



Peran *Mini-Barcode Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)* untuk Identifikasi Molekuler Spesies Anggrek

Mukhamad Su'udi*, Zakiyah Ramadany, Siti Rohimah, Asyifa Yasmin Arum, Dwi Setyati, Fuad Bahrul Ulum

¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember

*Corresponding Author: msuudi52@gmail.com

ABSTRACT

Molecular identification using short orthologous DNA sequences (DNA barcoding) has been applied for the classification of orchid species which is a major step in biodiversity management, conservation, breeding, authenticating components of herbal products, and tracking the adulteration of orchid species. One of the most widely used loci for phylogenetic inference at the generic and infrageneric levels in plants was ITS located between 18S rDNA, 5.8S rDNA, and 26S rDNA. The ITS or ITS2 region has been suggested as a plant barcode in some previous studies. However, DNA barcoding using the entire ITS genome is considered less effective and efficient in the process of PCR amplification and sequencing. Besides, complete DNA barcodes are difficult to obtain from herbarium samples and herbal products because some DNA sequences have been degraded. DNA mini-barcode were developed over the past ten years to overcome issues related to DNA barcoding. DNA mini-barcode use shorter DNA segments for PCR amplification, so they can identify species effectively and efficiently compared to the regular DNA barcoding. Specific primers that encode the ITS1 and ITS2 regions need to be designed for the PCR amplification. DNA mini-barcoding ITS has proven useful in species identification, classification studies, and authentication of specific orchid species. Therefore, a new rapid identification method based on the ITS mini-barcode is expected to be established, especially for orchid species.

Keywords: DNA mini-barcode, Internal Transcribed Spacer, Orchid, Primer Design

Abstrak

Identifikasi molekuler menggunakan sekuens DNA ortolog pendek (DNA *barcoding*) telah diaplikasikan untuk klasifikasi spesies anggrek yang merupakan langkah utama dalam pengelolaan keanekaragaman hayati, konservasi, pemuliaan, autentikasi komponen produk herbal alami, dan mendeteksi pemalsuan spesies anggrek. Salah satu lokus yang paling banyak digunakan untuk inferensi filogenetik pada tingkat generik dan infragenerik pada tanaman adalah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) yang terletak di antara 18S rDNA, 5.8S rDNA dan 26S rDNA. Wilayah ITS atau ITS2 telah disarankan sebagai *barcode* tumbuhan dalam beberapa penelitian sebelumnya. Namun, DNA *barcoding* menggunakan keseluruhan genom ITS dianggap kurang efektif dan efisien dalam proses amplifikasi PCR dan *sequencing*. Selain itu, *barcode* DNA lengkap sulit didapatkan dari sampel herbarium dan produk herbal alami dikarenakan beberapa sekuens DNA telah terdegradasi. *mini-barcode* DNA kemudian dikembangkan selama sepuluh tahun terakhir untuk membantu mengatasi permasalahan yang terkait dengan *barcoding* DNA. *Mini-barcode* DNA menggunakan segmen DNA yang lebih pendek untuk amplifikasi PCR, sehingga dapat mengidentifikasi spesies secara efektif dan efisien dibandingkan *barcode* DNA pada umumnya. Primer spesifik yang mengkode wilayah ITS1 dan ITS2 perlu dirancang untuk proses amplifikasi DNA menggunakan PCR. *mini-barcoding* DNA ITS telah terbukti bermanfaat dalam identifikasi spesies, studi klasifikasi dan autentikasi spesies anggrek spesifik. Oleh karena itu, metode identifikasi cepat baru berdasarkan *mini-barcode* ITS diharapkan akan ditetapkan, terutama untuk spesies anggrek.

Kata Kunci : Anggrek, Desain Primer, DNA *mini-barcode*, *Internal Transcribed Spacer*

PENDAHULUAN

Identifikasi molekuler pada spesies anggrek telah banyak dilakukan dan diteliti untuk autentikasi spesies maupun solusi apabila identifikasi konvensional tidak dapat dilakukan karena beberapa kondisi seperti ketidaklengkapan organ pada tumbuhan, keterbatasan ketersediaan ahli botani, kurangnya data, referensi, dan lain-lain. Salah satu teknik identifikasi molekuler spesies anggrek yang banyak digunakan dalam beberapa tahun terakhir adalah *barcoding* DNA (1). *Barcoding* DNA merupakan teknik identifikasi molekuler menggunakan sekuen DNA standar sebagai penanda dalam identifikasi spesies (2). *Barcoding* DNA juga diaplikasikan dalam observasi biodiversitas (3), penilaian dampak konservasi (4), dan pemantauan perdagangan ilegal (5). *barcoding* DNA juga telah diaplikasikan pada beberapa spesies anggrek obat, anggrek langka, serta anggrek hibrida yang terancam punah karena meningkatnya perdagangan ilegal serta pemalsuan produk olahan dari anggrek (batang, bunga, daun, pseudobulb, umbi, dan lain-lain) (6,7).

