνεται αναγκαία η παρουσία γονιδιακής ποικιλομορφίας. Οι μεταλλαγές που υφίσταται ένα γονίδιο - με την προϋπόθεση ότι είναι βιώσιμες - έχουν ως άμεση απόρροια την δημιουργία ποικίλων μορφών αυτού. Αυτά, αναφέρονται ως αλληλόμορφα και δυνητικά συνυφαίνονται με την διατήρηση της δυναμικής ενός ατόμου ως προς την αναπαραγωγή και προσαρμοστικότητά του και επομένως στον τρόπο που εκτυλίσσονται οι εξελικτικές διαδικασίες (Primack R.B. et al., 2012 ; Laikre L., 2010). Η επίγνωση της σπουδαιότητας της γενετικής ποικιλομορφίας και η συμβολή της στην Βιοποικιλότητα χρήζει επιτακτική ανάγκη τη προστασία της, η οποία επιτυγχάνεται μέσω του προγράμματος Convention on Biological Diversity ή Σύμβαση για τη Βιοποικιλότητα (Laikre L., 2010). Η προαναφερθείσα συνθήκη τέθηκε σε εφαρμογή τον Δεκέμβριο του 1993 και μέσω αυτής επιδιώκεται: α. Η αειφόρα αξιοποίηση των θεμελιωδών στοιχείων της Βιοποικιλότητας, β. Η διανομή με δίκαιο και ισάξιο τρόπο των προνομίων που παρουσιάζονται από την χρησιμοποίηση των γενετικών πόρων και σαφώς γ. Η προστασία της Βιολογικής Ποικιλότητας (CBD).

1.2. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

1.2.1. DNA ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΜΕ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ CTAB:

Η εξαγωγή του DNA από τα φυτικά - αλλά και όχι μόνο - κύτταρα υπήρξε αναμφίβολα ένα σπουδαίο μοριακό επίτευγμα που εξασφαλίζει την πραγματοποίηση περαιτέρω τεχνικών μοριακής φύσεως, όπως η Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης και η Γενετική Ταυτοποίηση. Οι μέθοδοι με τις οποίες επιτυγχάνεται ποικίλουν, ωστόσο επιθυμητή απόρροια κάθε πρωτόκολλου, κρίνεται η απομόνωση άφθονης ποσότητας γενετικού υλικού, το οποίο παράλληλα θα χαρακτηρίζεται από υψηλή ποιότητα (Jobes D.V., 1995). Το 1869, ο Friedrich

Miescher αποτέλεσε αφετηρία για την ανάπτυξη αυτής τη τεχνικής, αφού ήταν ο πρώτος που κατάφερε να απομονώσει DNA (Gupta N., 2019).

Θα πρέπει να καταστεί σαφές πως το DNA που προορίζεται για μοριακές αναλύσεις, πρέπει να είναι απαλλαγμένο από πολυσακχαρίτες και άλλους δευτερογενείς μεταβολίτες. Η παρουσία των παραπάνω σε δείγματα γενετικού υλικού, δυσχεραίνει την λειτουργία σημαντικών μοριακών παραγόντων όπως οι πολυμεράσες, οι ενδονουκλεάσες και οι λιγάσες (Fang G. et al., 1992). Μάλιστα, αναφέρεται χαρακτηριστικά πως, η ενεργότητα της Taq Πολυμεράσης περιορίζεται από την παρουσία πολυσακχαριτών (Sahu S. K. et al., 2012). Είναι, λοιπόν, ξεκάθαρο πως η απομόνωση υψηλής ποιότητας DNA συνδέεται με την απομάκρυνση όλων των παραπάνω στοιχείων, κάτι το οποίο επιτυγχάνεται με την εφαρμογή διαφόρων μεθόδων απομόνωσης του γενετικού υλικού.

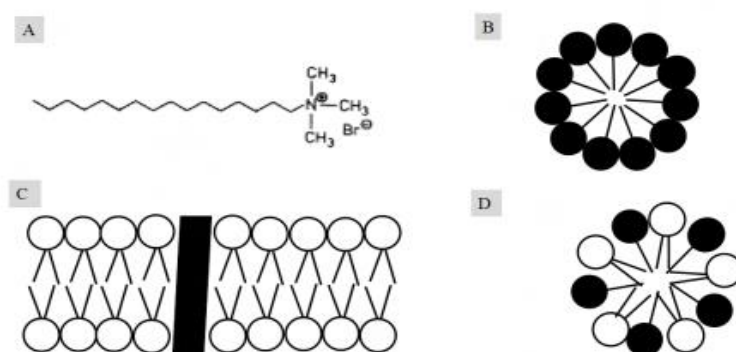
Για την εκπόνηση του πειραματικού μέρους της τρέχουσας πτυχιακής διατριβής εφαρμόστηκε απομόνωση του γενωμικού DNA μέσω του τροποποιημένου πρωτόκολλου CTAB (Doyle and Doyle, 1991). Αναφέρεται πως, η παραπάνω μέθοδος επιδέχεται μεταβολές, οι οποίες οφείλονται στη διαφορετική σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος του κάθε φυτικού κυττάρων ανά μεταξύ των ειδών, αλλά και λόγω των διαφοροποιήσεων μεταξύ των οργανιδίων που απαντώνται εντός του ενδοκυττάριου χώρου (Abdel – Latif A. & Osman G., 2017).

Μία θεμελιώδης διαφορά ενός φυτικού από ένα ζωικό κύτταρο είναι ότι περικλείεται από το κυτταρικό τοίχωμα (Διαμαντίδης Γ., 2017). Στο κυτταρικό τοίχωμα οφείλεται η εδραίωση - ή αλλιώς η σταθερότητα και ακαμψία - του κυττάρου, ενώ ταυτόχρονα είναι υπεύθυνο για την άμυνά του, την ανάπτυξη του φυτού και μέσω αυτού επέρχεται η επικοινωνία με τα γειτονικά κύτταρα. Έτσι, εξασφαλίζεται η ανταλλαγή ουσιών (Cosgrove D., 2005). Δεν πρέπει να παραληφθεί πως είναι επενδυμένο με τον πολύτιμο πολυσακχαρίτη που καλείται κυτταρίνη. Χαρακτηρίζεται από ισχυρή δομή, καθότι οι ίνες της συγκρατούνται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου, δυσχεραίνοντας την λύση του κυτταρικού τοιχώματος. Σαφώς, ανασταλτικός παράγοντας κρίνεται και η κυτταρική - ή πλασματική - μεμβράνη, η οποία περικλείεται του κυτταρικού τοιχώματος και δομείται από στρώσεις λιπιδίων και πρωτεΐνες (Jadhav et al., 2015).

Απαραίτητη λοιπόν προϋπόθεση αποτελεί, να έχει προηγηθεί η λύση του κυτταρικού τοιχώματος, εντός του οποίου απαντάται προστατευμένο το γενετικό υλικό. Αυτό εξασφαλίζεται μέσω της λειοτρίβισης στην οποία υποβάλλεται ο φυτικός ιστός. Για την

ακρίβεια, η διαδικασία αυτή πρέπει να γίνεται γρήγορα συνήθως με τη χρήση νιτρικού αζώτου αποβλέποντας στη αποφυγή του κατακερματισμού του γενετικού υλικού (Jinlu Li et al., 2013).

Η πρόσμειξη της ουσίας CTAB με τον κονιορτοποιημένο φυτικό ιστό, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον διαχωρισμό των μορίων του DNA από πολυσακχαρίτες, ενώ ταυτόχρονα ενθαρρύνεται η αποδιάταξη του κυτταρικού τοιχώματος και των πρωτεϊνών. Αρχικά θα πρέπει να ειπωθεί, πως ορίζεται ως ένα κατιονικό απορρυπαντικό, το οποίο απαρτίζεται από μία υδρόφιλη κεφαλή και το υδρόφοβο τμήμα, δηλαδή μία αλυσίδα υδρογονανθράκων (Heikrujam J. et al., 2020). Στην πραγματικότητα, πρόκειται για έναν χαοτροπικό παράγοντα, καθώς τρέπει το κύτταρο στην “αταξία”. Αναλυτικότερα, σε υδατικές συνθήκες, τα λιπίδια από τα οποία απαρτίζεται η πλασματική μεμβράνη, συλλαμβάνονται από το αντιδραστήριο CTAB με απόρροια τον σχηματισμό ενός συσσωματώματος. Η έκβαση είναι η απελευθέρωση του πυρήνα (Vinod K., 2004).



Εικόνα 1. Περιγραφή του ρόλου που διαδραματίζει το αντιδραστήριο CTAB στην κυτταρική λύση. (Α) Παρατήρηση της υδρόφιλης κεφαλής του απορρυπαντικού και του υδρόφοβου άκρου. (Β) Το υδρόφιλο τμήμα απαντάται εξωτερικά, ενώ το μη πολικό ή υδρόφοβο εσωτερικά. (Γ) Απεικόνιση κυτταρικής μεμβράνης που αποτελείται από αμφιπαθή λιπίδια στα οποία απαντάται ενσωματωμένη πρωτεΐνη. (Δ) Τα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης συλλαμβάνονται από το αντιδραστήριο CTAB (Jadhav K.P. et al., 2015).

Ο χαρακτηρισμός του χαοτροπικού αντιδραστηρίου θα μπορούσε να αποδοθεί και στην ουσία β-μερκαπτοαιθανόλη, η οποία προστίθεται στο διάλυμα μετά την CTAB. Αποτελεί ένα ιδιαίτερα πτητικό προϊόν με δυσάρεστη οσμή, ενώ είναι και τοξικό (Mommaerts K. et al., 2015). Σε σχετική βιβλιογραφία, έχει αναφερθεί πως υψηλές συγκεντρώσεις της β-μερκαπτοαιθανόλης είναι άρρηκτα συνυφασμένη με την απομόνωση DNA υψηλού δυναμικού. Αυτό, αποδίδεται στην αποτελεσματικότερη απομάκρυνση των πολυφαινολών που έχει σαν αποτέλεσμα την παραλαβή καθαρότερου προϊόντος γενετικού υλικού απαλλαγμένο από

προσμείξεις (Aboul-Maaty N.AF. & Oraby H.AS., 2019). Η β- μερκαπτοαιθανόλη απορρυθμίζει τη λειτουργικότητα των πρωτεϊνών, εξαιτίας της επίδρασης που παρουσιάζει στη δομή τους και ειδικότερα τη τριτοταγή και τεταρτοταγή. Επιφέρει την μείωση των δισουλφιδικών δεσμών και κατά συνέπεια τη μετουσίωση των πρωτεϊνών (Konisberg W., 1972). Από όλα τα παραπάνω, γίνεται αντιληπτό πως η παρουσία του συγκεκριμένου αντιδραστήριου έχει σημαντική συμβολή στον καθαρισμό του DNA.

Απαραίτητα αντιδραστήρια για την εκπόνηση του συγκεκριμένου πρωτόκολλου απομόνωσης DNA κρίνονται και οι ριβονουκλεάσες. Για την ακρίβεια, η ριβονουκλεάση A που χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή γενετικού υλικού, εξασφαλίζει τον διαχωρισμό του DNA από το RNA. Αυτό, επιτυγχάνεται μέσω της υδρόλυσης που υφίσταται ο 3',5' - φωσφοδιεστερικός δεσμός μεταξύ των νουκλεοτιδίων RNA. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το παραπάνω ένζυμο και πραγματοποιείται σε δύο διαδοχικά στάδια. Καταρχάς, μέσω ενός χημικού μηχανισμού που καλείται διαφωσφορυλίωση, προκύπτει ένα ολιγονουκλεοτίδιο το άκρο του οποίου αποτελείται από μία 2',3' κυκλική φωσφορική πυριμιδίνη. Κατόπιν, το παραπάνω φωσφορικό άλας υδρολύεται και με την επίδραση του ενζύμου ριβονουκλεάση A πυροδοτείται ο σχηματισμός του τελικού 3' φωσφορικού (Roberts G.C. et al., 1969). Συμπερασματικά ο κατακερματισμός του RNA - που οφείλεται στη δράση του παραπάνω ενζύμου - λειτουργεί βοηθητικά καθώς αποφεύγεται η παραλαβή γενετικού υλικού με ανεπιθύμητες ουσίες που ενδεχομένως υποβαθμίζουν τη ποιότητά του.

Επόμενη ένωση που απαντάται στο πρωτόκολλο CTAB είναι το χλωροφόρμιο. Το τριχλωρομεθάνιο - όπως αλλιώς αποκαλείται - είναι ένα αντιδραστήριο οργανικής φύσεως με μοριακή ταυτότητα CHCl_3 . Πρόκειται για έναν διαλύτη που στερείται του χρώματος, ενώ διακρίνεται από πτητικότητα, η οποία μάλιστα συνοδεύεται από έντονη οσμή (Watts, P., 2004). Με την αξιοποίησή του στην μέθοδο απομόνωσης DNA εξασφαλίζεται η δημιουργία δύο φάσεων. Το παραπάνω φαινόμενο αποδίδεται στην πυκνότητά του, η οποία είναι μεγαλύτερη από το νερό και ανέρχεται στα $1,47 \text{ g x cm}^{-3}$. Αυτό, λοιπόν, πυροδοτεί τον ταχύ σχηματισμό των δύο φάσεων, εκ των οποίων η μία ονομάζεται οργανική και η δεύτερη υδατική. Το χλωροφόρμιο όντας ένας υδρόφοβος - ή μη πολικός - διαλύτης, επιτυγχάνει τη διάλυση επίσης μη πολικών λιπιδίων και πρωτεϊνών. Έτσι, τα κυτταρικά προϊόντα και τα λιπίδια που απομένουν οδηγούνται στην οργανική φάση, με απόρροια το DNA να προφυλάσσεται στην υδατική (Heikrujam J. et al., 2020).

Επιπλέον, για την διεκπεραίωση της τρέχουσας μεθόδου παραλαβής γενωμικού DNA, αξιοποιήθηκαν οι αλκοόλες ισοπροπανόλη και αιθανόλη. Πρέπει να διευκρινιστεί βέβαια πως η εφαρμογή των δύο αυτών ουσιών πραγματοποιείται σε διαφορετικά στάδια.

Όσον αφορά την ισοπροπανόλη, πρόκειται για μία αλκοόλη διάφανου χρωματισμού. Η γεύση της περιγράφεται πικρή και η οσμή της φρουτώδης. Απαντάται σε πληθώρα εμπορικών και οικιακών σκευασμάτων όπως απολυμαντικά, καθαριστικά, ακόμη και σε φάρμακα ή προϊόντα της κοσμετολογίας (R. J. Slaughter et al., 2014). Επιπρόσθετα, η αιθανόλη ορίζεται ως ένας αρκετά συνηθισμένος οργανικός διαλύτης. Παρουσιάζει και αυτή παρόμοιες εφαρμογές σε αναρίθμητα καθημερινά προϊόντα (Eicher, T. J. 2009).

Η χρήση της ισοπροπανόλης στο πρωτόκολλο αποβλέπει στην κατακρήμνιση του DNA παρά το γεγονός ότι σε σχετική βιβλιογραφία αναφέρεται πως το DNA σε διαλύματα στα οποία περιλαμβάνεται η ισοπροπανόλη δυσχεραίνεται η διάλυση του. Το γεγονός αυτό, λειτουργεί επιβοηθητικά σε περιπτώσεις που το γενετικό υλικό βρίσκεται σε ελάχιστες συγκεντρώσεις. Ταυτόχρονα, απαιτείται μικρή ποσότητα της συγκεκριμένης αλκοόλης και ενδείκνυται για σχετικά μεγάλους όγκους διαλυμάτων (Green MR & Sambrook J., 2017). Η προσθήκη της αλκοόλης εξασφαλίζει την δημιουργία ιζήματος. Ειδικότερα, το DNA καθιζάνει - με την πραγματοποίηση φυγοκέντρωσης - με απόρροια τον διαχωρισμό του από το υπόλοιπο διάλυμα και κατ' επέκταση από άλατα και λοιπές ενώσεις. Επιπλέον, μη πολικοί διαλύτες όπως το χλωροφόρμιο - του οποίου η εφαρμογή συναντάται στο προηγούμενο στάδιο - είναι διαλυτοί στην ισοπροπανόλη. Συμπερασματικά, υπολείμματα που έχουν προκληθεί σε προγενέστερο χρόνο και μεταφέρονται, δύναται να απομακρυνθούν. Αυτό, συνδράμει στην παραλαβή καθαρού γενετικού υλικού (Heikrujam J. et al., 2020).

Συνδυαστικά με την ισοπροπανόλη προστίθεται και οξικό νάτριο. Το pH του οξικού νατρίου ανέρχεται στο 5,2 και η εφαρμογή του συμβάλλει στην καθίζηση του DNA. Η παρουσία του αντιδραστηρίου στο διάλυμα έχει σημαντικό ρόλο στην εξουδετέρωση των φορτίων που διαμορφώνονται από τα φωσφορικά σάκχαρα στην ραχοκοκαλιά του νουκλεϊκού οξέος. Το άλας, λοιπόν, όταν βρίσκεται σε υδατικό περιβάλλον δίστανται σε Na^+ και $[\text{CH}_3\text{COOH}]^-$, με αποτέλεσμα οι αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες του DNA να εξουδετερώνονται από τα κατιόντα του νατρίου. Συνεπώς, το μόριο DNA καθίσταται δυσδιάλυτο στο νερό, καθώς έχει αποκτήσει υδρόφοβη συμπεριφορά. Πρέπει να ειπωθεί ότι, η ηλεκτροστατική έλξη μεταξύ των φωσφορικών ιόντων και εκείνων του νατρίου συνδέεται άρρηκτα με την διηλεκτρική σταθερά του διαλύματος, σύμφωνα με τον Coulomb. Τα ιόντα Na^+ και PO_3^- απωθούνται λόγω

της υψηλής διηλεκτρικής σταθεράς του νερού. Αυτό ενισχύει τη συνάθροιση και δημιουργία ενός κράματος. Ωστόσο, η ισοπροπανόλη καθιστά δυνατή την αλληλεπίδραση των παραπάνω εξαιτίας της χαμηλής διηλεκτρικής σταθεράς. Επομένως, το φορτίο προφυλάσσεται και το λιγότερο υδρόφιλο DNA καθιζάνει (Jadhav et al., 2015).

Το παραπάνω, λοιπόν, βήμα διαδέχεται η συμπλήρωση με αιθανόλη 70%. Στο DNA που έχει καθιζάνει - λόγω της προσθήκης ισοπροπανόλης και των φυγοκεντρήσεων - μεταφέρεται η αιθανόλη. Η διαδικασία αυτή καλείται πλύση, καθώς τα εναπομείναντα άλατα απομακρύνονται μέσω της φυγοκέντρωσης και απόρριψης του υπερκείμενου αιθανόλης (Tan S. C., & Yip B. C., 2009). Το DNA πλέον απαντάται με τη μορφή ιζήματος και αφού έχει αφαιρεθεί η αιθανόλη, τοποθετείται σε υψηλές θερμοκρασίες αποσκοπώντας στην πλήρη εξάτμιση της αλκοόλης. Αυτό απαιτεί προσεκτικό χειρισμό, καθώς η ξήρανση του DNA λειτουργεί ανασταλτικά στην μετέπειτα διάλυσή του στο ρυθμιστικό διάλυμα TE (Heikrujam J. et al., 2020).

Τέλος, επιβάλλεται η χρήση ενός αντιδραστηρίου μέσω του οποίου θα διασφαλίζεται η μακρόχρονη αποθήκευσή του DNA. Αυτό, επιτυγχάνεται με την προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος TE. Θα πρέπει να σημειωθεί πως, σε αυτό εμπεριέχονται Tris και EDTA. Το Tris ορίζεται ως ένα (υδροξυμεθυλο) αμινομεθάνιο και πρόκειται για ένα ρυθμιστικό διάλυμα οργανικής φύσεως (Bleich HL & Schwartz WB, 1966). Το EDTA αποτελεί μία χηλική ένωση, η οποία έχει την ικανότητα να σχηματίζει δεσμούς με δισθενή κατιόντα - όπως το Mg^{2+} - τα οποία κρίνονται απαραίτητα για την λειτουργικότητα των ενζύμων όπως οι RNases και οι DNases. Με αυτόν τον τρόπο, προφυλάσσεται το DNA από αυτά (Heikrujam J. et al., 2020). Το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα, αποτρέπει την υποβάθμιση του DNA και ταυτόχρονα συμβάλλει στη διατήρηση του pH. Ο παράγοντας Tris λειτουργεί προστατευτικά για τους κλώνους του DNA, εμποδίζοντας τον εκφυλισμό τους που ενδεχομένως προκληθεί από την ακτινοβολία. Η έκθεσή του σε ακτινοβολία προκαλεί την δημιουργία ελεύθερων ριζών, οι οποίες μπορεί να επιφέρουν την αποδιάταξή του. Έτσι, οι ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου δεσμεύονται από το Tris σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (Jadhav et al., 2015).