Penanda molekuler DNA banyak digunakan untuk mengidentifikasi spesies secara akurat dan cepat dibandingkan makromolekul lainnya seperti RNA dan protein karena stabilitasnya yang lebih tinggi. Locus *barcode* yang ideal harus bersifat universal, memiliki variasi sekuen DNA yang dapat diamplifikasi menggunakan pasangan primer dan bersifat diskriminatif untuk membedakan secara jelas di antara spesies tumbuhan yang memiliki kekerabatan dekat serta menemukan spesies kriptik baru (8,9). Penanda molekuler dengan daya diskriminatif yang efisien harus menunjukkan variabilitas inter- dan intra-spesifik yang tinggi (referensi?). Perbedaan antara jarak inter- dan intra-spesifik ini dikenal sebagai *DNA barcoding gap* (10). *The Consortium for the Barcode of Life* (CBOL) merekomendasikan *barcode* DNA dari kombinasi dua lokus yaitu *matK+rbcL* untuk *barcode* tumbuhan, meskipun tingkat keberhasilan diskriminasi spesies menggunakan kombinasi ini terbatas hingga 72% (9). Wilayah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) yang berada dalam lokus DNA ribosom inti sel (*nuclear ribosomal DNA*, *nrDNA*) juga direkomendasikan sebagai *barcode* DNA tumbuhan berbunga (11), termasuk anggrek (12,13).

Chattopadhyay *et al.*, (2017) telah mengevaluasi resolusi spesies dari empat wilayah *barcode* DNA menggunakan metode *neighbor-joining* (NJ). Hasil menunjukkan bahwa tingkat diskriminasi dari lokus *matK+rbcL* lebih rendah dibandingkan dengan lokus ITS. Oleh karena itu, rekomendasi CBOL untuk *barcode matK+rbcL* sebagai *barcode* universal tumbuhan darat masih perlu dipertimbangkan lagi karena tidak dapat memisahkan spesies secara tepat, terutama untuk spesies anggrek. Berdasarkan hasil studi oleh Singh *et al.*, (2012), *barcode matK+rbcL* tidak dapat digunakan dalam analisis spesies dalam genus yang sama. *barcoding* DNA juga memiliki beberapa kekurangan dalam mengidentifikasi sampel herbarium anggrek maupun yang telah diolah menjadi produk herbal (13,16).

Barcode DNA ITS yang lengkap sulit untuk didapatkan dari sampel kering, herbarium, dan produk herbal alami karena degradasi DNA (17). Penelitian-penelitian sebelumnya terfokus pada tingkat degradasi jaringan tanaman yang mengalami berbagai jenis pengolahan (6,18–20). Hasil dari penelitian tersebut menunjukkan bahwa keberhasilan amplifikasi PCR sangat meningkat dengan penurunan ukuran amplicon. Ukuran amplicon yang pendek dapat meningkatkan efektivitas dan efisiensi amplifikasi PCR dan sekuensing. Hal ini mendorong penelitian selanjutnya dalam mengembangkan *mini-barcode* DNA yang dapat digunakan sebagai pengganti *full-length barcode* (21). Riset mengenai *mini-barcode* ITS dari wilayah ITS1 atau ITS2 juga telah dikembangkan. Berbagai primer spesifik telah didesain khusus untuk masing-masing wilayah (ITS1 dan ITS2) untuk DNA *mini-barcoding* pada sampel tumbuhan anggrek segar, herbarium, maupun produk herbal alami (6,22,23).