1.2.2. ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ:

Η Φασματοφωτομετρική ανάλυση είναι μια εξαιρετικά χρήσιμη διαδικασία, μέσω της οποίας πραγματοποιείται ο καθορισμός της συγκέντρωσης σημαντικών βιομορίων - όπως οι πρωτεΐνες, το DNA και το RNA - που εμπεριέχονται σε ένα διάλυμα (Trumbo T.A. et al., 2013). Η μέθοδος αυτή, στηρίζεται στο γεγονός ότι η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία απορροφάται ή ανακλάται από τις χημικές ενώσεις σε συγκεκριμένο μήκος κύματος. Η

Φασματοφωτομέτρηση υπεισέρχεται σε πολλές επιστήμες όπως η Βιοχημεία, η Φυσική και η Μηχανική των υλικών. Σαφώς, δεν πρόκειται για την μοναδική μέθοδο ελέγχου της ποσότητας επιθυμητών χημικών μορίων, καθώς η Ηλεκτροφόρηση, η PCR, αλλά και η Χρωματογραφία δύναται να αξιοποιηθούν εξίσου για τον σκοπό αυτό. Ωστόσο, αποτελεί μια οικονομικά προσοδοφόρα τεχνική που παρέχει αποτελέσματα σε σύντομο χρονικό διάστημα και ταυτόχρονα δεν χαρακτηρίζεται από πολυπλοκότητα (Varma A. et al., 2007).

Στην παρούσα διατριβή, κατόπιν της απομόνωσής του DNA από τους φυτικούς ιστούς, συνέβαλε στην εξακρίβωση της ποσότητας του και κατ' επέκταση στην εκτίμηση της ποιότητάς του.

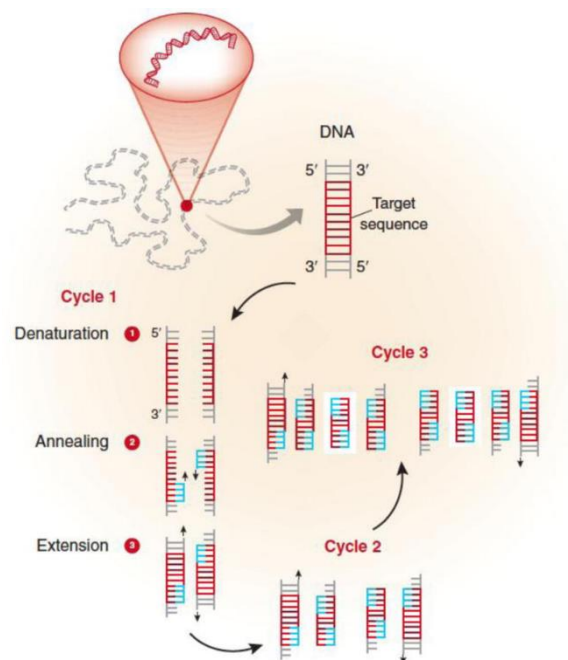
Το όργανο στο οποίο διενεργούνται αυτές οι μετρήσεις ονομάζεται φασματοφωτόμετρο και με βάση το μήκος κύματος του φωτός που μετρά η κάθε πηγή, το καθένα από αυτά υφίσταται ανάλογη κατηγοριοποίηση. Για την φασματοφωτομέτρηση του δεσοξυριβονουκλεϊκού οξέος, χρησιμοποιούνται τα φασματοφωτόμετρα UV που καλύπτουν την περιοχή από 190 έως 390 nm, αφού το DNA παρουσιάζει απορρόφηση στα 260 nm. Να σημειωθεί πως, στην αναλογία 260/280 η τιμή για ένα απαλλαγμένο από προσμίξεις DNA προσεγγίζει το 1.8 (Clark W. et al., 2000). Ασφαλώς, διατίθενται στο εμπόριο Vis και NIR φασματοφωτόμετρα με εύρος από 380 έως 750 nm και από 800 μέχρι 2.500 nm, αντιστοίχως (González-Morales D. et al., 2020).

1.2.3. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ:

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης - ή αλλιώς PCR - αποτελεί μία εξαιρετικά πολύτιμη μοριακή τεχνική με πολλά πεδία εφαρμογής. Διατυπώθηκε σε θεωρητικό επίπεδο το 1971 από τον Kjell Kleppe και τους συνεργάτες του, αλλά πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1985 από τον Kary Mullis και έκτοτε έχει ενσωματωθεί σε πολλές επιστήμες όπως η Ιατρική, η Γενετική και Εγκληματολογία ως ένα ωφέλιμο εργαλείο (Kadri K., 2020 ; Kaunitz, J.D., 2015). Η αρχή της PCR εδράζεται στον in vitro πολλαπλασιασμό επιθυμητών αλληλουχιών DNA. Σε περίπτωση λοιπόν που το επιδιωκόμενο τμήμα DNA απαντάται εντός του εκχυλίσματος - με την διεξαγωγή της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης - παράγονται πολλαπλά αντίγραφα του (Gupta N., 2019). Επομένως, η αξιοποίηση της PCR παρέχει την δυνατότητα προώθησης επιθυμητών θραυσμάτων DNA, τα οποία δύναται να ληφθούν από μία εξαιρετικά μικρή ποσότητα εκχυλίσματος γενετικού υλικού καθιστώντας την μία εξαιρετική μέθοδο καθαρισμού (Kadri K., 2020).

Η PCR πραγματοποιείται με τη χρήση ενός μηχανήματος που καλείται θερμοκυκλοποιητής μέσω του οποίου εκτελείται η τρέχουσα τεχνική. Η ολοκλήρωσης ενός κύκλου PCR

περιλαμβάνει τα εξής βήματα: α. Αποδιάταξη του dsDNA σε θερμοκρασίες 92 – 95° C, β. Προσαρμογή των εκκινητών στους 50 - 75° C, γ. Τελική επιμήκυνση του dsDNA στους 72° C (Mackay IM. et al., 2002). Με το πέρας του κάθε κύκλου η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται. Η διεκπεραίωσή της προϋποθέτει την αξιοποίηση ορισμένων χημικών παραγόντων. Για την ακρίβεια, απαιτείται η χρήση ρυθμιστικού διαλύματος - του οποίου το pH κυμαίνεται από 8.3 έως 8.8 - του χλωριούχου μαγνησίου (MgCl₂), δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), του DNA που πρόκειται να κλωνοποιηθεί και φυσικά των εκκινητών PCR (Gupta N., 2019). Στους εκκινητές οφείλεται η έναρξη της αντιγραφής - προωθώντας την επιμήκυνση του DNA - στόχου. Απαρτίζονται από μικρό αριθμό νουκλεοτιδίων - συνήθως από 10 έως 30 - και διαθέτουν μία μόνο αλυσίδα DNA. Αναγνωρίζονται συγκεκριμένες αλληλουχίες από τον κάθε εκκινητή, με βάσει των κανόνα της συμπληρωματικότητας και έτσι ο κάθε κλώνος αντιγράφεται επιλεκτικά από τον αντίστοιχο primer. Ωστόσο, από τους πιο σημαντικούς ρόλους διαδραματίζει η προσθήκη του ενζύμου Taq DNA πολυμεράσης που απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermus aquaticus*, το οποίο είναι αρκετά θερμοανθεκτικό δεδομένου ότι απαντάται σε θερμές πηγές. Ακολούθως, η Taq πολυμεράση παρουσιάζει αντοχή σε θερμοκρασίες πλησίον των 100° C , χωρίς να μετουσιώνεται. Η αποπεράτωση της PCR είναι απόρροια της εισαγωγής της παραπάνω DNA πολυμεράσης (Lorenz TC., 2012 ; Kadri K., 2020).



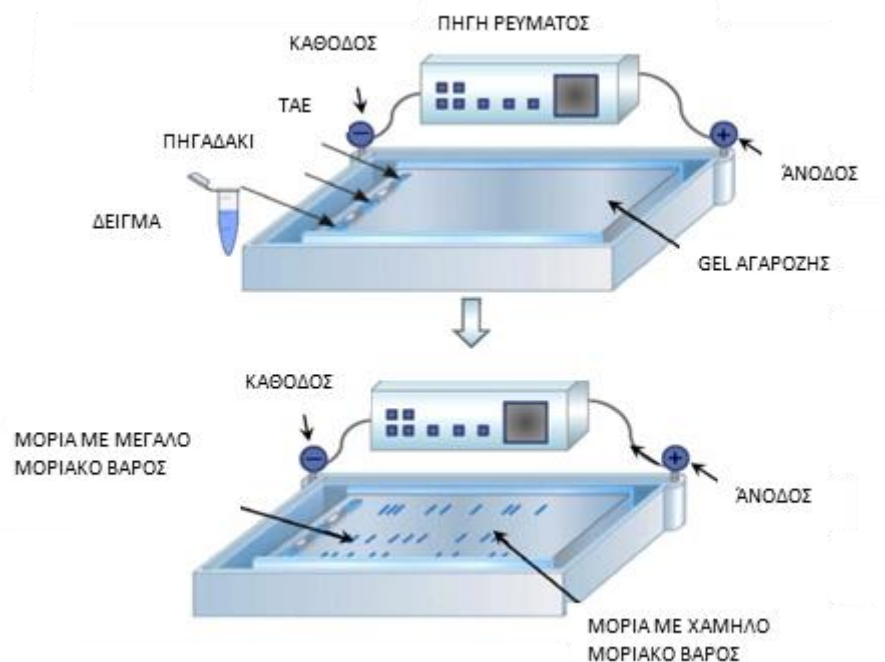
Εικόνα 2. Περιγραφή των σταδίων της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (Garibyan L. & Avashia N., 2013)

1.2.4. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗ:

Ηλεκτροφόρηση καλείται η μοριακή μέθοδος με την οποία επιτυγχάνεται η ανοδική ή καθοδική μετακίνηση ηλεκτρικά φορτισμένων μορίων υπό την επήρεια ηλεκτρικού πεδίου. Το 1937, ο Tiselius γνωστοποίησε ότι τα φορτισμένα σωματίδια δύναται να διαχωριστούν με την εφαρμογή ηλεκτρικού δυναμικού. Κάποια βιομόρια - όπως το νουκλεϊκό οξύ και οι πρωτεΐνες - συγκαταλέγονται στα σωματίδια με ηλεκτρικό φορτίο, τα οποία με την άσκηση ηλεκτρικών δυνάμεων παρουσιάζουν ανοδική ή καθοδική πορεία. Η τροχιά που θα διαγράψουν, αποτελεί έκβαση του καθαρού φορτίου τους. Είναι γεγονός πως μόρια που εμφανίζουν παρεμφερείς ιδιότητες - όπως μέγεθος, σχήμα και φορτίο - ακολουθούν κοινή διαδρομή, ώσπου να επέλθει ευδιάκριτα ο διαχωρισμός τους σε ζώνες (Sonagra AD. & Dholariya SJ., 2022).

Η αгарόζη αποτελεί έναν ετεροπολυσακχαρίτη, ο οποίος εξάγεται από φύκη που κατατάσσονται στα γένη *Gelidium* και *Gracilaria* (Lee P.Y., 2012). Η χρήση της αποβλέπει στον διαχωρισμό νουκλεϊκών οξέων, αιμοσφαιρίνης ή ακόμη και προϊόντων της PCR (Sonagra AD. & Dholariya SJ., 2022). Ουσιαστικά, με την Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης πιστοποιείται η παρουσία θραυσμάτων DNA - εντός των δειγμάτων - των οποίων το μοριακό βάρος ανέρχεται από 0,5 έως 25 kb και ταυτόχρονα παρέχεται η δυνατότητα αξιολόγησης της ποιότητάς τους (Voymas D., 2000). Η επιτυχία της μεθόδου έγκειται στο γεγονός ότι το DNA είναι ένα αρνητικά φορτισμένο μόριο. Επομένως, μέσω του πηκτώματος αгарόζης σε συνδυασμό με την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου έλκεται από το θετικά φορτισμένο πόλο προς τον οποίο και θα κινηθεί (Koontz L., 2013).

Η διεκπεραίωση της προαναφερθείσας διαδικασίας πραγματοποιείται σε τρία στάδια. Αρχικά, απαιτείται η προσθήκη της αгарόζης σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο θερμαίνεται προσεγγιστικά στους 50° C ώστε να επέλθει η διάλυσή της σε αυτό και ύστερα τοποθετείται σε ένα καλούπι όπου αφήνεται να πήξει (Koontz L., 2013). Η ποσότητα της αгарόζης που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του παχύρρευστου διαλύματος βρίσκεται σε αναλογία με εκείνη των δειγμάτων. Κατόπιν, τα δείγματα φορτώνονται στα πηγαδάκια που έχουν σχηματιστεί στην γέλη αгарόζης με την αφαίρεση του καλουπιού και η συσκευή τροφοδοτείται με ηλεκτρικό ρεύμα. Ολοκληρώνοντας, το DNA με την προϋπόθεση να απαντάται εντός των δειγμάτων, κινείται προς τον θετικά φορτισμένο πόλο και με αυτόν τον τρόπο διαμορφώνονται χαρακτηριστικές ζώνες. Η παρατήρηση αυτών καθίσταται εφικτή με την αξιοποίηση UV ακτινοβολίας (Voymas D., 2000).



Εικόνα 3. Απεικόνιση συσκευής Ηλεκτροφόρησης (Τροποποιημένη από Drabik A. et al., 2013).

1.2.5. ΓΡΑΜΜΩΤΟΣ ΚΩΔΙΚΑΣ ΤΟΥ DNA:

Η μέθοδος του γραμμωτού κώδικα του DNA ή αλλιώς DNA Barcoding εμφανίζεται το 2003, όπου προτάθηκε από τους ερευνητές του Πανεπιστημίου Guelph - που εδράζεται στον Καναδά - μια καινοτόμος τεχνική αναγνώρισης των ειδών. DNA Barcoding ορίζεται μια μέθοδος ταυτοποίησης ειδών. Η μέθοδος χρησιμοποιεί συγκεκριμένα τμήματα του DNA. Η πραγματοποίηση της παραπάνω διαδικασίας προϋποθέτει την εξαγωγή γενετικού υλικού από τον φυτικό ιστό και την επιλογή συγκεκριμένων εκκινητών που προτείνονται από τον Διεθνή οργανισμό για το Barcoding όλων των έμβιων όντων, οι οποίοι μέσω της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης θα δημιουργήσουν αντίγραφα επιθυμητών αλληλουχιών. Αναφέρεται πως για τα φυτά που εντάσσονται στο χερσαίο οικοσύστημα, τα γονίδια *rbcl* και *matK* αποτελούν δείκτες, καθώς οι περιοχές - στόχοι για τον γραμμωτό κώδικα του DNA είναι μέρος αυτών (CBOL Plant Working Group 1 et al., 2009). Τα γονίδια αυτά συναντώνται στον χλωροπλάστη (de Vere N. et al., 2015). Συμπερασματικά, οι εκκινητές που θα χρησιμοποιηθούν θα πρέπει να ενδείκνυνται για την ενίσχυση τμημάτων του χλωροπλαστικού DNA. Αντίθετα με το ζωικό βασίλειο, στο οποίο το γονιδιακό τμήμα που χρησιμοποιείται για την επίτευξη αυτής της τεχνικής, βρίσκεται στα μιτοχόνδρια και καλείται CO1. Ωστόσο, στους φυτικούς οργανισμούς η περιοχή αυτή εκφυλίζεται σταδιακά παρέχοντας επισφαλή αποτελέσματα (Li X. et al., 2014).

Σε παγκόσμια κλίμακα καταβάλλονται προσπάθειες καταγραφής του γονιδιώματος όλων των έμβιων οργανισμών, συνδράμοντας στην προστασία και διαιώνιση της βιοποικιλότητας του πλανήτη με τον βέλτιστο τρόπο (de Vere N. et al., 2015). Η Γενετική Ταυτοποίηση πέρα από το ερευνητικό πλαίσιο, θεωρείται αρωγός στην διευθέτηση ζητημάτων αναφορικά με τη βιοποικιλότητα. Αναμφισβήτητα, στόχοι αποτελούν ο σεβασμός και διατήρησή της, μέσω της αποτελεσματικότερης προσέγγισης ορισμένων πρακτικών εφαρμογών όπως η ορθολογική διαχείριση των πόρων, η παραγωγή προϊόντων με ασφάλεια και οι έγκυρες επεμβάσεις που σχετίζονται με τον έλεγχο εχθρών και ασθενειών (CBOL).

1.2.5.1. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΟΜΕΝΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΗΣ 2:

Το γονίδιο ITS2 πρόκειται για τμήμα του πυρηνικού γονιδιώματος (rDNA) και ενδείκνυται η αξιοποίησή του για την πραγματοποίηση του γραμμωτού κώδικα DNA (Zhao L.L., et al 2018). Αυτό αποδίδεται στο γεγονός ότι, η περιοχή αυτή συνίσταται για τον σχεδιασμό πολλών εκκινητών που χρησιμοποιούνται καθολικά για την εξακρίβωση πολλών φυτικών ειδών – μεταξύ αυτών εντάσσονται και πολλά φαρμακευτικά φυτά – αλλά και την ταυτοποίηση του ζωικού βασιλείου (Chen S. et al., 2010). Τα γνωρίσματά της αξιολογούνται ιδιαίτερα επιβοηθητικά και σε αυτά περιλαμβάνονται η σύντομη αλληλουχία με λιγοστά ζεύγη βάσεων, η ποικιλομορφία που παρουσιάζει ανάμεσα στα είδη, αλλά και η αξιοσημείωτη αποδοτικότητα της. Ταυτόχρονα, απαιτείται μόνο ένα ζεύγος εκκινητών για την προώθησή του (Yu N. et al., 2017). Έτσι, ο εσωτερικός μεταγραφόμενος διαχωριστής 2 αποτελεί περίπου τρεις δεκαετίες ένα πολύτιμο εργαλείο για τον γραμμωτό κώδικα του DNA φυτικών ειδών (Merget B., 2012). Εξίσου για τον σκοπό αυτό έχουν προταθεί και άλλες γονιδιακές περιοχές οι οποίες ενδεικτικά είναι οι *rcbL*, *matK*, *trnL – F*, *trnH – psbA* και συνδυασμοί αυτών. Ωστόσο, οι παραπάνω τροποποιούνται αναφορικά με τον ITS2, στο γεγονός ότι οι περιοχές του γονιδιώματός τους απαντώνται στους χλωροπλάστες (Omelchenko D.O. et al., 2022). Ακόμη, ο ITS2 είναι ενδεδειγμένος για την διερεύνηση ποικιλιών που πιθανώς χαρακτηρίζονται από νοθεία (Yu N. et al., 2017).

1.2.5.2. ΕΣΩΝΙΟ *trnL*:

Το εσώνιο *trnL* απαντάται στο χλωροπλαστικό DNA και αποτελεί μία από τις περιοχές που έχουν μελετηθεί εκτενώς για την αξιοποίησή της στον γραμμωτό κώδικα του DNA φυτών. Ειδικότερα, η περιοχή αυτή χρησιμοποιείται ευρέως για την ταυτοποίηση φυτικών ειδών, αλλά και την αναγνώριση ειδών που παρουσιάζουν στενή συγγένεια μεταξύ τους. Ωστόσο, παρά τη σχετικά χαμηλή ανάλυση που παρέχει, το εσώνιο *trnL* εμφανίζει ορισμένα πλεονεκτήματα. Συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι η δευτερεύουσα δομή του χαρακτηρίζεται από εναλλαγές

μεταξύ συντηρημένων και τμημάτων που έχουν μεταβληθεί. Αυτό σημαίνει ότι το συγκεκριμένο τμήμα DNA ενδείκνυται για τη δημιουργία καθολικών εκκινήτων και αποδίδεται στο γεγονός ότι είναι μοναδικό για την Ομάδα I του χλωροπλαστικού DNA (Taberlet P. et al., 2006).