METODE PENELITIAN

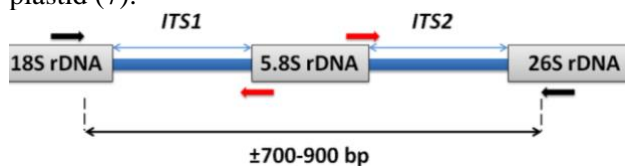
Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode telaah atau ulasan ilmiah. Penulisan dilakukan dengan mengkaji berbagai sumber literatur, yaitu jurnal/artikel ilmiah dan buku terkait *Internal Transcribed Spacer* (ITS) yang terfokus pada ITS2 yang memiliki potensi dalam *mini-barcoding* DNA. Informasi tersebut dikoleksi dengan menggunakan kata kunci *Internal Transcribed Spacer* (ITS), *Internal Transcribed*

Spacer 2 (ITS2), DNA *mini-barcoding*, dan desain primer.

HASIL PENELITIAN

Internal Transcribed Spacer (ITS)

nrDNA terdiri dari tiga subunit (18S, 5.8S, dan 26S) pengode ribosom subunit besar dan subunit kecil yang dipisahkan oleh ITS1 dan ITS2 (Gambar 1) (24). Tingkat mutasi pada sekuen ITS1 dan ITS2 jauh lebih tinggi dibandingkan dengan gen rDNA 18S, 5.8S, dan 26S dengan variasi sekuen antar spesies yang memadai dalam rekonstruksi pohon filogenetik secara keseluruhan (14). Selain itu, sekuen pada wilayah 5.8S yang terdapat di antara ITS1 dan ITS2 bersifat konservatif dan berguna dalam perancangan serta pengembangan sekuen primer yang dapat membagi kedua lokus ITS (25). Sekuen ITS dapat memberikan lebih banyak informasi yang berhubungan dengan pewarisan biparental dalam merekonstruksi pohon filogenetik dibandingkan sekuen pada lokus kloroplas atau plastid (7).



Keterangan:

- : Wilayah Konservatif : Primer Universal
 : Wilayah Variabel : Primer Spesies Spesifik

Gambar 1. Diagram skematis wilayah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) antara 18S rDNA dan 26S rDNA yang mencakup ITS1, ITS2, dan 5.8S rDNA

Kress *et al.*, (2005) telah menguji sekuen ITS sebagai *barcode* DNA tumbuhan berbunga pada tingkat spesies dan menunjukkan bahwa ITS memiliki nilai divergensi yang jauh lebih tinggi dibandingkan wilayah plastid serta memiliki tingkat keberhasilan amplifikasi sebesar 88%. Oleh karena itu, lokus ITS berpotensi sebagai *barcode* DNA pada tumbuhan berbunga. Sekuen ITS dari *nrDNA* juga terbukti efektif sebagai *barcode* DNA dalam beberapa hasil penelitian DNA *barcoding* pada spesies anggrek (15,26). Sekuen ITS sebagai *barcode* DNA yang digunakan dalam penelitian oleh Morrison *et al.*, (2005) terbukti dapat mengidentifikasi dan membedakan antara genus *Paphiopedilum*, *Phragmipedium*, dan *Cypripedioid*.

Pada tingkat spesies, hasil rekonstruksi filogenetik dari sekuen *nrDNA* (18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S) dari 65 spesies anggrek yang diteliti oleh Chattopadhyay *et al.*, (2017) menunjukkan resolusi spesies tertinggi dibandingkan hasil dengan lokus *rbcL* dan *matK*. Guo *et al.*, (2016) telah menguji delapan *barcode* kloroplas dan ITS untuk mengidentifikasi 77 spesies *Paphiopedilum*. Hasil rekonstruksi filogenetik menunjukkan bahwa ITS adalah *barcode* lokus tunggal yang paling efisien dan dapat mengidentifikasi spesies *Paphiopedilum* dengan benar. Identifikasi molekuler menggunakan sekuen ITS dari ribosom inti juga mengungkapkan empat unit genetik dalam kompleks *Grammatophyllum speciosum*. Investigasi karakter morfologis mendukung status spesies masing-masing unit yang kemudian diakui pada tingkat spesies sebagai *G. speciosum* Blume, *G. wallisii* Rchb.f., *G. kinabaluense* Ames & C. Schweinf, *G. pantherinum* Rchb.f., dan *G. cominsii* Rolfe (28).