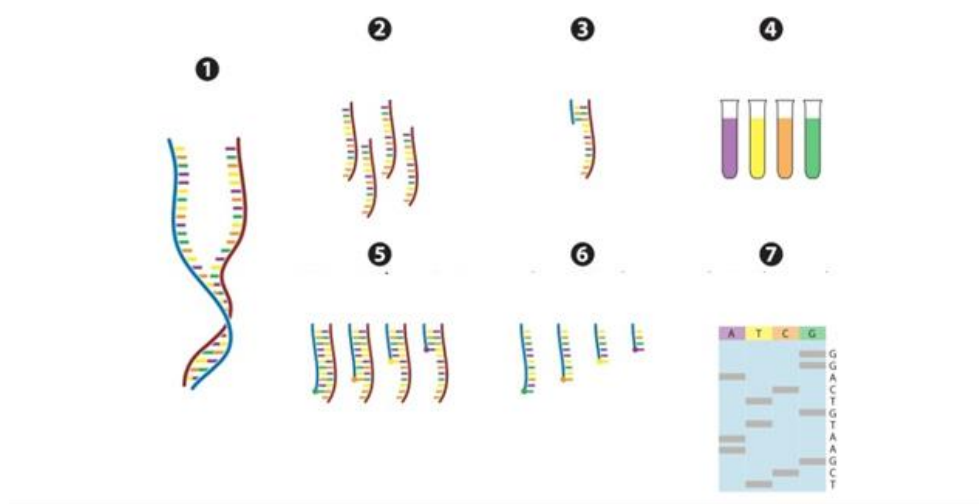
1.2.6. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ SANGER:

Η Μέθοδος Τερματισμού της Αλυσίδας Διδεοξυνουκλεοτιδίων - επονομαζόμενη και ως Αλληλούχηση Sanger - διατυπώθηκε το 1977 από τον Frederick Sanger και τους συνεργάτες του, οι οποίοι ανέπτυξαν μια πρωτοποριακή τεχνική προσδιορισμού μιας DNA αλληλουχίας (Gauthier M. G., 2007). Η τεχνική Sanger βασίζεται στην αξιοποίηση διδεοξυνουκλεοτιδίων, των οποίων η λειτουργία αποβλέπει στον τερματισμό της αλυσίδας της DNA πολυμεράσης (Sanger F. et al, 1977).

Η παραπάνω τεχνική περατώνεται σε 7 στάδια. Πρώτα, το dsDNA με την επίδραση υψηλών θερμοκρασιών υφίσταται μετουσίωση, με απόρροια να προκύπτουν δυο θραύσματα ssDNA. Το θραύσμα του οποίου πρόκειται να καθοριστεί η αλληλουχία, πολλαπλασιάζεται σε αναρίθμητα αντίγραφα. Για τον σκοπό αυτό, το άκρο του ένα κλώνου υβριδοποιείται από τον εκκινητή. Εν συνεχεία τα θραύσματα διαχωρίζονται σε 4 διαλύματα, στα οποία εμπεριέχεται το ένζυμο DNA πολυμεράση και τα τέσσερα δεοξυριβονουκλεοτίδια. Ωστόσο, σε κάθε διάλυμα απαντάται συγκέντρωση ενός εκ των τεσσάρων νουκλεοτιδίων τερματισμού. Η επιμήκυνση της αλυσίδας από την πολυμεράση συνεχίζεται μέχρι την τυχαία προσθήκη του νουκλεοτιδίου τερματισμού, ενώ ο εκκινητής ή τα νουκλεοτίδια επισημαίνονται είτε με ραδιενεργό ή με φθορίζον. Αυτό, οδηγεί στην ανίχνευσή τους. Ακολουθεί αναδιάταξη των θραυσμάτων dsDNA που έχουν σχηματιστεί με σκοπό να προκύψει μια σειρά ssDNA χωρίς συγκεκριμένα μήκη, αλλά με κοινό σημείο εκκίνησης. Ολοκληρώνοντας, τα θραύσματα μέσω της ηλεκτροφόρησης διαχωρίζονται και προκύπτουν οι αλληλουχίες (Gauthier M. G., 2007).

Η μεθοδολογία Sanger - μέσω των συνεχών βελτιώσεων που έχει δεχθεί - ενδείκνυται για την ανάγνωση αλληλουχιών των οποίων το μήκος ανέρχεται στα 1000 bp με ποσοστό ακριβείας που προσεγγίζει την τάξη 99,9 % (Shendure & Ji, 2008). Ωστόσο, παρά την αυτοματοποίησή της, η Sanger χαρακτηρίζεται από κάποιους περιορισμούς (Gharizadeh B. et al., 2007). Συγκεκριμένα, για αλληλουχίες με μεγαλύτερο μήκος βάσεων απαιτείται η χρήση gel ή πολυμερών προκειμένου να επέλθει ο διαχωρισμός των θραυσμάτων DNA που έχουν διαμορφωθεί. Ταυτόχρονα, η ανάλυση πολλών δειγμάτων δεν καθίσταται εφικτή και τα θραύσματα DNA χρειάζεται να κλωνοποιηθούν σε βακτήρια για να επιτευχθεί η ενίσχυση των αλληλουχιών (Hall N., 2007). Τέλος, μειονεκτεί στο γεγονός ότι αποτελεί μια τεχνική υψηλού

κόστους κατά την οποία η προετοιμασία των δειγμάτων δεν εμφανίζει εξ ολοκλήρου αυτοματοποίηση (Ansorge, W. J. 2009).



Εικόνα 4. Παρουσίαση της τεχνικής Sanger σε 7 στάδια. (1) Το dsDNA υφίσταται μετουσίωση και προκύπτουν δυο θραύσματα ssDNA. (2) Ένα θραύσμα ssDNA πολλαπλασιάζεται σε εκατομμύρια αντίγραφα. (3) Ο εκκινητής προσδένεται στο άκρο του ένα κλώνου και αρχίζει η υβριδοποίηση. (4) Τα θραύσματα διαχωρίζονται σε 4 διαλύματα, στα οποία εμπεριέχεται το ένζυμο DNA πολυμεράση και τα τέσσερα δεοξυριβονουκλεοτίδια. Σε κάθε διάλυμα απαντάται συγκέντρωση ενός εκ των τεσσάρων νουκλεοτιδίων τερματισμού. (5) Η επιμήκυνση της αλυσίδας από την πολυμεράση συνεχίζεται μέχρι την τυχαία προσθήκη του νουκλεοτιδίου τερματισμού. (6) Τα προκύπτοντα θραύσματα dsDNA αναδιατάσσονται για να ληφθεί μια σειρά ssDNA διαφόρων μηκών. (7) Τα θραύσματα μέσω της ηλεκτροφόρησης διαχωρίζονται και προκύπτουν οι αλληλουχίες (Τροποποιημένη από Gauthier M. G., 2007).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ:

2.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ - ΌΡΓΑΝΑ - ΥΛΙΚΑ

Για τη συλλογή φυτικού ιστού από τη περιοχή του Πήλιου χρειάστηκαν τα παρακάτω:

Υλικά:

1. Γάντια
2. Χάρτινα σακουλάκια
3. Ψαλίδι

Πίνακας 1. Αντιδραστήρια - Όργανα - Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για το πρωτόκολλο απομόνωσης με τη μέθοδο CTAB.

Αντιδραστήρια	Εταιρία
2x CTAB Buffer	
β- μερκαπτοαιθανόλη (2- mercaptoethanol)	MP Biomedicals LLC
RNase A (50 mg)	Macherey – Nagel GmbH & Co. KG
Χλωροφόρμιο (Chloroform BioChemica)	PanReac Applichem
Ισοπροπανόλη (Isopropanol)	
Οξικό νάτριο (Sodium acetate)	Mallinckrodt
Αιθανόλη (Ethanol absolute for analysis)	Supelco
TE (1x)	
Όργανα	Εταιρία
Φυγόκεντρος Micro Centrifuge Fast Gene	Nippon Genetics Europe
Συσκευή Vortex	Nippon Genetics Europe
Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας	MRC Ltd
Ξηρό θερμαντικό λουτρό	BIOLINE scientific
Υλικά	Εταιρία
Eppendorf tubes	
Γουδί	
Γουδοχέρι	
Σπάτουλα	
Πιπέτες	NICHIRYO

Πίνακας 2. Αντιδραστήρια - Όργανα - Υλικά για τη Φασματοφωτομέτρηση.

Αντιδραστήρια	
Αποστειρωμένο νερό	
Όργανα	Εταιρία

Φασματοφωτόμετρο BioPhotometer	Eppendorf – Netheir – Hinz GmbH
Υλικά	Εταιρία
Απορροφητικό χαρτί	
Κυψελίδες UV	
Πιπέτες	NICHIRYO

***Πίνακας 3.** Αντιδραστήρια - Όργανα - Υλικά για τη διαδικασία της Ηλεκτροφόρησης.*

Αντιδραστήρια	Εταιρία
50 bp DNA Ladder	NEW ENGLAND BioLabs Inc.
MIDORI Green DIRECT	Nippon Genetics Europe
Ρυθμιστικό διάλυμα TAE (1x) (Tris acetate - EDTA)	
Αγαρόζη (Agarose Type I: Low EEO)	SIGMA
Όργανα	Εταιρία
Συσκευή Ηλεκτροφόρησης SCIE - PLAS	
Πηγή ηλεκτρικού ρεύματος PowerPlus 300 V	Fisherbrand
Υλικά	Εταιρία
Κωνική φιάλη	
Ογκομετρικός κύλινδρος	
Καστ ή καλούπι	
Eppendorf tubes	
Πιπέτες	NICHIRYO

***Πίνακας 4.** Αντιδραστήρια - Όργανα - Υλικά που αξιοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης.*

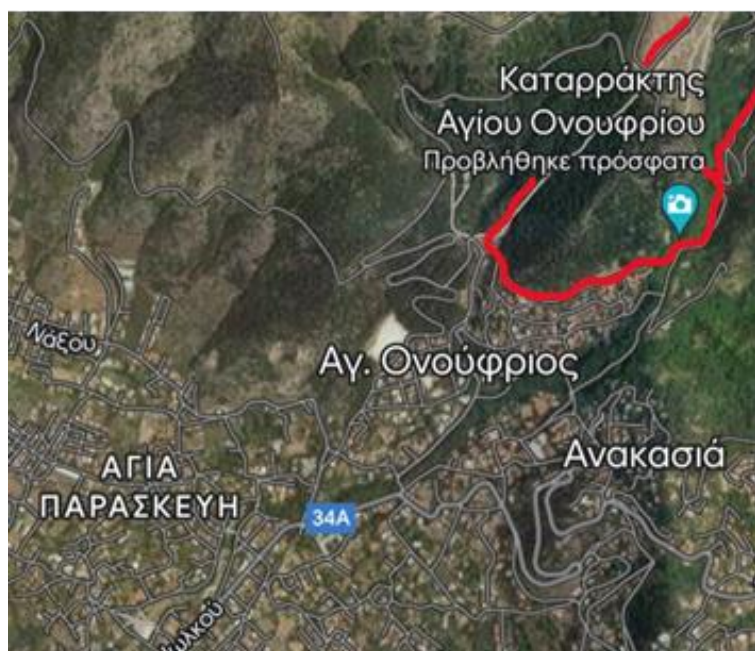
Αντιδραστήρια	Εταιρία
Νερό για έγχυση (Water for injection)	DEMO S.A.
PCR Rnx Buffer	Invitrogen by Thermo Fischer Scientific
50 mM MgCl ₂	Invitrogen by Thermo Fischer Scientific

dNTPs – Μείγμα νουκλεοτιδίων	
Εκκινητής cB49317-trnL114	Biolegio
Εκκινητής cB49317-trnL114	Biolegio
Εκκινητής dA49855-trnL115	Biolegio
Εκκινητής ITS2F1	Biolegio
Εκκινητής ITS2R2	Biolegio
Taq DNA Polymerase	Invitrogen by Thermo Fischer Scientific
Όργανα	Εταιρία
Θερμοκυκλοποιητής PCR Fast Gene	Nippon Genetics Europe
Υλικά	Εταιρία
Eppendorf tubes	
Πάγος	
Πιπέτες	NICHIRYO

2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1. ΤΟΠΟΘΕΣΙΑ ΣΥΛΛΟΓΗΣ ΦΥΤΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ:

Ο τόπος δειγματοληψίας που επιλέχθηκε, είναι το Πήλιο. Η αυτοφυής βλάστηση που συλλέχθηκε, εντοπίστηκε πλησίον του καταρράκτη που απαντάται στην περιοχή του Άγιου Ονούφριου στον Ν. Μαγνησίας και η ακριβής τοποθεσία προσδιορίζεται από τις συντεταγμένες (39.38699 , 22.97724) μέσω των χαρτών της μηχανής αναζήτησης Google. Ο οικισμός του Άγιου Ονούφριου βρίσκεται βορειοανατολικά του Βόλου και περίπου 5 km μακριά από το κέντρο του. Στην τοποθεσία δειγματοληψίας παρατηρήθηκε έντονη ποώδης βλάστηση - μέρος της οποίας ήταν και τα φυτά που συλλέχθηκαν - αλλά και πολλά φυλλοβόλα δέντρα όπως Πλάτανοι, λόγω της παρουσίας του υδατικού στοιχείου.



Εικόνα 5. Παράθεση της τοποθεσία συλλογής δειγμάτων μέσω των χαρτών της Google που προσδιορίζεται από τις συντεταγμένες (39.38699 , 22.97724) και απαντάται στον Άγιο Ονούφριο. Συγκεκριμένα, η περιοχή δειγματοληψίας υποδεικνύεται από το κόκκινο περίγραμμα, πλησίον των καταρρακτών.

2.2.1.1. ΤΡΟΠΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ:

Η συγκέντρωση φυτικού ιστού προηγείται οποιασδήποτε μοριακής τεχνικής. Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε η κοπή - με ψαλίδι - των φύλλων αυτοφυούς βλάστησης που απαντάται στο ενδιαίτημα. Για την προστασία της βιοποικιλότητας του ρέματος δεν αφαιρέθηκαν τα άνθη των φυτών. Τα φύλλα του κάθε φυτού, τοποθετούνταν σε χάρτινο σακουλάκι - κατάλληλο για δειγματοληψίες - και αριθμούνταν. Το ένα δείγμα διαδέχονταν το άλλο, ώσπου συνολικά καταμετρήθηκαν 18 δείγματα. Ας σημειωθεί, ότι τα φυτά από τα οποία παραλαμβάνονταν το υλικό, φωτογραφίζονταν και κατόπιν τα φύλλα οδηγούνταν εντός των δειγματοληπτικών σακουλιών. Να τονιστεί, πως το γεγονός αυτό συνδράμει σημαντικά στην βοτανική τους αναγνώριση, προτού φυσικά επέλθει η γενετική ταυτοποίηση. Εντέλει, αυτά συντηρήθηκαν στους -20°C , μέχρις ότου να εκπονηθεί το πρωτόκολλο απομόνωσης DNA που αποτελεί την έναρξη του πειραματικού μέρους της τρέχουσας πτυχιακής διατριβής.

2.2.2. ΜΕΘΟΔΟΣ CTAB:

Το πρωτόκολλο απομόνωσης DNA με τη μέθοδο CTAB περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Αρχικά, ζυγίζονται 100 mg φυτικού ιστού - σε ηλεκτρικό ζυγό ακριβείας - από κάθε δείγμα, ο οποίος τοποθετείται σε γουδί. Με έναν γουδοχέρι πραγματοποιείται ταχύρρυθμη λειοτρίβηση και κατόπιν ο ιστός οδηγείται στο αντίστοιχο μικροσωληνάριο (eppendorf tube) των 2 mL.

Όλα τα μικροσωληνάρια αριθμούνται κάθε φορά αντίστοιχα με τον αριθμό του δείγματος.

2. Εν συνεχεία, προστίθεται σε κάθε μικροσωληνάριο 800 μL CTAB, 10 μL β -μερκαπτοαιθανόλη και 2 μL RNase ανά δείγμα και πραγματοποιείται vortex.
3. Κατόπιν, γίνεται τοποθέτηση των δειγμάτων στους 65°C για 30 min.
4. Με το πέρας του παραπάνω χρονικού διαστήματος, τα δείγματα απομακρύνονται από τον θερμαντήρα και προστίθεται στο καθένα 800 μL χλωροφόρμιου. Σε αυτό το σημείο, τα δείγματα οδηγούνται στον επωαστήρα για ανακίνηση διάρκειας 30 min.
5. Ύστερα, οδηγούνται για φυγοκέντρηση για 20 min σε 7.000 rpm.
6. Με την ολοκλήρωση της φυγοκέντρησης παραλαμβάνεται το υπερκείμενο υγρό, η οποία τοποθετείται σε νέα αποστειρωμένα μικροσωληνάρια των 1,5 mL.
7. Τα στάδια 4 έως 6 επαναλαμβάνονται, χωρίς ωστόσο να πραγματοποιηθεί εκ νέου η ανακίνηση στον επωαστήρα.
8. Μετέπειτα, στα νέα μικροσωληνάρια των 1,5 mL, στα οποία εμπεριέχεται η άνω φάση συμπληρώνεται ισοπροπανόλη - σε αναλογία τα 2/3 του όγκου του υγρού - και Sodium acetate - 1/10 του προϋπάρχοντος υγρού αντίστοιχα. Να σημειωθεί πως η προσθήκη Sodium acetate, θα πρέπει να συνοδεύεται από εφαρμογή επαναλαμβανόμενης και ταχείας αναρρόφησης - εκρόφησης, αποβλέποντας στην καλή ανάμιξη όλων των παραπάνω.
9. Τα δείγματα τοποθετούνται στους -20°C για 30 min ή overnight, δηλαδή μέχρι και την επόμενη ημέρα.

Στο πειραματικό μέρος της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας, τα δείγματα αφήνονταν overnight.

10. Σε αυτό το στάδιο, τα δείγματα παραλαμβάνονταν και οδηγούνταν για φυγοκέντρηση για 10 min σε 10.000 rpm, με την προϋπόθεση ότι έχει επέλθει το ξεπάγωμά τους.
11. Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει τη προσθήκη 1 mL αιθανόλης 70 % σε κάθε μικροσωληνάριο, τα οποία μάλιστα οδηγούνται ξανά για φυγοκέντρηση των 10 min σε 13.000 rpm. Το στάδιο αυτό εφαρμόζεται άλλη μία φορά.
12. Ολοκληρώνοντας, στα μικροσωληνάρια προστίθενται ακόμη 100 μL του αντιδραστηρίου TE (1x) και για 45 min τα δείγματα τοποθετούνται σε θερμοκρασία των 37°C .
13. Με το πέρας του χρονικού διαστήματος του απαιτείται να παραμείνουν τα δείγματα στους 37°C , έπεται η ικανοποιητική ανάδευση του εσωτερικού των μικροσωληναρίων

με εφαρμογή επαναλαμβανόμενης και ταχείας αναρρόφησης - εκρόφησης, αποσκοπώντας στη διάλυση του ιζήματος.

14. Τέλος, τα δείγματα συλλέγονται και τοποθετούνται σε θερμοκρασία των - 20° C μέχρι το επόμενο βήμα.

Η διαδικασία της ολοκλήρωσης απομόνωσης DNA - μέσω της μεθόδου CTAB - διαδέχεται την πραγματοποίηση φασματοφωτομέτρησης και ηλεκτροφόρησης. Μέσω αυτών των διαδικασιών ποσοτικοποιείται η συγκέντρωση του DNA, αν και εφόσον κατάφερε να απομονωθεί. Επομένως, αξιολογείται και αν η μέθοδος εξαγωγής γενετικού υλικού πραγματοποιήθηκε με επιτυχία, καθώς ενδέχεται να κριθεί αναγκαία η επανάληψη εξαγωγής γενετικού υλικού σε κάποιο δείγμα, σε περίπτωση που δεν έχει ληφθεί.

2.2.3. ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ:

Το πρωτόκολλο της Φασματοφωτομέτρησης αποτελείται από τα παρακάτω στάδια:

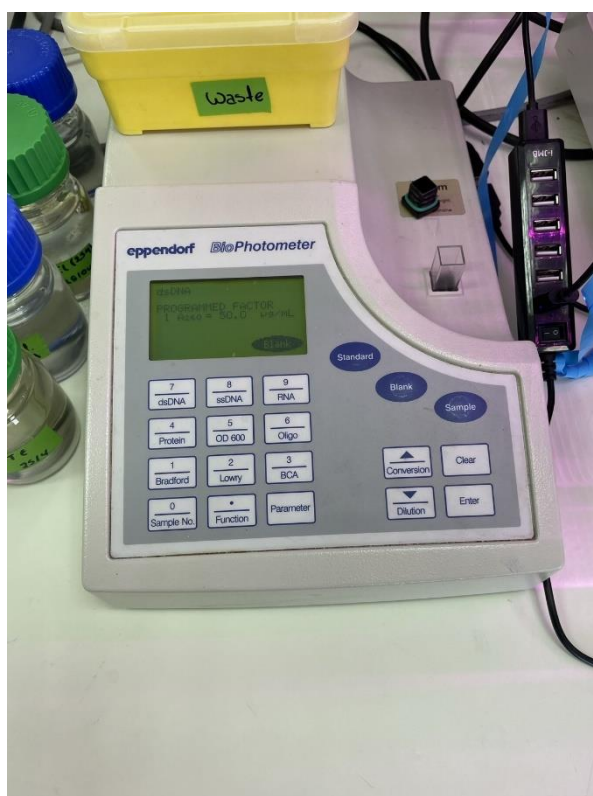
1. Αρχικά, το φωτόμετρο τίθεται σε λειτουργία και το πρόγραμμα φασματοφωτομέτρησης ρυθμίζεται κατάλληλα για την μέτρηση dsDNA ή αλλιώς του δίκλωνου DNA.
2. Σε μία κυψελίδα UV προστίθενται 500 μ L αποστειρωμένου νερού. Αυτό, θα είναι το τυφλό ή blank και θα μετρηθεί πρώτο.
3. Η κυψελίδα πριν τοποθετηθεί στην κατάλληλη θέση, καθαρίζεται εξωτερικά με απορροφητικό χαρτί στα σημεία που πρόκειται να τη διαπεράσει το φάσμα.
4. Αφού εισέλθει στην εσοχή το τυφλό, επιλέγεται το 'Blank'.
5. Κατόπιν, ετοιμάζονται και τα υπόλοιπα δείγματα. Ειδικότερα, για το κάθε δείγμα αντιστοιχεί μία καθαρή κυψελίδα UV, στην οποία προστίθενται 495 μ L αποστειρωμένου νερού και 5 μ L γενετικού υλικού και αναδεύονται με εφαρμογή επαναλαμβανόμενης και ταχείας αναρρόφησης - εκρόφησης, ώστε να αναμιχθούν επαρκώς.
6. Έτσι, τοποθετείται η πρώτη κυψελίδα - αφού έχει προηγηθεί καθαρισμός της με απορροφητικό χαρτί στο σημείο που θα τη διαπεράσει το φάσμα - και επιλέγεται το 'Sample'.
7. Μετέπειτα, το ένα δείγμα διαδέχεται το άλλο και άρα η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρις ότου πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις για όλα τα δείγματα.

Ενδιάμεσα της φωτομέτρησης των δειγμάτων, παρεμβάλλεται και η καταγραφή των αποτελεσμάτων του εκάστοτε δείγματος. Λαμβάνεται υπόψη μόνο η απορρόφηση στα 260 nm

και εν συνεχεία υπολογίζεται η συγκέντρωση του DNA που έχει απομονωθεί από το κάθε δείγμα από τον παρακάτω τύπο:

$$C_{DNA} \text{ ng } \times \mu\text{L}^{-1} = A_{260} \times 50 \times 100$$

Ωστόσο, η αναλογία A_{260}/A_{280} αποτελεί μια γρήγορη εκτίμηση της ποιότητας και ποσότητας του DNA. Ειδικότερα, εάν η τιμή του παραπάνω λόγου ανέρχεται από 1,8 έως 2, το δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ χαρακτηρίζεται από υψηλή καθαρότητα και είναι απαλλαγμένο από ανεπιθύμητα προϊόντα όπως δευτερογενείς μεταβολίτες και πολυσακχαρίτες.



Εικόνα 6. Φασματοφωτόμετρο BioPhotometer, το οποίο έχει προσαρμοστεί για τη μέτρηση dsDNA.

2.2.4. ΑΡΑΙΩΣΗ:

Είναι βέβαιο πως από τον κάθε φυτικό ιστό δεν έχει απομονωθεί ισόποσο DNA με εκείνο των υπολοίπων δειγμάτων. Επομένως, κρίνεται αναγκαίο να επέλθει η αραιώση αυτών, προτού διεξαχθεί η μέθοδος RCR. Με αυτόν τον τρόπο, επιτυγχάνεται να εξισωθούν οι συγκεντρώσεις του DNA που έχει απομονωθεί. Όπως προαναφέρθηκε, η ποσοτικοποίηση του DNA έχει πραγματοποιηθεί μέσω της Φασματοφωτομέτρησης των δειγμάτων, ενώ η αραιώσή τους εκτιμάται βάσει του τύπου $C_1V_1 = C_2V_2$, όπου:

C_1 = Η αρχική συγκέντρωση DNA του κάθε δείγματος που έχει υπολογιστεί μέσω του φασματοφωτόμετρου.

V_1 = Ο αρχικός όγκος διαλύματος του κάθε δείγματος, ορισμένη ποσότητα του οποίου πρέπει να αξιοποιηθεί για την αραίωση.

C_2 = Η τελική συγκέντρωση DNA του κάθε δείγματος, η οποία έχει καθοριστεί $40 \text{ ng} \times \mu\text{L}^{-1}$.

V_2 = Ο τελικός όγκος του διαλύματος κάθε δείγματος που πρέπει να ανέρχεται στα $25 \mu\text{L}$ και για τον οποίο ισχύει ότι ισούται με $V_1 + V_{\text{H}_2\text{O}}$.

Έτσι, προσδιορίστηκε ο άγνωστος παράγοντας V_1 και κατόπιν ο όγκος του αποστειρωμένου νερού (ddH_2O) που απαιτείται για το κάθε δείγμα. Επομένως, σε νέα αριθμημένα μικροσωληνάρια των $1,5 \mu\text{L}$, προστέθηκε ddH_2O σε ποσότητα που αναλογεί σε κάθε δείγμα και ακολούθως μεταγγίστηκε ορισμένος όγκος από το αρχικό διάλυμα V_1 βάσει των υπολογισμών που προέκυψαν παραπάνω.

2.2.5. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ:

Για την διεξαγωγή της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράση πρέπει να διευκρινιστεί πως αξιοποιήθηκαν δύο ζευγάρια εκκινητών, οι οποίοι καλούνται trnL (με $T_M = 54^\circ \text{C}$) και ITS2 (με $T_M = 47,7^\circ \text{C}$).

1. Σε κάθε περίπτωση, πρώτο βήμα αποτελεί το ξεπάγωμα των εκκινητών, καθότι διατηρούνται στους -20°C .
2. Κατόπιν, οδηγούνται στη φυγόκεντρο για 'pulse', ώστε να επιτευχθεί η διάλυση τους, αν ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι οι εκκινητές απαντώνται σε μορφή σκόνης.
3. Στους -20°C φυλάσσονται επίσης και τα μικροσωληνάρια με το καθαρό νερό και τα οποία πρέπει να ξεπαγώσουν.
4. Έτσι, σε δύο μικροσωληνάρια των $1,5 \text{ mL}$ μεταφέρονται από $50 \mu\text{L}$ καθαρού νερού στο καθένα.
5. Ύστερα, σε ένα σωληνάριο μεταγγίζονται $5 \mu\text{L}$ από τον πρόσθιο εκκινητή, ενώ στο άλλο $5 \mu\text{L}$ από τον οπίσθιο πραγματοποιώντας εφαρμογή επαναλαμβανόμενης και ταχείας αναρρόφησης - εκρόφησης.

Κατά αυτόν τον τρόπο, επιτυγχάνεται η αραίωση του κάθε ζεύγους εκκινητών - αναγκαία προετοιμασία για την διαδικασία της PCR.

6. Στα πλαίσια της προεργασίας εντάσσεται και η ρύθμιση του μηχανήματος. Ο προσδιορισμός των συνθηκών έγκειται από τον εκάστοτε εκκινητή.

7. Αυτή τη χρονική στιγμή, είναι αναγκαίο να γίνει ετικετοποίηση (labeling) ειδικών σωληνάρων 1 mL που καλούνται και PCR σωληνάρια. Στην εσφυρισμένη περιοχή του σωληναρίου θα αναγράφεται η ημερομηνία και ο αριθμός του εκάστοτε δείγματος.
8. Τελευταίο στάδιο αποτελεί η παρασκευή ενός Master mix, που θα αναφερθεί παρακάτω για την περίπτωση του κάθε εκκινητή ξεχωριστά.

2.2.5.1. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΜΕ *trnL*:

Η PCR στο τμήμα *trnL* διεκπεραιώθηκε, αξιοποιώντας τους παρακάτω εκκινητές με τις αντίστοιχες αλληλουχίες:

cB49317-*trnL*114: CGAAATCGGTAGACGCTACG (ή 44 c)

dA49855-*trnL*115: GGGGATAGAGGGACTTGAAC (ή 45 d)

Με την προϋπόθεση ότι έχει πραγματοποιηθεί η αραίωση των *trnL* εκκινητών, η ρύθμιση των συνθηκών και έχουν επισημανθεί τα PCR σωληνάρια, επιβάλλεται η παρασκευή ενός διαλύματος Master mix.

Σε ένα μικροσωληνάριο των 2 mL, λοιπόν, προστίθενται τα παρακάτω αντιδραστήρια σε ποσότητα που αναλογεί σε 20 δείγματα.

Πίνακας 5. Ποσότητα που αναλογεί σε κάθε αντιδραστήριο για την PCR με *trnL*

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (Για 20 δείγματα)	Ποσότητα (Για 1 δείγμα)
Buffer	100 μ L	5 μ L
MgCl ₂	30 μ L	1,5 μ L
dNTPs	20 μ L	1 μ L
Primer c (πρόσθιος)	50 μ L	2,5 μ L
Primer d (οπίσθιος)	50 μ L	2,5 μ L
Taq απλή	20 μ L	1 μ L
H ₂ O έγχυσης	690 μ L	34,5 μ L

Κατά την παρασκευή του πρέπει να τονιστεί, πως τα αντιδραστήρια λόγω της ευαισθησίας τους παρέμεναν στον πάγο.

Το νερό για έγχυση αποτελεί το πρώτο στοιχείο που τοποθετείται στο μικροσωληνάριο, ενώ η Taq πολυμεράση εισέρχεται προτελευταία. Έτσι, σε κάθε σωληνάριο της PCR μεταφέρονται από 48 μ L του διαλύματος Master mix. Ολοκληρώνοντας, σε καθένα από αυτά προστίθενται και 2 μ L του αντίστοιχου DNA. Το κάθε PCR σωληνάριο διαθέτει πλέον τελικό όγκο 50 μ L.

Εντέλει, αφού αναδευτούν τα συστατικά τους με up and down pipetting, οδηγούνται στον θερμοκυκλωποιητή για την διεκπεραίωση της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης. Ειδικότερα, θα εκτελεστούν 35 κύκλοι από το μηχάνημα. Ο κάθε κύκλος περιλαμβάνει τα υποφαινόμενα στάδια.

Οι συνθήκες που εκτίθενται τα δείγματα για την πλήρωση ενός κύκλου - βάσει πρωτόκολλου για το ζεύγος εκκινητών trnL - είναι οι ακόλουθες:

Πίνακας 6. Οι συνθήκες που απαιτούνται για την πλήρωση ενός κύκλου PCR με trnL

Βήματα	Θερμοκρασίες	Χρόνος
Αρχική Αποδιάταξη	94° C	5 min
Αποδιάταξη	94° C	30 sec
Θερμοκρασία Υβριδισμού	55° C	1,5 min
Επιμήκυνση	72° C	1,5 min
Τελική Επιμήκυνση	72° C	5 min

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται για 35 επαναλήψεις από το ίδιο το μηχάνημα.

2.2.5.2. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΜΕ ITS2:

Για την δεύτερη Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που αναγράφονται παρακάτω με τις ακόλουθες αλληλουχίες:

ITS2F1: ATGCGATACTTGGTGTGAAT (ή 49)

ITS2R2: GACGCTTCTCCAGACTACAAT (ή 50)

Ομοίως, αφού ολοκληρωθεί το αραιώμα των εκκινητών, πραγματοποιηθεί η ρύθμιση της μηχανής και η ετικετοποίηση των σωληνάρων PCR, παρασκευάζεται το Master mix που θα περιλαμβάνει τα απαραίτητα αντιδραστήρια για την διεξαγωγή της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης.

Σε ένα μικροσωληνάριο των 2 mL, λοιπόν, προστίθενται τα παρακάτω αντιδραστήρια σε ποσότητα που αναλογεί σε 17 δείγματα.

Πίνακας 7. Ποσότητα που αναλογεί σε κάθε αντιδραστήριο για την PCR με ITS2

Αντιδραστήριο	Ποσότητα (Για 17 δείγματα)	Ποσότητα (Για 1 δείγμα)
Buffer	42,5 µL	2,5 µL
MgCl ₂	12,75 µL	0,75 µL

dNTPs	8,5 μ L	0,5 μ L
Primer 49 (πρόσθιος)	21,25 μ L	1,25 μ L
Primer 50 (οπίσθιος)	21,25 μ L	1,25 μ L
Taq απλή	8,5 μ L	0,5 μ L
H ₂ O έγχυσης	293,25 μ L	17, 25 μ L

Κατά την παρασκευή του πρέπει να τονιστεί, πως τα αντιδραστήρια λόγω της ευαισθησίας τους παρέμεναν στον πάγο.

Το καθαρό H₂O, όπως προαναφέρθηκε, προστίθενται πρώτο στο σωληνάριο, ενώ η Taq πολυμεράση είναι το προτελευταίο αντιδραστήριο που μεταγγίζεται. Σε αυτήν την περίπτωση, σε κάθε σωληνάριο PCR θα εισέλθουν από 23 μ L Master mix και 2 μ L από το αντίστοιχο DNA. Συνολικά, λοιπόν, σε κάθε σωληνάριο ο τελικός όγκος ισούται με 25 μ L. Εντέλει, αφού αναδευτούν τα συστατικά τους με εφαρμογή επαναλαμβανόμενης και ταχείας αναρρόφησης - εκρόφησης, οδηγούνται στον θερμοκυκλωποιητή για την διεκπεραίωση της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης. Ειδικότερα, θα εκτελεστούν 35 κύκλοι από το μηχάνημα. Ο κάθε κύκλος περιλαμβάνει τα υποφαινόμενα στάδια.

Οι συνθήκες που εκτίθενται τα δείγματα για την πλήρωση ενός κύκλου - βάσει πρωτόκολλου για το ζεύγος εκκινητών ITS2 - είναι οι ακόλουθες:

Πίνακας 8. Οι συνθήκες που απαιτούνται για την πλήρωση ενός κύκλου PCR με ITS2

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

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται για 35 επαναλήψεις από το ίδιο το μηχάνημα.



Εικόνα 7. Θερμοκυκλοποιητής PCR Fast Gene, του οποίου οι συνθήκες έχουν ρυθμιστεί για την διεξαγωγή PCR με τον εκκινητή ITS2.

2.2.6. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗ:

Η διαδικασία της Ηλεκτροφόρησης ακολουθεί την εξής πορεία:

1. Ζυγίζονται 0,2 gr αгарόζης, τα οποία προστίθενται σε κωνική φιάλη των 100 mL.
2. Σε ογκομετρικό κύλινδρο των 50 mL προστίθενται 20 mL TAE (1x), τα οποία με τη σειρά τους μεταγγίζονται προσεκτικά στην κωνική που απαντάται η ποσότητα αгарόζης.
3. Έτσι, το μείγμα μεταφέρεται στον φούρνο μικροκυμάτων, αφού πρώτα καλυφθεί η με απορροφητικό χαρτί, αποβλέποντας στη διάλυση της αгарόζης - ή την ομογενοποίηση του μείγματος μέσω της θέρμανσής του.
4. Τη χρονική στιγμή που θα παρατηρηθεί ο σχηματισμός φυσαλίδων, η κωνική εξέρχεται από τον φούρνο μικροκυμάτων και αναδεύεται για λίγα δευτερόλεπτα ακόμα και αξιολογείται αν έχει επέλθει πλήρως η ομογενοποίηση.

Φυσικά, αν η διάλυση δεν έχει πραγματοποιηθεί στον επιθυμητό βαθμό, η κωνική εισέρχεται για περαιτέρω θέρμανση στα μικροκύματα. Ομοίως, με την παραγωγή φυσαλίδων η κωνική απομακρύνεται από το φουρνάκι και αναδεύεται.

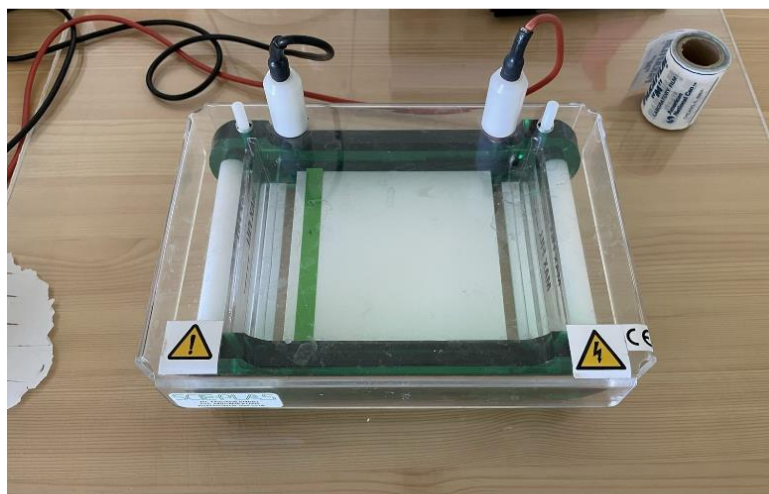
5. Όταν κριθεί πως έχει πραγματοποιηθεί η ομογενοποίηση, το μείγμα παραμένει στη κωνική για 5 έως 7 min μέχρι να μειωθεί η θερμοκρασία του.

6. Έπειτα, γίνεται μετάγγιση του μείγματος στο καστ, όπου αφήνεται να πήξει για περίπου 30 min.
7. Όταν το gel κριθεί ότι έχει πήξει, αφαιρείται από το καστ το χτενάκι και πλέον καθίστανται ευδιάκριτα τα πηγαδάκια που έχουν σχηματιστεί και τα οποία θα υποδεχτούν τον ladder και τα δείγματα.
8. Τοποθετείται, λοιπόν, το gel στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και αν κριθεί απαραίτητο προστίθεται σε αυτήν TAE (1x), σε ποσότητα τέτοια που να καλύπτει το gel.
9. Σε μικροσωληνάρια των 1 mL προστίθενται 3 μ L δείγματος - κάθε δείγμα αντιστοιχεί και σε ένα ξεχωριστό σωληνάριο - ενώ σε όλα έχει ήδη μεταφερθεί και από 1 μ L χρωστικής.

Βέβαια, προηγείται η αρίθμηση των μικροσωληναρίων με άξονα τα δείγματα που πρόκειται να τοποθετηθούν σε αυτά.