Sekuens nukleotida spesifik dari lokus ITS digunakan untuk identifikasi dan rekonstruksi pohon filogenetik dari 20 spesies *Dendrobium*, dimana wilayah ITS1 dan ITS2 menunjukkan variabilitas yang lebih tinggi dari pada rDNA 5.8S (29). Singh *et al.*, (2012) menjelaskan bahwa ITS efektif dalam *barcoding* DNA anggrek *Dendrobium*, dengan resolusi spesies 100% berdasarkan 129 spesies *Dendrobium*, dan 93% berdasarkan sekuen DNA dari sampel dengan *Genbank*. Resolusi *barcode* ITS tunggal ini lebih tinggi daripada *barcode* tunggal menggunakan *matK*, *rbcL*, *rpoB*, dan *rpoC1*, serta kombinasi *barcode matK+rbcL* dan *matK+rpoB+rpoC1*. *Barcode* ITS telah diaplikasikan dalam identifikasi dan analisis hubungan filogenetik komponen produk herbal dari spesies anggrek obat *Dendrobium spp.*, serta membedakan 11 spesies anggrek obat *Dendrobium spp.* Tersebut antar satu sama lain dandari dua spesies lain yang dipalsukan, yaitu *Pholidota articulata* dan *Flickingeria comate* (20). Inti dari keseluruhan hasil evaluasi DNA *barcoding* ITS pada spesies anggrek menunjukkan bahwa ITS layak dijadikan sebagai *barcode* DNA spesies anggrek dan telah direkomendasikan oleh berbagai peneliti selama lebih dari 10 tahun terakhir (Berikan sitasi-sitasi referensinya). Namun, primer universal yang digunakan untuk DNA *barcoding* ITS tumbuhan anggrek selama ini (17SE dan 26SE) dianggap masih memiliki beberapa kekurangan dalam efektivitas dan efisiensi waktu serta biaya yang digunakan dalam

proses amplifikasi dan sekuensing DNA, dikarenakan produk PCR yang dihasilkan tergolong panjang (>600 bp). Selain itu, DNA *barcoding* kurang efektif jika digunakan untuk mengidentifikasi bahan tumbuhan yang terkandung dalam produk herbal alami serta spesimen herbarium, karena sebagian besar DNA telah terdegradasi sehingga sulit untuk mengamplifikasi sekuens barcode DNA yang lengkap dari template DNA tersebut (2,17,21). Oleh karena itu, *mini-barcoding* DNA yang menggunakan fragmen DNA yang lebih pendek dikembangkan sebagai solusi untuk mengatasi permasalahan tersebut.

Mini-Barcoding DNA

Mini-barcoding DNA tumbuhan telah dikembangkan selama 10 tahun terakhir sebagai metode baru dalam identifikasi taksa tertentu dari sampel segar, specimen herbarium, maupun produk herbal. DNA *mini-barcoding* menggunakan segmen DNA yang lebih pendek untuk amplifikasi PCR dan dapat diterapkan untuk mengidentifikasi spesies dengan cepat (1,2,16,17,30,31). Analisis *Mini-barcode* DNA sangat ekonomis, hanya membutuhkan sekitar \$ 11-13 per sampel. Ini 20 kali lebih murah daripada barcode seluruh genom yang biayanya mencapai \$ 200 per sampel. Teknis analisis *mini barcoding* DNA jauh lebih sederhana dibandingkan dengan *barcoding* keseluruhan genom yang memerlukan waktu yang signifikan panjang dalam proses sekuensing dan komputasi performa tinggi untuk mengelola keseluruhan data genom yang besar (32). Kekurangan DNA *barcode* lainnya telah ditunjukkan dalam beberapa penelitian (18,33). *Mini-barcode* DNA dapat membantu mengatasi kesulitan dan kekurangan dari DNA *barcoding*.

Mini-barcode memiliki sekuens yang lebih beragam dibandingkan DNA *barcode*, sehingga mampu membedakan spesies spesifik. Berdasarkan primer yang dirancang khusus, *mini-barcode* dapat secara akurat mengidentifikasi spesies yang ditargetkan. DNA *barcoding* dapat mengidentifikasi berbagai spesies, tetapi tidak akurat untuk spesies tertentu dalam campuran aneka komponen pada produk herbal. Selain itu, universalitas *barcode* dapat mengurangi keakuratan identifikasi spesies karena beberapa spesies yang berkaitan erat tidak dapat dibedakan. Penting untuk mengetahui batasan universalitas PCR dan diskriminasi taksonomi untuk *mini-barcode*, khususnya ketika sampel terdiri dari beberapa spesies (17).