10. Ασφαλώς, ετοιμάζεται και ένα μικροσωληνάριο για τον ladder, στο οποίο περιέχονται 3 μ L από αυτόν και 1 μ L χρωστικής.
11. Στο πρώτο πηγαδάκι, μεταγγίζονται τα 4 μ L ladder και χρωστικής.
12. Τα επόμενα πηγαδάκια φορτώνονται διαδοχικά με τα δείγματα DNA, ενώ αξίζει να σημειωθεί πως μεταξύ του ladder και πρώτου δείγματος παρεμβάλλεται - για πρακτικούς σκοπούς - ένα κενό πηγαδάκι.
13. Με το πέρας της φόρτωσης όλων των δειγμάτων, η συσκευή ηλεκτροφόρησης τίθεται σε λειτουργία, τα δύο καλώδια - που τροφοδοτούν με εναλλασσόμενο ρεύμα τη διαδικασία - εισέρχονται στις αντίστοιχες εσοχές, επιλέγεται το πρόγραμμα 100 V και το ηλεκτρικό ρεύμα αφήνεται να διαπεράσει το gel.
14. Η διαδικασία αυτή, από τη στιγμή που θα σημειωθεί η έναρξή της, διαρκεί 20 min.
15. Αφού παρέλθει το διάστημα των 20 min, το πρόγραμμα τίθεται σε παύση, τα δύο καλώδια - για λόγους ασφαλείας - απομακρύνονται από τις εσοχές και λαμβάνεται το gel, το οποίο εισέρχεται σε συσκευή, ώστε να μελετηθούν τα αποτελέσματα ή και να ληφθούν οι απαραίτητες φωτογραφίες.

Αναμφίβολα, σε περίπτωση που αξιολογηθεί ότι ο ladder δεν έχει σχηματίσει τις επιθυμητές ζώνες ή και το γενετικό υλικό δεν έχει κινηθεί επαρκώς προς τον θετικό πόλο, τοποθετείται στη συσκευή ξανά με τον τρόπο που αναφέρθηκε για κάποια ακόμη λεπτά.



Εικόνα 8. Συσκευή Ηλεκτροφόρησης SCIE – PLAS.



Εικόνα 9. Gel Αγαρόζης, το οποίο πρόκειται να τοποθετηθεί στη συσκευή Ηλεκτροφόρησης. Απαντάται μέσα στο καλούπι και διακρίνονται τα πηγαδάκια.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:

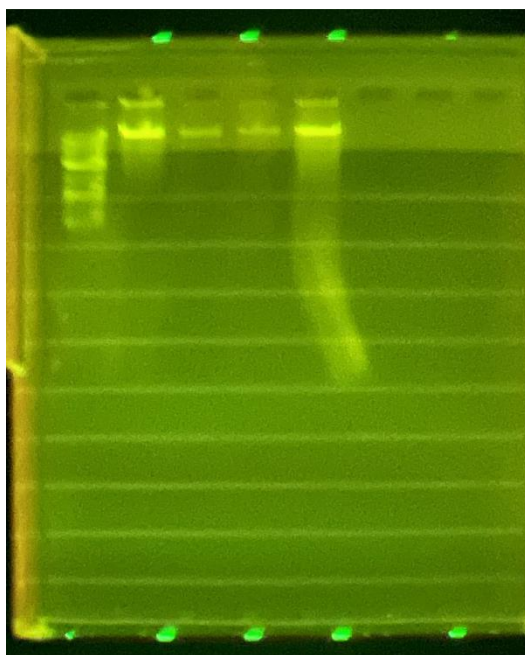
Κατόπιν της διεκπεραίωσης του πρωτόκολλου CTAB - για όλα τα δείγματα που είχαν συλλεχθεί - ακολούθησε η φασματοφωτομετρική τους ανάλυση. Η διαδικασία αυτή, αποβλέπει στην ποσοτικοποίηση του DNA αν και εφόσον έχει επιτευχθεί η εξαγωγή του από τους φυτικούς ιστούς στο στάδιο της απομόνωσης που προηγείται.

Έτσι, από την Φασματοφωτομέτρηση καταγράφηκαν τα παρακάτω αποτελέσματα:

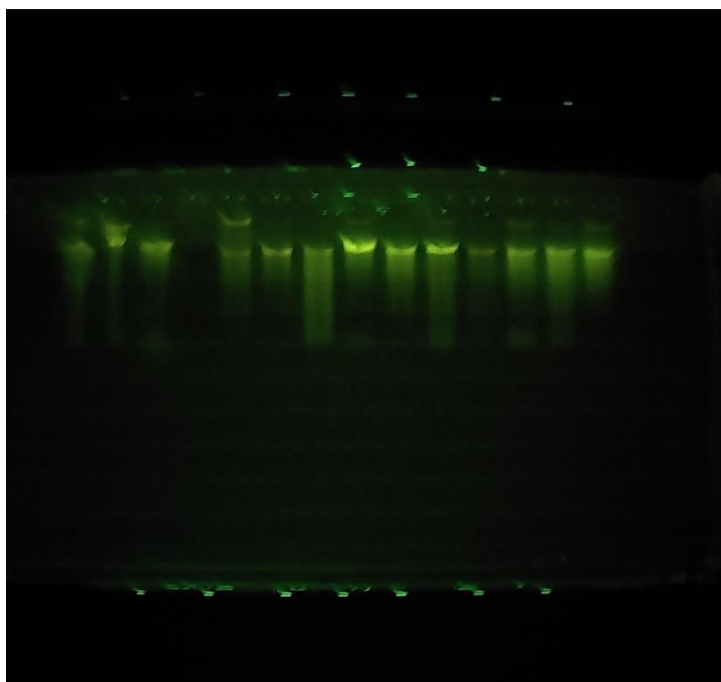
Πίνακας 9. Αποτελέσματα Φασματοφωτομέτρησης

Δείγματα	A260	A260/A280	C (ng x μL^{-1})
Δείγμα 1	0,034	1,26	170
Δείγμα 2	0,022	1,34	110
Δείγμα 3	0,05	1,16	250
Δείγμα 4	0,038	1,18	190
Δείγμα 5	0,144	1,32	720
Δείγμα 6	0,033	1,41	165
Δείγμα 7	0,225	1,57	1125
Δείγμα 8	0,045	1,07	225
Δείγμα 9	0,075	1,24	375
Δείγμα 10	0,018	2,55	90
Δείγμα 11	0,071	1,2	355
Δείγμα 12	0,055	1,66	275
Δείγμα 13	0,115	1,12	575
Δείγμα 14	0,212	1,09	1060
Δείγμα 15	0,134	1,16	670
Δείγμα 16	0,109	1,39	545
Δείγμα 17	0,19	1,91	950
Δείγμα 18	0,043	1,06	215

Για την πιστοποίηση της παρουσίας και προσδιορισμού της συγκέντρωσης του DNA κρίθηκε επίσης αναγκαία η πραγματοποίηση Ηλεκτροφόρησης σε γέλη αгарόζης. Με το πέρας της παραπάνω μεθόδου, συγκεντρώθηκε το κάτωθι φωτογραφικό υλικό με την παρατήρηση σε φάσμα UV :



Εικόνα 10. Στο πρώτο πηγαδάκι απαντάται ο ladder, ο οποίος έχει σχηματίσει τις χαρακτηριστικές ζώνες. Εν συνεχεία, βρίσκονται διαδοχικά τα δείγματα 1 έως 4.



Εικόνα 11. Στην πρώτη θέση έχει τοποθετηθεί το δείγμα 5, ενώ στα υπόλοιπα πηγαδάκια απαντώνται με τη σειρά τα τελευταία 13 δείγματα. Παρατηρείται πως στη 4η θέση, το δείγμα 8 δεν έχει σχηματίσει αντίστοιχες ζώνες. Συνεπώς, δεν έχει απομονωθεί DNA, γεγονός που οδήγησε στον αποκλεισμό του από την PCR.

Προτού διεξαχθεί η τεχνική της PCR, ενδείκνυται η αραίωση του κάθε δείγματος, ώστε όλα να διαθέτουν τον ίδιο τελικό όγκο και συγκέντρωση που ανέρχονται στα 25 μL και 25 $\text{ng} \times \mu\text{L}^{-1}$, αντίστοιχα. Ισχύει πως, οι μετρήσεις που λήφθηκαν από το φασματοφωτόμετρο αποτελούν

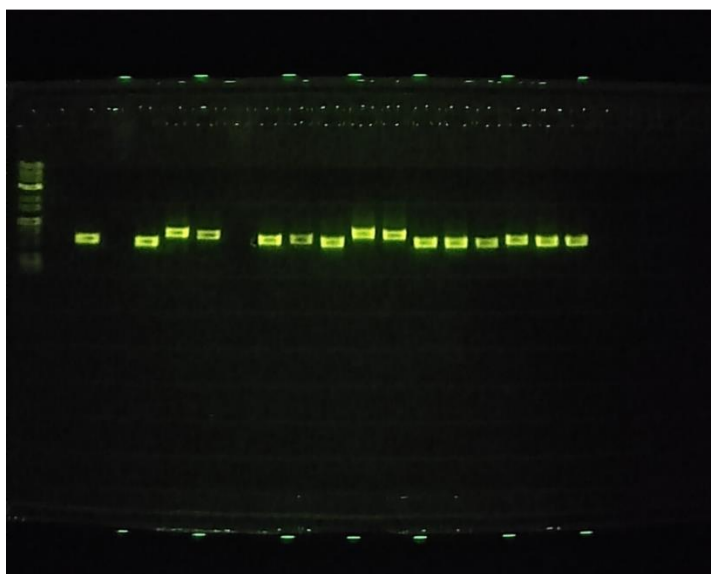
βάση για την αραιώση που υφίσταται το κάθε δείγμα, όπως έχει αναλυθεί και στην ενότητα των μεθόδων.

Συμπερασματικά, οι αραιώσεις διαμορφώθηκαν όπως αναγράφεται παρακάτω:

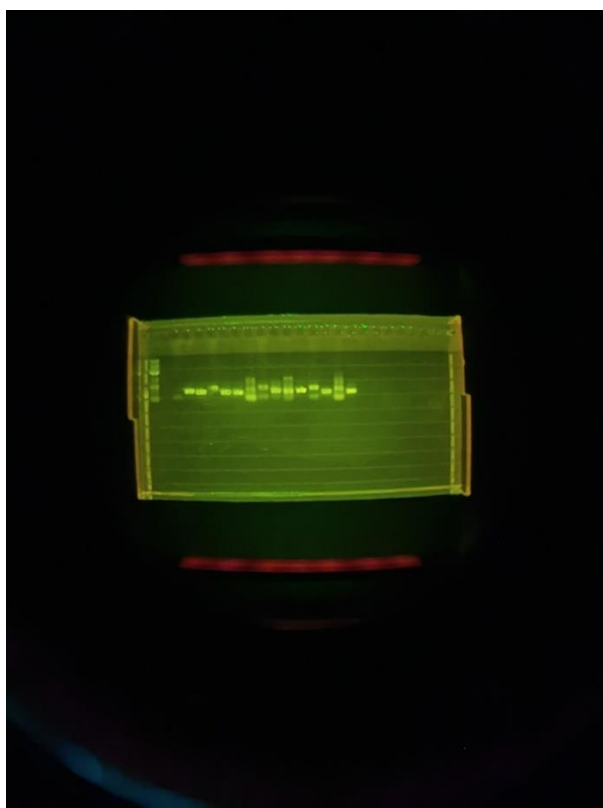
Πίνακας 10. Αραιώσεις Δειγμάτων

Δείγματα	A260	A260/ A280	C1 (ng x μL^{-1})	V_{DNA} ή V₁ (μL)	Vνερού (μL)
Δείγμα 1	0,034	1,26	170	5,9	19,1
Δείγμα 2	0,022	1,34	110	9,1	15,9
Δείγμα 3	0,05	1,16	250	4	21
Δείγμα 4	0,038	1,18	190	5,3	19,7
Δείγμα 5	0,144	1,32	720	1,4	23,6
Δείγμα 6	0,033	1,41	165	6,1	18,9
Δείγμα 7	0,225	1,57	1125	0,9	24,1
Δείγμα 8	0,045	1,07	225	4,4	20,6
Δείγμα 9	0,075	1,24	375	2,7	22,3
Δείγμα 10	0,018	2,55	90	11,1	13,9
Δείγμα 11	0,071	1,2	355	2,8	22,2
Δείγμα 12	0,055	1,66	275	3,6	21,4
Δείγμα 13	0,115	1,12	575	1,7	23,3
Δείγμα 14	0,212	1,09	1060	0,9	24,1
Δείγμα 15	0,134	1,16	670	1,5	23,5
Δείγμα 16	0,109	1,39	545	1,8	23,2
Δείγμα 17	0,19	1,91	950	1,1	23,9
Δείγμα 18	0,043	1,06	215	4,7	20,3

Με την διεκπεραίωση της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράση λήφθηκαν οι παρακάτω φωτογραφίες μετά από παρατήρηση σε UV φάσμα:



Εικόνα 12. Αποτέλεσμα PCR με το ζεύγος εκκινητών *trnL* για τα δείγματα 1 - 17. Στη πρώτη θέση απαντάται ο *ladder*, ενώ μεταξύ αυτού και του πρώτου δείγματος παρεμβάλλεται ένα κενό πηγαδάκι. Το 2^ο και 6^ο δείγμα θα εξαιρεθούν από την διαδικασία αλληλούχησης και της PCR που ακολουθεί με τον ITS2, καθώς φαίνεται πως δεν έχει πολλαπλασιαστεί το DNA.



Εικόνα 13. Αποτέλεσμα PCR με το ζεύγος εκκινητών ITS2 για τα δείγματα 1 - 15. Στη πρώτη θέση έχει τοποθετηθεί ο *ladder*, ενώ μεταξύ αυτού και του πρώτου δείγματος παρεμβάλλεται ένα κενό πηγαδάκι. Το 1^ο δείγμα

αποφασίστηκε να μην σταλεί για αλληλούχιση, καθώς η ποσότητα του DNA που πολλαπλασιάστηκε είναι εξαιρετικά μικρή. Αυτό αποδεικνύεται φαίνεται μέσω της Ηλεκτροφόρησης.

Τα δείγματα μετά τη διεξαγωγή της PCR και αφού πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζη - για την ποσοτικοποίηση και αξιολόγησή του DNA - στάλθηκαν για αλληλούχιση στο εργαστήριο Cemía στη Λάρισα, πρώτα για την trnL περιοχή και έπειτα για την ITS2. Για την ανάγνωση των αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Sanger. Κατόπιν, μέσω της βάσης δεδομένων NCBI (National Center for Biotechnology Information) και του προγράμματος Blast λήφθηκαν τα παρακάτω αποτελέσματα για το κάθε δείγμα, τα οποία διαμορφώθηκαν σε πίνακες ως εξής:

Αλληλουχία Δείγματος 1 της χλωροπλαστικής περιοχής trnL σε μορφή fasta

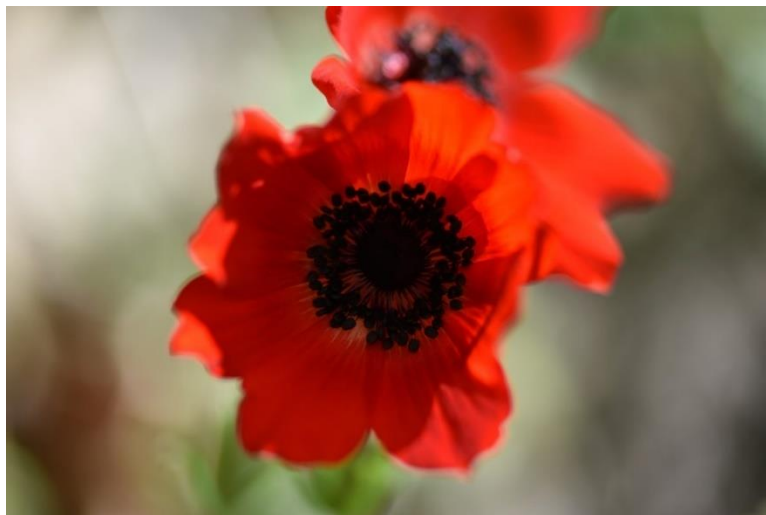
>20221102BS1P1_A09_2022-11-08.ab1

```
GTGATAACTTTCAAATTCAGAGAAACCCCGGAATTAAAAATGGGCAATCCTGAG
CCAAATCCTTATTTTCAGAAAACAAAAGAGGGTTCAGAAAGCAAGAAAAA
AGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACGAATAGAGTTGACTGCG
TTGATCGAGGATTCCTTTTAAACTACAAAAAAGCTGAACCCGTATACATATAATA
AAAAAATATCAAAGATTAATGGTCATCCAAATCCTTATTTTTCTTATATGATATG
CAAAATGGAAGAATTCTTGTGATATGAATCGATTCCCAGTTTAAGTAAGAATCGA
ATATTCAGTATCAAATAAGTCACTCTATAATCTGATAGTTCTTTAAAAGAACTA
ATTGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCCATTATACATGTCAATCCCAATACTGAC
AAAAATGAAATTTATAGTAAGAGGAAAATCCGTCGACTTTTAAAATCGTGAGG
```

Πίνακας 11. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 1 στην χλωροπλαστική περιοχή trnL

Περιγραφή	Max Score	E – value	Per Ident	Accession length	Accession
<i>Anemone hortensis</i>	904	0,0	100,00 %	158965	NC066445.1
<i>Anemone palmata</i>	874	0,0	98,98 %	1017	AM268043.1
<i>Anemone altaica</i>	848	0,0	97,96 %	160806	NC064389.1

Anemone <i>coronaria</i>	806	0,0	96,63 %	1046	AM268042.1
-----------------------------	-----	-----	---------	------	----------------------------



Εικόνα 14. Δείγμα 1, *Anemone coronaria*, *Ranunculaceae*

Αλληλουχία Δείγματος 2 της χλωροπλαστικής περιοχής trnL σε μορφή fasta

>20221102BS2P1_B09_2022-11-08.ab1

```
TTTCAAATTCAGAGAAACCCTGGAATTAATAAAAATGGGTAATCCTGAGCCAAA
TCACGTTTTCCGAAAACAAACAAAGGTTTCAGAAAGCGAAAATAAAAAAGGATAG
GTGCAGAGACTCGATGGAAGTTATTCTAACGAATGGAGTTAATTGTATACATTGG
TATAGGAATCCTTCTATCGAAACTTCAGAAAAGTGAAGGATAAGCCTGTATACAT
AATACAAAAGAATTGGTGTGAATCGATTCCATATTGAAAAAGAATCCAATATT
AATTGATCAAACCATTCACTCCATAATCTGATAGATCTTTTGAAGAACTGATTAA
TCGGACGAGAATAAAGAGAGAGTCCCGTTATACATGTCAATACTGGCAACAATG
AAATTTATAGTAAGAGGAAAATC CGTCGATCAAAAATCATGAGGGTTC
```

Πίνακας 12. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 2 στην χλωροπλαστική περιοχή trnL

Περιγραφή	Max Score	E – value	Per Ident	Accession length	Accession
<i>Bellis perennis</i>	787	0,0	99,77 %	837	LC387723.1

<i>Bellis pusilla</i>	787	0,0	99,77 %	826	KP175148.1
<i>Bellis sylvestris</i>	776	0,0	99,30 %	852	KP175149.1

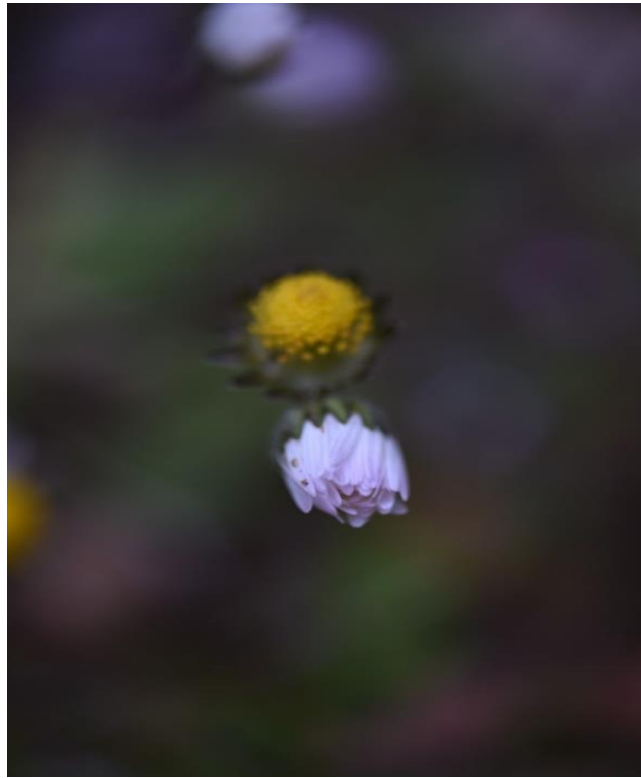
Αλληλουχία Δείγματος 2 του πυρηνικού γονιδιώματος ITS2 σε μορφή fasta

>20230308FS1P1_D06_2023-03-15.ab1

ACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTTCGGTTGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCAC
GCATCGCGTCGCCCCCATCATGCCATCCTTGTGATGCTTTGATGGGGGCGGATAC
TGGTCTCCCGTTCATCACTGAGCGGTTGGCCAAAATAAGAGTCCCATTTGACGGG
CACACGACTTGTGGTGGTTGACAAAACCGGAATCGTGTCGTGTGTCTGGATGAA
AGGTGCATCTTTAAAGACCCAATGTGTTATCATTTGATGACGCTTCGACCGCGAC
CCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA
AAGAACTTACAAGGATTCCCTTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGAATAGCCCAG
CTTGAAAATCGGACTGCCTTGCTTTCCGAATTGTAGTCTG

Πίνακας 13. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 2 στο πυρηνικό γονιδίωμα ITS2

Περιγραφή	Max Score	E – value	Per Ident	Accession length	Accession
<i>Bellis perennis</i>	758	0,0	100,00%	441	OL434513.1
<i>Diplostephium schultzei</i>	595	2e - 165	91,75 %	9098	KX063962.1
<i>Diplostephium oblongifolium</i>	588	3e - 163	91,75 %	8840	KX063984.1



Εικόνα 15. Δείγμα 2, Bellis perennis, Asteraceae

Αλληλουχία Δείγματος 3 της χλωροπλαστικής περιοχής trnL σε μορφή fasta

>20221102BS3P1_C09_2022-11-08.ab1

```
CTTCCAAATTCAGAGAAACCCTGGAACATAAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATC
TTTTTTTTTTTTTATTTTTTGATCAAAAAATAAATGGAAAATGAGAATAAAAAGAG
ATGGGTGCAGAGACTCATTGGAAGCTGTTCTAACGAAGGAAATTGACTACGTTA
GATTAGTAGCTAAAATCCTTATATCAAAAGGAAAAAATCGAAATGACAGAAAGG
ATAATCTTATATACCTAATACGTACGTTTAGATACTGACATAGCAAATGATTCAT
CGCATTTCTTTCTTATTTATATCACATATTACAATTATCTTATCWACGATAAGAAT
AAAAGGAGAAGTGTATTAGTATGAGTATGGGATAAGGTTTCTATAGAAACCCCC
CATTATATTCKATATTGTTTATAGGGATATACTATGAGCAATTATTGAAGAGTTA
TTGTGAATCAWTTCTCATTGAAGCTTGAAAAAAGAATTGAATTCCAATATTCAGT
GATCAAATTATTCATTCCAGAKTTTGATAGATCTTTTGAAGAATAAATCGGACGA
GAATAAAGAGGGGGTCCCATTTTACATGTATTACAACAACATGAAATTTAGAGT
AAGA GGAAACCCGTCGAATTTGAAAA
```

Πίνακας 14. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 3 στην χλωροπλαστική περιοχή trnL

Περιγραφή	Max Score	E – value	Per Ident	Accession length	Accession
<i>Orchis italica</i>	948	0,0	94,75 %	645	EU294185.1
<i>Orchis purpurea</i>	833	0,0	91,28 %	627	KY697464.1
<i>Orchis mascula</i>	824	0,0	91,33 %	642	KY697492.1
<i>Orchis anthropophora</i>	787	0,0	93,33 %	638	KY697445.1
<i>Neotinea ustulata</i>	754	0,0	89,16 %	649	KY697426.1

Αλληλουχία Δείγματος 3 του πυρηνικού γονιδιώματος ITS2 σε μορφή fasta

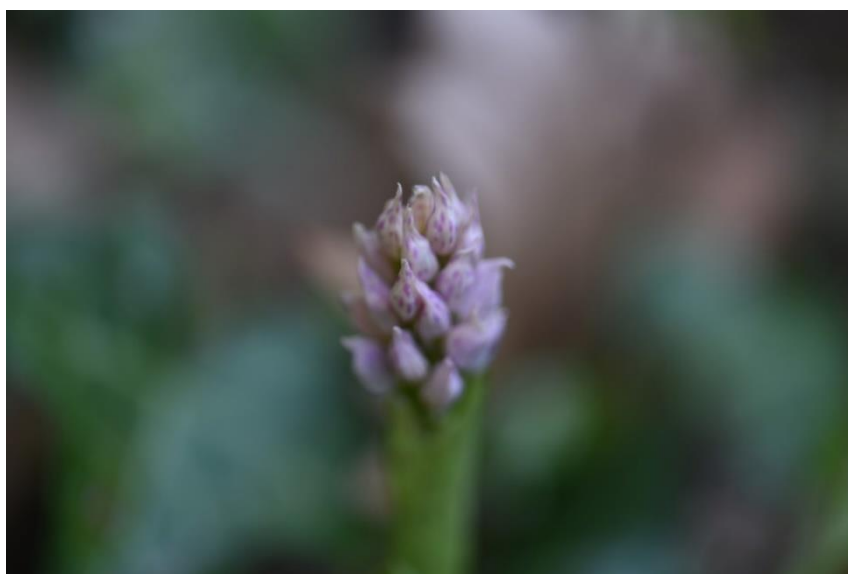
>20230308FS2P1_E06_2023-03-15.ab1

ACGCAAGTTGCGCCTGAGGCCAGCTGGCCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAA
GCATTGAATCGCTCCATAAGACCTTCGATGCTATGCGGTGGTCTTATCTAGGATG
CGGGGAATGGCCCGTCATGCGCTAATGTGTGGCAGGCTGAAGAGCGGGATGATT
TTCTCTTGGCAATGATCGATTAATGGGTGGGATGGAAGCCTCGGTTGATCCTATC
ATCGTCAGGTTGCTTTGAGAAAGCTGTGCATATCCCGGCCTAACCTAACTCACTT
GTCCTTGGAAGACAATTGACATGCGACCCCAGGATGGGCGGGGTGACCCGCTGA
GTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACGAGGATTCCCCTAGTA
ACGGCGAGCGAACC GG GATT T GCC CAGCATGGGAATCGGGCTGCTATGCGGCTC
GAATTGTAG

Πίνακας 15. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 3 στο πυρηνικό γονιδίωμα ITS2

Περιγραφή	Max Score	E – value	Per Ident	Accession length	Accession
<i>Orchis purpurea</i>	732	0,0	96,40 %	5606	MT784087.1

<i>Orchis mascula</i>	713	0,0	96,11 %	468	KX167725.1
<i>Gymnadenia conopsea</i>	695	0,0	94,85 %	6291	MN221404.1
<i>Dactylorhiza incarnata</i>	676	0,0	94,56 %	470	KX165516.1



Εικόνα 16. Δείγμα 3, *Orchis purpurea*, *Orchidaceae*

Αλληλουχία Δείγματος 4 της χλωροπλαστικής περιοχής trnL σε μορφή fasta

>20221102BS4P1_D09_2022-11-08.ab1

```

CTGCTAAGTGTTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCCTGGAACATAAAATGGGCAA
TCCTGAGCCAAATCTTAAAAAAAAAAAAAAAAACGGAAAATGAAAWAAAAAGA
GATAGGGGCAGAGACTCAAGGGAAGCTGTTCTAACGAATGAAATTGACAACGTT
AAATTAGAAGCAAAAACCCTTATTTCAAAAAAAAAAAATCGAAAATGACAAAAA
GGAAAATCTTATATACCTAAAAGGTACGTCTAGATACGGACAAAGCAAAAAATT
CACCGCATTTCTTTCTTATTTATATCAAATATAACTTTTATCTTATCTACAATTATA
CAAAAGAAAAAAAGTGTATTAATTTGAGTATGGGATAGGTTTCTTCTAGAAACCCC
CTATTTATATTCTATTTTGATTATAAGGATATACTATGAAAAATTATTGAAGAGTT
TTTGGGAACCAATTCTCATTGAAGTTGAAAAAAGAATTGAATTCAAAWATTTCGG
TGCCCAAATTWTTTCTTTCCAGAGTTTGAAAGWTCTTTTTTAAGATTAATCGGAG

```


GAGAATAAAGRAGGGGGCCCCTTTTTACWGGTGATTACCCCCAACWWKGAATT
TTAGGGTARGAGGAAAWCCCCGCCG

Πίνακας 16. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 4 στην χλωροπλαστική περιοχή *trnL*

Περιγραφή	Max Score	E – value	Per Ident	Accession length	Accession
<i>Orchis anthropophora</i>	741	0,0	89,91 %	638	KY697445.1
<i>Orchis mascula</i>	662	0,0	87,41 %	642	KY697492.1
<i>Orchis purpurea</i>	619	2e - 172	86,05 %	627	KY697464.1
<i>Orchis italica</i>	614	8e - 171	85,91 %	645	EU294185.1
<i>Habenaria sp.</i>	577	1e - 159	83,36 %	963	MF945247.1

Αλληλουχία Δείγματος 4 του πυρηνικού γονιδιώματος ITS2 σε μορφή fasta

>20230308FS3P1_F06_2023-03-15.ab1

ACGCAAGTTGCGCCTGAGGCCAGCTGGCCAAGGGCACGTCCGCCTGGGCGTCAA
GCATTGAATCGCTCCATAAGACCTTCGATGCTATGCGGTGGTCTTATCTAGGATG
CGGGGAATGGCCCGTCATGCGCTGATGTGTGGCAGGCTGAAGAGCGGGATGATT
TTCTCTTGGCAATGATCGATTAATGGGTGGGATGGAAGCCTCGGTTGATCCTATC
ATCGTCAGGTTGCTTTGAGAAAGCTATGCATATCCCGGGCTAACCTAACTCACTT
GTCCTTGAAGACAACCTGATATGCGACCCCAGGATGGGCGGGGTGACCCGCTGA
GTTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAGAAGAACTTACGAGGATTCCCCTAGTA
ACGGCGAGCGAACCGGGATTTGCCCAGCATGGGAATCGGGTCGCTATGCGGCTC
GAATTGTAG

Πίνακας 17. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 4 στο πυρηνικό γονιδίωμα ITS2

Περιγραφή	Max Score	E – value	Per Ident	Accession length	Accession
<i>Orchis purpurea</i>	749	0,0	97,08 %	5606	MT784087.1
<i>Orchis mascula</i>	713	0,0	96,11 %	468	KX167725.1
<i>Gymnadenia conopsea</i>	689	0,0	94,63 %	6291	MN221404.1
<i>Dactylorhiza incarnata</i>	671	0,0	94,33 %	470	KX165516.1



Εικόνα 17. Δείγμα 4, *Orchis anthropophora*, *Orchidaceae*

Αλληλουχία Δείγματος 5 της χλωροπλαστικής περιοχής trnL σε μορφή fasta

>20221102BS5P1_E09_2022-11-08.ab1

```
AAGTGATAACTTTCAAATTCAGAGAAACCCTGGAATTAAAAATGGGCAATCCTG
AGCCAAATCCTGCTTTCAGAAAACAAAAAGAGGGTTCAGAAAGCAAAGGGATA
GGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACGAATAGAGTTAACTGGCTTGGAT
CGAGGAATCCTTCTATTTTAATTCCCGAAAGGATGAACCCATATACGTATGTACA
AATACGTAATAAAATAGGAAAGAGGGCGACCCAAATCTTTATTTTTTATGTTATAT
GCAAAACAAATAGAAGAATTCTTGCGATTCCAAGTTGAAGTAATAATATTCAAT
ATTCTTGATCAAATCAGTTATTCTATAACCTGGTAGATTTTTTAAAGAACTGACT
GGTTGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCCATTTATACATGTCAATATCAATACCGG
CAAAAATGAAATTTATAGTAAGAGGAAAATCCGTCGACTTTAAAAATCGTGAGG
GTTCAA
```

Πίνακας 18. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 5 στην χλωροπλαστική περιοχή trnL

Περιγραφή	Max Score	E – value	Per Ident	Accession length	Accession
<i>Ranunculus bulbosus</i>	896	0,0	99,39 %	541	KY697496.1
<i>Ranunculus cantoniensis</i>	891	0,0	99,19 %	155154	NC045920.1
<i>Ranunculus repens</i>	891	0,0	99,19 %	154247	KY562594.1

Αλληλουχία Δείγματος 5 του πυρηνικού γονιδιώματος ITS2 σε μορφή fasta

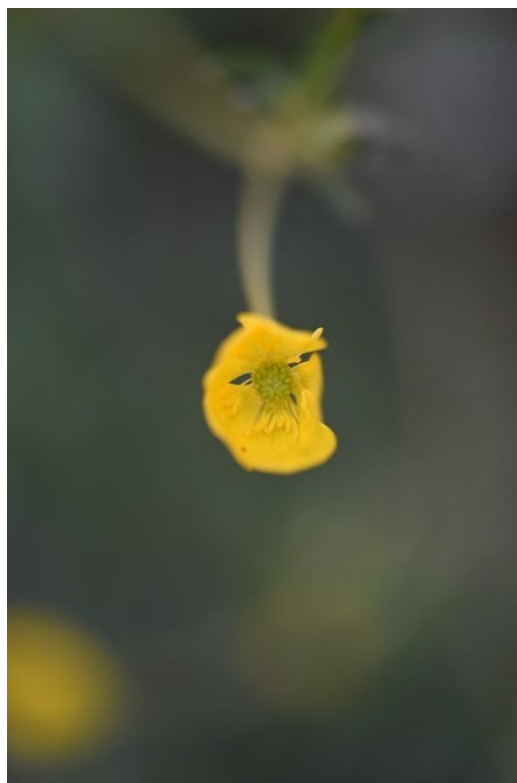
>20230308FS4P1_G06_2023-03-15.ab1

```
ACGCAAGTTGCGCCCGAGACCTTTAGGTTGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCAC
ACACAGCGTCGCTCCACACCAACCTAGTTGGTAGGGAGCGGATATTGGCCCCC
GAGTCCTTTGGGCACGGTCGGCACAAATATTGGTCCCCGGCAGCGAGTGTGCGG
GTCAGCGGTGGTTGTATTTCTCTCAAAGACAAAATGACGCGTTTCTCGTTGCATG
TTGGATCGAAACAACCCTCGAAAGCCATTTATGGCATTACCCCTGCAACCCCAGG
TCAGGCGGGATTACCCGCTRAGTTTAASCATATCAATAASCGAAGGAAAAAAA
```

CTTACAAGGATTCCCCTAKTAACGGCAAGCGAACCGGGAAAAGCCCAGCTGGGG
AATCGAACGGCTTCKTCGTCCAAATTGTATTC

Πίνακας 19. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 5 στο πυρηνικό γονιδίωμα ITS2

Περιγραφή	Max Score	E – value	Per Ident	Accession length	Accession
<i>Ranunculus bulbosus</i>	680	0,0	96,33 %	5565	MT796509.1
<i>Ranunculus repens</i>	651	0,0	95,52 %	434	KX167141.1
<i>Ranunculus macounii</i>	649	0,0	95,51 %	433	MG237407.1



Εικόνα 18. Δείγμα 5, *Ranunculus bulbosus*, *Ranunculaceae*

Αλληλουχία Δείγματος 6 της χλωροπλαστικής περιοχής trnL σε μορφή fasta

>20221102BS6P1_F09_2022-11-08.ab1

CTTAACAAGTGAAACTTTCAAATTCAGAGAAACCCTGGAATTTACAATGGGCAA
 TCCTGAGCCAAATCCTGCTTTACAAAAACAAAACAAGGGAAGTAAAGTTCAGAA
 CAGAAATCGACGACAAAAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTC
 YAACMAAAGGGAGTTGACAACACATTTCTAGGTAGATTCTATCAAAATTCGAGT
 TCTAGAAAGAAAGGATCGAGGAGAAAAAACATATCTATATATATATGTTTCAAT
 ACATATATGTATTAAAATAGTATTTCAATTGATTAACGAAGACTCTAATATTTATT
 CGATTTATGAATCTTTCCATCTCAAATGAGGGATGTTAAGAAAATCAATTTCAA
 GTTGAAGAAAAAAAAGAATATTCATTGATCAAATCATTCAATCCATCATAGTTCT
 GATAGATCTTTTGAAAAGAACTAATCAAACGAGAATAAAGATAGAGTCCCATTC
 TACATGTCAATACGACACTAATGAAATTTTGAGTAAGAGGAAAAATCCGTCGACTT
 TAAAAATCGTGAGGGTTCA

Πίνακας 20. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 6 στην χλωροπλαστική περιοχή *trnL*

Περιγραφή	Max Score	E – value	Per Ident	Accession length	Accession
<i>Securigera varia</i>	915	0,0	95,53 %	154257	NC054256.1
<i>Coronilla minima</i>	874	0,0	94,32 %	618	KY697444.1
<i>Dorycnium pentaphyllum subsp. fulgurans</i>	728	0,0	90,33 %	845	MF314954.1
<i>Lotus fulgurans</i>	728	0,0	90,33 %	845	OL697856.1

Αλληλουχία Δείγματος 6 του πυρηνικού γονιδιώματος ITS2 σε μορφή fasta

>20230308FS5P1_H06_2023-03-15.ab1

GTCTTTGACGCAGTTGCGCCCGAAGCCTTTAGGCTGAGGGCACGTCTGCCTGGGT
 GTCACACATCGTTGCCCCAACGCCAAACGCCTTGTGCTTGACGGCGCGTGGGGTG
 GAAGCTGGCTTCCCGTGAGCTACGCCTCACGGTTGGTTGAAAAATGAGTCCGTGG
 TAGTGTTTACCATGACGGATGGTGGTTGAGTAATGCTCGAGACCAGTTGTGGCAA

ACTCTACTACATTTCGGGCTCTCGTAACCCACATGTGTTTTTGGCTACACTCACAATG
 AGACCTCAGGTCAGGCGGGGCTACCCGCTGAGTTTAAGCATATCAATAAGCGGA
 GGAAAAGAACTAACAAGGATTCCCTTAGTAACGGCGAGCGAACCGGGAAGAG
 CCCACCATGAGAATCGGTTCGCCTACGGCGTCTGAATTGTAGTCT

Πίνακας 21. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 6 στο πυρηνικό γονιδίωμα ITS2

Περιγραφή	Max Score	E – value	Per Ident	Accession length	Accession
<i>Securigera varia</i>	503	1e - 137	93,77 %	382	MN601839.1
<i>Hippocrepis unisiliquosa</i>	501	4e - 137	87,94 %	470	KX282202.1
<i>Hippocrepis areolata</i>	484	4e - 132	87,13 %	472	KX282200.1



Εικόνα 19. Δείγμα 6, *Securigera varia*, Fabaceae

Αλληλουχία Δείγματος 7 της χλωροπλαστικής περιοχής trnL σε μορφή fasta

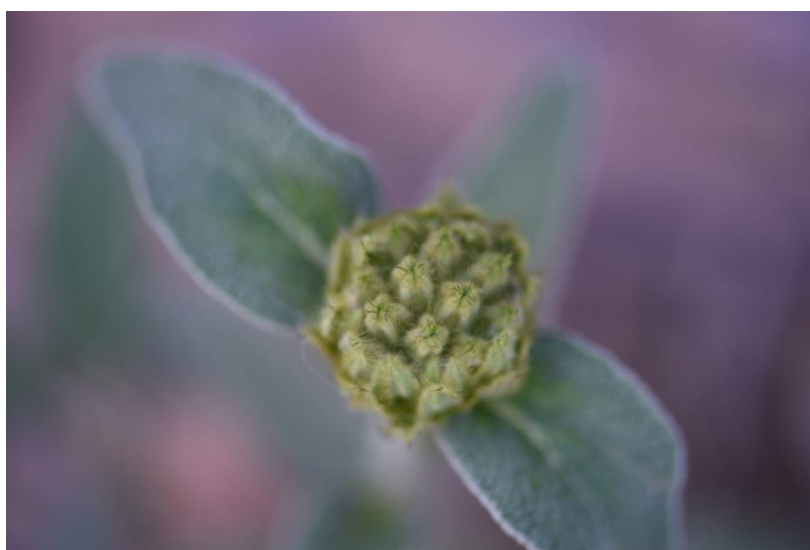
>20221102BS7P1_G09_2022-11-08.ab1

AATTGAGCTTAGTGTGGGAACCTACTAAGTGATAACTTTCAAATTCAGAGAAACC
 CCGGAATTAATAAAAAATGGGCGATCCTGATCCAAATCCTGTTTTTTTAAAACAAA

GGTTCAAAAAACGAAATAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTA
 ACAAATGGAGTTGACTGCGTTGGTAGAGGAATCCTTTCTACGGAACTTCAGAA
 AGGATGAAGGATAAACGTATCTATCGAATACTTTATCAAATGATTAATGATGGAC
 CGAATCCGTATTTTTAATATGAAAAATAGAAGAATTGGTGTGAATTGATTCTATA
 TTGAAGAAAAAATCGAATATTCATTCATCAAATCATTCACTCCATAGTTCGATAG
 ATCTTTTAAAGAACTGATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCCATTCTACA
 TGTCAATACTGGCAACAATGAAATTTATAGTAAGAGGAAAATCCGTCGACTTTTA
 AAATCGTGAGGGTTCAA

Πίνακας 22. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 7 στην χλωροπλαστική περιοχή trnL

Περιγραφή	Max Score	E – value	Per Ident	Accession length	Accession
<i>Phlomis fruticosa</i>	933	0,0	99,61 %	151639	OM731926.1
<i>Phlomis purpurea</i>	933	0,0	99,61 %	835	EU827134.1
<i>Phlomis floccosa</i>	926	0,0	99,41 %	834	EU827133.1



Εικόνα 20. Δείγμα 7, *Phlomis fruticosa*, *Lamiaceae*

Αλληλουχία Δείγματος 8 της χλωροπλαστικής περιοχής trnL σε μορφή fasta

>20221102BS8P1_H09_2022-11-08.ab1

CTTGGTATGGAACCTTGCTAAGTGTTAACTTCCAAATTCAGAGAAACCCTGGAATT
AAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCTTCTTTTTGAGAAAAAGAAATAAAAGAA
ATATATAAAATATTTCTTATTTTCAGATAAGAAATAATATTTTTCTTATCTTATCT
AATATTAAAGATAGGTGCAGAGACTCGATGGAAGCTTTTCTAACGAATAGAATTT
ATTATGTTGCAATACTAAAATTTCTCTATCGAAATAAGAGAAAGGATAGCCGTCT
ATACCAAACAAAGACGTACGTATATATGATAATTAATCAAATTATTAATCATAAA
ATCAAATCATAGTATTTATGTCAATAAATTAACAATGATTATGGAATAGCAAATT
CAGGAATTTTCGATGAATTCCATAAATTATGAATTGTTTATGGTGAATTGATTCAA
ATATGAAATTTAATGAGAAAAAACTCAATTTTAAATAATCAATTTATTCTATTT
ATGGAATTCATTATAGAGTTTGTAGATTGAAAAAATGATGATAAATCAAACGA
GAATAAAGAGAGAGTCCATTCTACATGTCAATATCGACAACAATGAAATTTATA
GTAAGAGGAAAATCCGTCGATTTTTGAAATCATGAGGGTTCAAT

Πίνακας 23. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 8 στην χλωροπλαστική περιοχή trnL

Περιγραφή	Max Score	E – value	Per Ident	Accession length	Accession
<i>Carex flacca</i>	1188	0,0	99,85 %	1033	DQ998968.1
<i>Carex spissa</i>	1142	0,0	98,91 %	1486	AF284938.1
<i>Carex collumanthus</i>	11.27	0,0	98,16 %	1028	AY757548.1



Εικόνα 21. Δείγμα 8, Carex flacca, Cyperaceae

Αλληλουχία Δείγματος 9 της χλωροπλαστικής περιοχής trnL σε μορφή fasta

>20221102BS9P1_A10_2022-11-08.ab1

```

TGGAACCTACTAAGTGGTAACTTCCAAACTCAGAGAAACCCTGGAATAAAAAAT
GGGCAATCCTGAGCCAAATCCTTGTTTTTTTTTGGAGAAAAGGATAGGTGCAGA
GACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAGTTGATTGCATTGCGTTGGTAGCTG
GAATTCTTCTTTCTATCTAAATTACAGAACAGAAAAGATAACCCTATATACCTAA
TACGCACGTATATATACTGACATATCAAACGATTAATCACGACCCAAATCCATAA
TTATTATTTATAATTTATATTTTTTATATCATAACATAATATTTATTTATAATATTA
TAACATAATATTTATTTATAATATTATAACATAATATTTAATTATTAATATAATAT
TTAATTATAATTAATTATAATATAATATTATATAATAATAATATTTTATGAAAAAT
GAAAGAGTTATTGCGAATCCATTCTAACATTGAAATTGAAGTAAGAGTCGAATAT
TCAGTGATCAAATCATTCACTCCAGAGTCTGATTGATCTTTTGAAAAAAAAAATG
ATTAATCGGACGAGAATAAAGAGAGAGTCCCATTCTACATGTCAATACCGACAA
CAATGAAATTTATAGTAAGAGGAAAATCCGTCGACTTTAGAAATCGTGAGGGTT
CA

```

Πίνακας 24. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 9 στην χλωροπλαστική περιοχή trnL

Περιγραφή	Max Score	E – value	Per Ident	Accession length	Accession
<i>Dracunculus vulgaris</i>	1018	0,0	95,04 %	695	GU067639.1
<i>Dracunculus canariensis</i>	966	0,0	94,21 %	636	AY249001.1
<i>Arum sintenisii</i>	955	0,0	92,99 %	713	GU067638.1

Αλληλουχία Δείγματος 9 του πυρηνικού γονιδιώματος ITS2 σε μορφή fasta

>20230308FS8P1_G08_2023-03-15.ab1

ACGCAGTTGCGCCCGAGGCCACTAGGTCGAGGGCACGCCTGCCTGGGCGTCACA
 CCCC GCGTCGCTCCCCGACCTCCCGTACCCACCCCCCTCACAAGGGGACATGTGC
 GTGTGGGACGAGGGATGCGGAGATTGGCCACCGTGCAACAGCACGGCGGGCTG
 AARAAC TCGGCCCTCCCGCCGGGCGACTAACGGCGAGTGGTGGACAACGCTCAT
 CGTCGCCGTGGCGCACGCCCCGCGCACAAGGATGGATCGAATGTGAGGAACCCAA
 TCATCRAAAAGTACTTCCATATCTAAGGTAAGGCCGCTCTTCAACTGCGACCCCG
 GGTCAGGCGGGATCACCCGCCGAGTTTAAGCATATAAATAAGCGGAGGAAAAAA
 AACTTACGAGGATTCCCCTAGTAACGGCGAGCGAACC GGGAACAGCCCAGCTTG
 AGAATCGGGGAGCCACGCCCTCC

Πίνακας 25. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 9 στο πυρηνικό γονιδίωμα ITS2

Περιγραφή	Max Score	E – value	Per Ident	Accession length	Accession
<i>Dracunculus vulgaris</i>	608	3e - 169	95,48 %	839	GU067564.1
<i>Arum maculatum</i>	523	1e - 143	91,58 %	847	GU067558.1

<i>Pinellia ternata</i>	387	1e - 102	83,56 %	413	MZ779160.1
<i>Arisaema yamatense</i>	383	2e - 101	83,04 %	868	LC704925.1

Αλληλουχία Δείγματος 10 της χλωροπλαστικής περιοχής trnL σε μορφή fasta

>20221102BS10P1_B10_2022-11-08.ab1

CTTTTAGGCCTGGATGGACCTGCTAAGTGATAACTTTCAAATTCAGAGAAACCCA
GGAACATAATAAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTGTTTTCTCAAAACAAAG
ATTCAAAAAACGAAAAAAGGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTATTCTAA
CAAATGGAGTTCCTGCGCTGGTAGAAGAAATCTTTCCATGGAAACTTCAGAAA
GGATGAAGGATAAATGGATCTATTGAATACTATATCGAATGATTCACGATGGCCC
GAATCTGTATTTTTTAATATGAAAAATGGAAGAATTGGTGTGAATTGATTCCACA
TTGAAGAAAAAATCGAATATTCATTCATCAAATCATTCACTCCATAGTCCGATAG
ATCTTTTCAAGAACTGATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCCGTTCTACA
TGTCATATACCGGCAACAATGAAATTTATAGTAATAGGAAAAATCCGTCGACTTTAA
AAATCGTGAGGGTTCA

Πίνακας 26. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 10 στην χλωροπλαστική περιοχή trnL

Περιγραφή	Max Score	E – value	Per Ident	Accession length	Accession
<i>Ajuga genevensis</i>	894	0,0	99,59 %	531	KY697455.1
<i>Ajuga reptans</i>	889	0,0	98,61 %	149963	NC023102.1
<i>Ajuga lupulina</i>	883	0,0	99,19 %	150534	MN814856.1
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	883	0,0	99,19 %	832	MT682087.1

Αλληλουχία Δείγματος 10 του πυρηνικού γονιδιώματος ITS2 σε μορφή fasta

>20230308FS9P1_H08_2023-03-15.ab1

ACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCGTYAGGCCGAGGGCACGTCTGSCTGGGCGTCAC
GCATCGCGTCGCCCCCCTCCAGCGCTTCGGTGCTCGTGTGGGGGCGGAGAATGGC
CTCCCGTGCGCTACGGCGTGCGGCTGGTTAAATGCGTTCCCCCGGCAACGCACGT
CGCGACCAGTGGTGGTTGATCATCAACTCGCGTGCTGTCGGGACTATAGGTGTTG
TCCGTGTGGGGAACAACGTTTTCACGTATTTGTTTTTCACTTTTCCTCTTTTGCCCA
AGTCATCTGCTTTTTCATGGA

Πίνακας 27. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 10 στο πυρηνικό γονιδίωμα ITS2

Περιγραφή	Max Score	E – value	Per Ident	Accession length	Accession
<i>Ajuga reptans</i>	361	5e - 95	94,07 %	349	MF349129.1
<i>Ajuga sp.</i>	361	5e - 95	94,07 %	692	KJ578648.1
<i>Vitex rotundifolia</i>	243	2e - 59	88,04 %	334	MG822460.1

Αλληλουχία Δείγματος 11 της χλωροπλαστικής περιοχής trnL σε μορφή fasta

>20221102BS11P1_C10_2022-11-08.ab1

CCTACTAAGTGATAACTTTCAAATTCAGAGAAACCCTGGAATAAAAGAGGGGCA
ATCCTGAGCCAAATCCTTTTTTACGAAAATAAAGAGGGGCTCACAAAGCGAGAA
TAGAAAAAAAGGACAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAAAAAAATGG
AGTCGGTTGCATTACATTGATAAAGGAAGCCTTCTTTCGAACCTTCAGAAAGGGA
GAGGGTAAACCTATATATACGTACTGAAAAATTGCTTCAAATGATTAATGAGAA
CCCGAGTACGTATATATGGAATAATTTATATATAAGAATCGATATAGTCATTGATC
AAATCATTGACCCTAGAGTCTGATGGATCTTTTGAATCACTGATTAATCAGACGA
GAATAAAGAGAGAGTCCTGTTTTACATGTCAATAACGGCAACAATGCAATTTATA
GTAAGAGGAAAATCCGTCGATGTTAAAAGTCGTGAGGGTTCAA

Πίνακας 28. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 11 στην χλωροπλαστική περιοχή *trnL*

Περιγραφή	Max Score	E – value	Per Ident	Accession length	Accession
<i>Geranium robertianum</i>	876	0,0	99,79 %	876	LC143858.1
<i>Geranium palmatum</i>	876	0,0	99,76 %	155794	NC014573.1
<i>Geranium maderense</i>	870	0,0	99,58 %	155694	KT760576.1
<i>Geranium purpureum</i>	870	0,0	99,58 %	553	ON684526.1

Αλληλουχία Δείγματος 11 του πυρηνικού γονιδιώματος ITS2 σε μορφή fasta

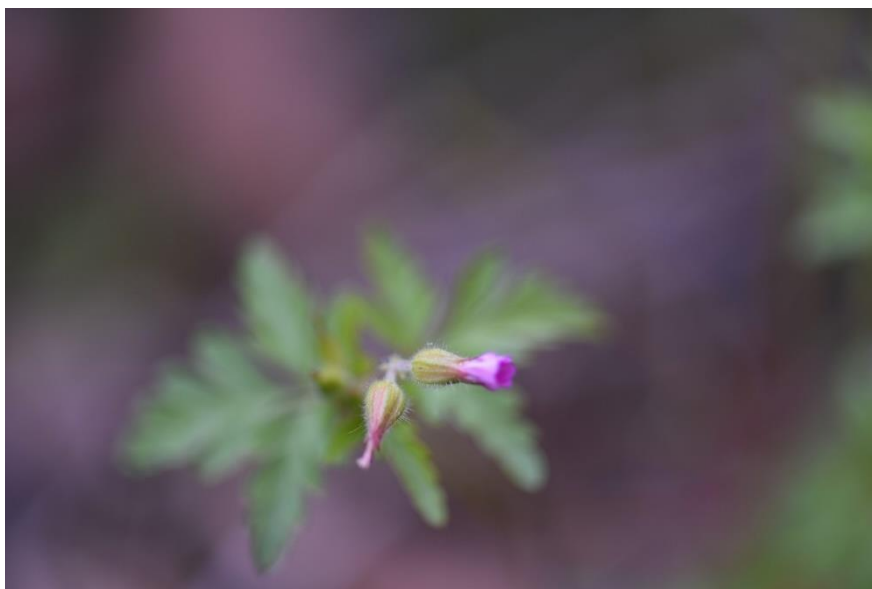
>20230308FS10P1_G09_2023-03-15.ab1

GAGTCTTTGACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGCCTGCCT
GGGCGTCACGCGCTCCGTGCGCCCGCAACCCCAAACCCCGAAACGGGCCAGGGA
TCATGCGGTGCGGAGATTGGTCTCCCGTGCGCGAGAGCTCGCGGTTGGCCTAAA
ATCGAGTCCCGGGCGCTCTGTTATGCGGCCGACGGTGGTTGAGAAGCCCTCGGA
AATGTGCCGATGACAGGTCGCTCACTGCGGACCACACGACCCTTGCGCGACTTCT
CCTCTCGGGGAGGATGAGCTCTTACTGCGACCCCAGGTCAGGCGGGATTACCCG
CTGAATTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTTACAAGGATTCCCCT
AGTAACGGCGAGCGAACCGGGAAGAGCCCAGCTTGAAAATCGGGCGCCCTTGGC
GTTCTGAATTGTAGTCTG

Πίνακας 29. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 11 στο πυρηνικό γονιδίωμα ITS2

Περιγραφή	Max Score	E – value	Per Ident	Accession length	Accession
<i>Geranium purpureum</i>	826	0,0	99,78 %	3712	ON685325.1

<i>Geranium robertianum</i>	806	0,0	99,77 %	462	OL434515.1
<i>Ipomoea concanica</i>	721	0,0	99,00 %	413	MN825069.1



Εικόνα 22. Δείγμα 11, Geranium robertianum, Geraniaceae

Αλληλουχία Δείγματος 12 της χλωροπλαστικής περιοχής trnL σε μορφή fasta

>20221102BS12P1_D10_2022-11-08.ab1

```
CTACTAAGTGATAACTTTCAAATTCAGAGAAACCCCGGAATTAATAAAAATGGG
CGATCCTGATCCAAATCCTGTTTTTTCAAAACAAAGGTTCAAAAAACGAAATAAA
GGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAGTTGACTGCGT
TGGTAGAGGAATCCTTTTCTACGGAACTTCAGAAAGGATAACCGTATCTATCGA
ATACTATATCAAATGATTAATGATGGCCCGAATTCGTATTTTTTAATATGAAAAA
TAGACGAATTGGTGTGAATTTATTCTCTATTGAAGAAAAAATAGAATATTCATTC
ATCAAAGCATTCACTCCATAGTCCGATAGATCTTTTAAAGAACTGATTAATCGGA
CGAGAATAAAGATAGAGTCCCATTCTACATGTCAATACTGGCAACAATGCAATTT
ATAGTAAGAGGAAAATCCGTCGACTTTAAAAATCGTG AGGGTTCAA
```

Πίνακας 30. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 12 στην χλωροπλαστική περιοχή *trnL*

Περιγραφή	Max Score	E – value	Per Ident	Accession length	Accession
<i>Lamium garganicum subsp. striatum</i>	893	0,0	100,00 %	879	JF780002.1
<i>Lamium flexuosum</i>	876	0,0	99,38 %	877	JF779987.1
<i>Lamium orvala</i>	874	0,0	99,38 %	791	JF780025.1
<i>Lamium galeobdolon subsp. galeobdolon</i>	870	0,0	99,17 %	853	JF779994.1

Αλληλουχία Δείγματος 13 της χλωροπλαστικής περιοχής *trnL* σε μορφή fasta

>20221102BS13P1_E10_2022-11-08.ab1

TACTAAGTGACAACCTTTCAAATTCAGAGAAACCCTGGAATTAATAAAAAATGGGC
AATCCTGAGCCAAATCCGGTTTTCCGAAAACAAAAAAGTGGAATAAAAAAGA
GGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAGTTGACTGCTTT
AATCTTTCTCATAAAGTGTGAAAGTCTATACATTTTTATTGAATACTTTATCAAAT
GAAATGATTAATGACTACCAAAATAGATTCTGTTTTTATGAAAAAAAGAGTGAGT
CTTAATTGATTCTACATAGAAGAAAGAGTAGAATATTCATTGATCAAATCATTCA
CTCCATAGTCTGATAGATCTTTTGAAGAATTGATTAATCGGACGAGAATAAAGAT
AGAGTCCCGTTCTACATGTCAATACCGGCAACAATGAAATTTATAGTAAGAGGA
AAATCCGTCGACTTTAAAAATCGTGAGGGTTCAAG

Πίνακας 31. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 13 στην χλωροπλαστική περιοχή *trnL*

Περιγραφή	Max Score	E – value	Per Ident	Accession length	Accession
-----------	-----------	-----------	-----------	------------------	-----------

<i>Symphytum peregrinum</i>	863	0,0	99,58 %	885	KF288111.1
<i>Symphytum caucasicum</i>	863	0,0	99,58 %	859	KF288108.1
<i>Symphytum officinale</i>	850	0,0	99,57 %	499	MN167313.1
<i>Symphytum asperum</i>	800	0,0	97,86 %	827	MT803499.1
<i>Pentaglottis mpervirens</i>	778	0,0	96,61 %	848	GQ285250.1

Αλληλουχία Δείγματος 13 του πυρηνικού γονιδιώματος ITS2 σε μορφή fasta

>20230308FS12P1_G10_2023-03-15.ab1

GAGTCTTTGACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTAGGCTAAAGGCACGTCTGCCTG
GGCGTCACGCATCCCGTCACCTCATCCCTAATTCTCGTGGATCGGTGGAATGTGA
CCTCCTGTTCTAGTTGTGCAGTTGGTTAAACTTGAGTGTGTGGATTAGGACTTC
ACGACAAGTGGTGGTTGGATAACAACCTCTCGTCATGTCGTGTGCCGAACCTACGT
GACTTTCAACACCCTAAGGTGCAAGTTACCCTCATATTTTTTGTGGAACTTGTT
CTATGACGCGACCCAGGTCAGGCGGGATTACCCGCTGAATTTAAGCATATCAAT
AAGCGGAGGAAAAGAACTTACAAGGATTCCCTTAGTAACGGCGAGCGAACCG
GGAATAGCCCAGCTTGAGAATCGGGCGTCTTCGTCTGTGAATTGTAGTCT

Πίνακας 32. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 13 στο πυρηνικό γονιδίωμα ITS2

Περιγραφή	Max Score	E – value	Per Ident	Accession length	Accession
<i>Symphytum officinale</i>	662	0.0	94,46 %	461	KU724223.1
<i>Symphytum caucasicum</i>	551	4e - 152	95,64 %	743	KX894530.1

<i>Nonea caspica</i>	521	3e - 143	88,24 %	473	MT922918.1
----------------------	-----	----------	---------	-----	----------------------------

Αλληλουχία Δείγματος 14 της χλωροπλαστικής περιοχής trnL σε μορφή fasta

>20221102BS14P1_F10_2022-11-08.ab1

```
TGTGGGAACCTACTAAGTGATAACTTTCAAATTCAGAGAAACCCCGGAATTAAT
AAAAATGGGCGATCCTGATCCAAATCCTGTTTTTTTAAAACAAAGGTTCAAAAAA
CGAAATAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAGT
TGAATGCGTTGGTAGAGGAATCCTTTCTACGGAACTTCAGAAAGGATGAAGGA
TAAACGTATCTATCGAATACTTTATCAAATGATTAATGATGGACCGAATCCGTAT
TTTTAATATGAAAAATAGAAGAATTGGTGTGAATTGATTCTATATTGAAGAAAAA
ATCGAATATTCATTCATCAAATCATTCACTCCATAGTTCGATAGATCTTTTAAAG
AACTGATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCCATTCTACATGTCAATACT
GGCAACAATGAAATTTATAGTAAGAGGAAAATCCGTCGACTTTTAAAATCGTGA
GGGTTCAA
```

Πίνακας 33. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 14 στην χλωροπλαστική περιοχή trnL

Περιγραφή	Max Score	E – value	Per Ident	Accession length	Accession
<i>Phlomis fruticosa</i>	915	0,0	99,80 %	151639	OM731926.1
<i>Phlomis purpurea</i>	915	0,0	99,80 %	835	EU827134.1
<i>Phlomis floccosa</i>	909	0,0	99,60 %	834	EU827133.1
<i>Ballota undulata</i>	859	0,0	97,80 %	841	MH685075.1
<i>Ballota pseudodictamnus</i>	859	0,0	97,80 %	845	MH685073.1

Αλληλουχία Δείγματος 15 της χλωροπλαστικής περιοχής trnL σε μορφή fasta

>20221102BS15P1_G10_2022-11-08.ab1

TACTAAGTGATAACTTTCAAATTCAGAGAAACCCCGGAATTAATAAAAATGGGC
AATCCTGAGCCAAATCCTATTTTCCAAAAACAAACAAAGGCCCAGAAGGTGAAA
AAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAACTGGAATTGACTGT
GTTGCATTGGTAGAGGAATCCTTCCATTGAAACTTCCGAAAAGACGAAGGATAT
AGGTATTATATACATACGTATACGTACTGAAATACTCTATCAAATGATTAATGAC
GACCTTAATCTGTATTTTTATATGAAAAAGGGAAAAAATTGTTGTGAATCTATTCC
ATATTGAAGAAAGAATCGAATATTCATTTATCAAAGCATTACCCACACAGTCTGA
TAGTTCTTTTGCAGAACTAATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCCATTCT
ACATGTCAATACCGGCAACAATGCAATTTATAGTAAGAGGAAAATCCGTTGACT
TTAAAAATCGTGAGGGTTCAAG

Πίνακας 34. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 15 στην χλωροπλαστική περιοχή *trnL*

Περιγραφή	Max Score	E – value	Per Ident	Accession length	Accession
<i>Smyrniolum olusatrum</i>	946	0,0	100,00 %	153059	NC066005.1
<i>Prangos trifida</i>	887	0,0	97,86 %	153510	NC037852.1
<i>Arracacia xanthorrhiza</i>	883	0,0	97,86 %	143989	KY117235.1
<i>Ligusticum olivaceum</i>	883	0,0	97,86 %	148175	MZ532570.1

Αλληλουχία Δείγματος 15 του πυρηνικού γονιδιώματος ITS2 σε μορφή fasta

>20230308FS14P1_C12_2023-03-15.ab1

TCGAGTCTTTGACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCTCTAGGCTGAGGGCACGTCTTCC
TGGGTGTCACGCATCTTTTGGCCCTATCACACAATTCTTTTGGAGATGTGCGGAT
TTGGGGCGGATACTGGCCTCCTGTGCCCTGTGGTGCAGCTGGCGGAAAACCTGAGT
CTCTGGCGATGGACGTCATGACATCGGTGGTTCTAATATTTACCCTCTCGTATTGT
CGTGTAATGTTTGTGCGCTTAGTCAGCTCAAGGACCCTTAGGTGCCACAAATTG
TGTGCGCTTTGATTGTGACCCAGGTCAGGCGGGACTACCCGCTGAGTTTAAGCA
TATCAATAAGCGGAGGAAAAGAACTTACAAGGATTCCCCTAGTAACGGCGAGC

GAACCGGGAATAGCCCAGCTTGAAAATTGGGCGGCTACGCCGTTTGAATTGTAG
T

Πίνακας 35. Αποτελέσματα της Blast ανάλυσης για το δείγμα 15 στο πυρηνικό γονιδίωμα ITS2

Περιγραφή	Max Score	E – value	Per Ident	Accession length	Accession
<i>Smyrniolum satrum</i>	809	0,0	99,77 %	3735	ON685333.1
<i>Ferula akitschkensis</i>	573	9e - 159	90,13 %	472	KP406808.1
<i>Ligusticum thomsonii</i>	555	3e - 153	89,39 %	468	OP090088.1

Οι φωτογραφίες που συνοδεύουν τα αποτελέσματα λήφθηκαν στον Άγιο Ονούφριο κατά τη διαδικασία συλλογής φυτικού ιστού.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:

Από τα αποτελέσματα που αναφέρονται παραπάνω εξάγεται το συμπέρασμα ότι η μοριακή ταυτοποίηση αυτοφυσών βλάστησης δύναται να επιτευχθεί με την αξιοποίηση του πρωτόκολλου CTAB για την απομόνωση DNA, ενώ η πραγματοποίηση PCR με τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν αποδεικνύονται επίσης κατάλληλα. Τέλος, η ανάγνωση των αλληλουχιών με την μέθοδο Sanger επέφερε την ταυτοποίηση των φυτικών ειδών μέσω της βοήθειας του προγράμματος Blast.

Στη τρέχουσα πτυχιακή εργασία, η εξαγωγή γενετικού υλικού διεκπεραιώθηκε με επιτυχία, αν ληφθεί υπόψη πως στα 15 από τα 18 δείγματα απομονώθηκε πράγματι DNA μέσω της μεθόδου CTAB. Φυσικά, δεν μπορεί να παραληφθεί η διαφορά στην λειοτρίβιση που παρουσίασαν οι φυτικοί ιστοί μεταξύ τους. Το γεγονός αυτό, αποδίδεται στην φύση των δειγμάτων, καθώς όλα ανήκουν σε διαφορετικά είδη και επομένως κάτι τέτοιο είναι αναμενόμενο. Μάλιστα, κάποια θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ελάχιστα, ενώ άλλα πλήρως λειοτριβημένα. Σε αυτές τις περιπτώσεις το υγρό άζωτο θεωρείται ένα πιο αποτελεσματικό μέσο ομογενοποίησης των φυτικών ιστών. Εν συνεχεία, τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης, αποδείχθηκαν επίσης αποτελεσματικά. Ύστερα από σύγκριση με τον ladder κατόπιν της Ηλεκτροφόρησης, τα προϊόντα της PCR με

το ζεύγος εκκινητών trnL κυμαίνονταν στα 500 bp, όπως και με το ζεύγος ITS2. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη ότι ο ITS2 στοχεύει στο πυρηνικό γονιδίωμα, εξηγείται και το γεγονός ότι σε κάποια από τα δείγματα έχουν σχηματιστεί περισσότερες από μία ζώνες. Η επιτυχία των εκκινητών ευρείας εφαρμογής στο συγκεκριμένο πείραμα δεν απαιτεί την αξιοποίηση πιο εξειδικευμένων εκκινητών, παρόλο που τα δείγματα ήταν πολλά και διαφορετικά μεταξύ τους. Επιπρόσθετα, μέσω της αλληλούχησης με τη μέθοδο Sanger και τη χρήση του προγράμματος Blast, επετεύχθη η μοριακή ταυτοποίηση των ειδών. Παρατηρήθηκε, βέβαια, πως με τα δείγματα 1, 7, 8, 12 και 14 ο ITS2 εκκινητής δεν λειτούργησε επιτυχώς, καθώς οι αλληλουχίες που επιστράφηκαν ήταν κομμένες χωρίς να είναι ξεκάθαρη η αντιστοιχία των βάσεων. Σε αδρές γραμμές, τα αποτελέσματα αυτά δεν ενδεικνύονταν για αναγνώριση μέσω του Blast. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τα υπόλοιπα δείγματα από την αλληλούχιση και με τους δύο εκκινητές είναι σε συμφωνία, ο πίνακας 36 παρουσιάζει τα τελικά αποτελέσματα μοριακής ταυτοποίησης των φυτών που συλλέχτηκαν:

Πίνακας 36. Τελικά αποτελέσματα μοριακής ταυτοποίησης.

	Περιγραφή	Max Score	E –value	Per Ident	Accession length	Accession
Δείγμα 1	<i>Anemone hortensis</i>	904	0,0	100,00 %	158965	NC066445 .1
Δείγμα 2	<i>Bellis perennis</i>	758	0,0	100,00%	441	LC387723 .1
Δείγμα 3	<i>Orchis purpurea</i>	732	0,0	96,40 %	5606	MT784087 .1
Δείγμα 4	<i>Orchis anthropophora</i>	741	0,0	89,91 %	638	KY697445 .1
Δείγμα 5	<i>Ranunculus bulbosus</i>	896	0,0	99,39 %	541	KY697496 .1
Δείγμα 6	<i>Securigera varia</i>	915	0,0	95,53 %	154257	NC054256 .1
Δείγμα 7	<i>Phlomis fruticosa</i>	933	0,0	99,61 %	151639	OM73192 6.1
Δείγμα 8	<i>Carex flacca</i>	1188	0,0	99,85 %	1033	DQ998968 .1

Δείγμα 9	<i>Dracunculus vulgaris</i>	1018	0,0	95,04 %	695	GU067639 .1
Δείγμα 10	<i>Ajuga reptans</i>	889	0,0	98,61 %	149963	NC023102 .1
Δείγμα 11	<i>Geranium robertianum</i>	876	0,0	99,79 %	876	LC143858 .1
Δείγμα 12	<i>Lamium garganicum subsp. striatum</i>	893	0,0	100,00 %	879	JF780002. 1
Δείγμα 13	<i>Symphytum officinale</i>	850	0,0	99,57 %	499	MN16731 3.1
Δείγμα 14	<i>Phlomis fruticosa</i>	915	0,0	99,80 %	151639	OM73192 6.1
Δείγμα 15	<i>Smyrniolum olusatrum</i>	946	0,0	100,00 %	153059	NC066005 .1

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5.1. ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

1. Abdel-Latif A, Osman G. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize. *Plant Methods*. 2017 Jan 3;13:1. doi: 10.1186/s13007-016-0152-4. PMID: 28053646; PMCID: PMC5209869.
2. Aboul-Maaty, N.AF., Oraby, H.AS. Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. *Bull Natl Res Cent* 43, 25 (2019). <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0066-1>
3. Ansorge, W. J. (2009). Next-generation DNA sequencing techniques. *New biotechnology*, 25(4), 195-203.
4. Bleich HL, Schwartz WB. Tris buffer (THAM). An appraisal of its physiologic effects and clinical usefulness. *N Engl J Med*. 1966 Apr 7;274(14):782-7. doi: 10.1056/NEJM196604072741407. PMID: 17926886.
5. CBOL Plant Working Group 1, Hollingsworth, P. M., Forrest, L. L., Spouge, J. L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., ... & Little, D. P. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), 12794-12797.

6. Chen S, Yao H, Han J, Liu C, Song J, Shi L, et al. (2010) Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. PLoS ONE 5(1): e8613. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008613>
7. Clark, W., & Christopher, K. (2000). An Introduction to DNA: Spectrophotometry, degradation, and the 'Frankengel' experiment. *Tested studies for laboratory teaching*, 22, 81-99.
8. Cosgrove, D. Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 850–861 (2005). <https://doi.org/10.1038/nrm1746>
9. de Vere, N., Rich, T. C., Trinder, S. A., & Long, C. (2015). DNA barcoding for plants. *Plant Genotyping: Methods and Protocols*, 101-118.
10. Fang G, Hammar S, Grumet R. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biotechniques*. 1992 Jul;13(1):52-4, 56. PMID: 1503775.
11. Gauthier, M. G. (2007). Simulation of polymer translocation through small channels.
12. Gharizadeh, B., Ghaderi, M., & Nyrén, P. (2007). Pyrosequencing technology for short DNA sequencing and whole genome sequencing 47(2), 129-132.
13. González-Morales D, Valencia A, Díaz-Nuñez A, Fuentes-Estrada M, López-Santos O, García-Beltrán O. Development of a Low-Cost UV-Vis Spectrophotometer and Its Application for the Detection of Mercuric Ions Assisted by Chemosensors. *Sensors (Basel)*. 2020 Feb 8;20(3):906. doi: 10.3390/s20030906. PMID: 32046240; PMCID: PMC7038951.
14. Green MR, Sambrook J. Precipitation of DNA with Isopropanol. *Cold Spring Harb Protoc*. 2017 Aug 1;2017(8):pdb.prot093385. doi: 10.1101/pdb.prot093385. PMID: 28765297.
15. Gupta N. DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *J Cytol*. 2019 Apr-Jun;36(2):116-117. doi: 10.4103/JOC.JOC_110_18. PMID: 30992648; PMCID: PMC6425773.
16. Hall N. Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. *J Exp Biol*. 2007 May;210(Pt 9):1518-25. doi: 10.1242/jeb.001370. PMID: 17449817.
17. Heikrujam J, Kishor R, Behari Mazumder P. The Chemistry Behind Plant DNA Isolation Protocols [Internet]. *Biochemical Analysis Tools - Methods for Bio-Molecules Studies*. IntechOpen; 2020. Available from: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.92206>

18. Jadhav KP, Ranjani RV, Senthil N. Chemistry of plant genomic DNA extraction protocol. *Bioinfolet*. 2015;12(3A):543-548
19. Jinlu Li, Shuo Wang, Jing Yu, Ling Wang, Shiliang Zhou. A Modified CTAB Protocol for Plant DNA Extraction[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2013, 48(1): 72-78.
20. J. J. Doyle and J. L. Doyle, "Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue," *Focus*, Vol. 12, No. 1, 1990, pp. 13-15.
21. Jobes, D.V., Hurley, D.L. and Thien, L.B. (1995), Plant DNA isolation: a method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides, and RNA. *TAXON*, 44: 379-386. <https://doi.org/10.2307/1223408>
22. Kadri K., (2020) Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*. IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.86491.
23. Kaunitz, J.D. The Discovery of PCR: ProCuRement of Divine Power. *Dig Dis Sci* 60, 2230–2231 (2015). <https://doi.org/10.1007/s10620-015-3747-0>
24. Konigsberg, William. "[13] Reduction of disulfide bonds in proteins with dithiothreitol." *Methods in enzymology*. Vol. 25. Academic Press, 1972. 185-188.
25. Koontz, Laura. "Agarose gel electrophoresis." *Methods Enzymol* 529 (2013): 35-45.
26. Laikre, L., Allendorf, F. W., Aroner, L. C., Baker, C. S., Gregovich, D. P., Hansen, M. M., ... & Waples, R. S. (2010). Neglect of genetic diversity in implementation of the convention of biological diversity. *Conservation Biology*, 24(1), 86-88.
27. Laikre, L. Genetic diversity is overlooked in international conservation policy implementation. *Conserv Genet* 11, 349–354 (2010). <https://doi.org/10.1007/s10592-009-0037-4>
28. Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (62), e3923.
29. Li, X., Yang, Y., Henry, R. J., Rossetto, M., Wang, Y., & Chen, S. (2015). Plant DNA barcoding: from gene to genome. *Biological Reviews*, 90(1), 157-166.
30. Lorenz TC. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp*. 2012 May 22;(63):e3998. doi: 10.3791/3998. PMID: 22664923; PMCID: PMC4846334.
31. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*. 2002 Mar 15;30(6):1292-305. doi: 10.1093/nar/30.6.1292. PMID: 11884626; PMCID: PMC101343.

32. Merget B, Koetschan C, Hackl T, Förster F, Dandekar T, Müller T, Schultz J, Wolf M. The ITS2 Database. *J Vis Exp*. 2012 Mar 12;(61):3806. doi: 10.3791/3806. PMID: 22433429; PMCID: PMC3402050.
33. Mommaerts K., Sanchez I., Betsoy F., Mathieson W., 2015. Replacing β -mercaptoethanol in RNA extractions. *Anal* 479, 51-53.
34. R. J. Slaughter, R. W. Mason, D. M. G. Beasley, J. A. Vale & L. J. Schep (2014) Isopropanol poisoning, *Clinical Toxicology*, 52:5, 470-478, DOI: 10.3109/15563650.2014.914527
35. Roberts, Gordon CK, et al. "The mechanism of action of ribonuclease." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 62.4 (1969): 1151-1158.
36. Sahu, Sunil Kumar, Muthusamy Thangaraj, and Kandasamy Kathiresan. "DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol." *International Scholarly Research Notices* 2012 (2012).
37. Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.
38. Shendure, J., Ji, H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* **26**, 1135–1145 (2008). <https://doi.org/10.1038/nbt1486>
39. Sonagra AD, Dholariya SJ. Electrophoresis. [Updated 2022 Aug 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK585057/>
40. Swingland, I. R. (2001). Biodiversity, definition of. *Encyclopedia of biodiversity*, 1, 377-391.
41. Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, Gielly L, Miquel C, Valentini A, Vermat T, Corthier G, Brochmann C, Willerslev E. Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(3):e14. doi: 10.1093/nar/gkl938. Epub 2006 Dec 14. PMID: 17169982; PMCID: PMC1807943.
42. Trumbo T.A., Schultz E., Borland M.G., Pugh M.E. Applied spectrophotometry: analysis of a biochemical mixture. *Biochem Mol Biol Educ*. 2013 Jul-Aug;41(4):242-50. doi: 10.1002/bmb.20694. Epub 2013 Apr 27. PMID: 23625877.
43. Varma A., Padh H., Shrivastava N. Plant genomic DNA isolation: an art or a science. *Biotechnol J*. 2007 Mar;2(3):386-92. doi: 10.1002/biot.200600195. PMID: 17285676.

44. Vinod, K. K. "Total genomic DNA extraction, quality check and quantitation." *Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore* (2004): 109-121.
45. Voytas, Daniel. "Agarose gel electrophoresis." *Current protocols in molecular biology* 51.1 (2000): 2-5.
46. Watts, Peter, G. Lon 1503775 g, and M. E. Meek. Chloroform. No. 58. World Health Organization, 2004.
47. Yu N, Wei YL, Zhang X, Zhu N, Wang YL, Zhu Y, Zhang HP, Li FM, Yang L, Sun JQ, Sun AD. Barcode ITS2: a useful tool for identifying *Trachelospermum jasminoides* and a good monitor for medicine market. *Sci Rep.* 2017 Jul 11;7(1):5037. doi: 10.1038/s41598-017-04674-w. PMID: 28698616; PMCID: PMC5506054.
48. Zhao LL, Feng SJ, Tian JY, Wei AZ, Yang TX. Internal transcribed spacer 2 (ITS2) barcodes: A useful tool for identifying Chinese *Zanthoxylum*. *Appl Plant Sci.* 2018 Jun 15;6(6): e01157. doi: 10.1002/aps3.1157. PMID: 30131899; PMCID: PMC6025816.

5.2. ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

1. Διαμαντίδης Γ., 2017. *Εισαγωγή στη Βιοχημεία*. University Studio Press, Θεσσαλονίκη.
2. Primack R.B., Αριανούτσου Μ., Δημητρακόπουλος Π., 2012. *Βιολογία της Διατήρησης*. University Studio Press, Θεσσαλονίκη.

5.3. ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ:

1. <https://ibol.org/about/dna-barcoding/>
2. <https://www.cbd.int/intro/>

5.4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΕΙΚΟΝΩΝ:

1. Drabik A., Bodzon-Kulakowska A., Silberring J., 6 - Gel Electrophoresis, Proteomic Profiling and Analytical Chemistry (2013), Pages 107-133, ISBN 9780444593788, <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59378-8.000062>
2. Garibyan L, Avashia N. Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol.* 2013 Mar;133(3):1-4. doi: 10.1038/jid.2013.1. PMID: 23399825; PMCID: PMC4102308.
3. Gauthier, M. G. (2007). Simulation of polymer translocation through small channels.
4. Jadhav KP, Ranjani RV, Senthil N. Chemistry of plant genomic DNA extraction protocol. *Bioinfolet.* 2015;12(3A):543-548