Sekuen DNA yang sesuai untuk *mini-barcode* perlu dikoleksi dan diseleksi dalam pengembangan *mini-barcode* DNA. Fragmen yang spesifik dan konservatif secara intra-spesifik (100-300 bp) harus menjadi standar awal untuk penanda *mini-barcode* (2). Basis data sekuens standar perlu dibuat. Sekuen tersebut dapat dikoleksi dari *GenBank*, *European Molecular Biology Laboratory*, atau *DNA Data Bank of Japan*. Selanjutnya, urutan kandidat dapat diselaraskan untuk mengidentifikasi kawasan yang konservatif dan spesifik. Setiap *mini-barcode* harus terbukti unik dengan menguji sekuens tersebut menggunakan analisis *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* dalam *database* standar untuk memastikan identifikasi spesies yang akurat (34). Selain itu, pasangan primer spesifik untuk amplifikasi *mini-barcode* harus dirancang untuk amplifikasi PCR (2). Spesies yang tidak diamplifikasi PCR dengan set primer yang diberikan tidak dapat dideteksi dalam sampel DNA. Demikian juga, taksa dengan sekuens identik tidak dapat dibedakan dan dengan begitu dapat mengubah karakterisasi sampel (17). Oleh karena itu, dalam menentukan sekuens *mini-barcode* penting untuk memperhatikan spesifisitas dan universalitasnya.

Desain Primer

Salah satu tahapan awal yang penting dalam proses amplifikasi PCR adalah memilih dan mendesain primer berdasarkan data sekuens DNA yang tersedia dan kontras statistik dari domain atau fitur struktural. Sekuen primer dapat dikoleksi dari basis data primer, dari bagian sekuens yang telah disejajarkan, atau dirancang secara manual menggunakan software (35). Komposisi sekuens nukleotida pada primer perlu dianalisis terlebih dahulu agar memenuhi kriteria primer yang diinginkan untuk memaksimalkan spesifisitas dan efisiensi proses PCR serta sekuensing DNA (36). Beberapa parameter yang perlu diperhatikan dalam merancang primer dalam DNA *mini-barcoding* meliputi: panjang primer, stabilitas ujung 5', spesifisitas ujung 3', temperatur anil, *melting temperature (T_m)*, interaksi primer-primer (seperti *self-homology* dan *cross-homology*), dan G+C *content* (Tabel 1) (37). Sekuen nukleotida pada primer harus didesain sebaik mungkin tanpa adanya homologi *intra-* dan *inter-primer* melebihi tiga pasangan basa yang menyebabkan terbentuknya *hairpin* maupun dimer primer dikarenakan dapat mengganggu proses amplifikasi DNA menggunakan

PCR (36). Primer yang ideal bersifat universal dan spesifik, sehingga dapat digunakan untuk seluruh spesies dan membedakan antar spesies (38).

Primer universal untuk lokus ITS tumbuhan telah digunakan dalam beberapa studi molekuler anggrek. Beberapa peneliti juga telah merancang primer spesifik yang didesain khusus untuk spesies anggrek menggunakan sekuen ITS1 dan atau ITS2 sebagai *mini-barcode* untuk identifikasi molekuler spesies anggrek (Tabel 2). Namun, primer universal yang digunakan untuk *barcoding* anggrek masih menghasilkan amplicon panjang sehingga menurunkan tingkat efisiensi, efektivitas, dan

keberhasilan proses amplifikasi dengan PCR (41). Hal tersebut juga mempengaruhi efektivitas dan efisiensi proses sekuensing. Hasil penelitian menggunakan primer spesifik untuk wilayah ITS1 maupun ITS2 menunjukkan bahwa hubungan filogenetik yang diungkapkan oleh analisis DNA *mini-barcoding* ITS memiliki kemampuan diskriminatif yang cukup untuk merekonstruksi pohon filogenetik taksa tertentu serta mendukung data morfologi yang telah diterbitkan sebelumnya (42).

Tabel 1. Parameter Desain Primer

No.	Parameter	Standar	Referensi
1.	Panjang primer	18-22 bp	Handoyo dan Rudiretna, 2000
2.	<i>Melting temperature</i> (Tm)	52-58°C	
3.	<i>Annealing temperature</i>	55-65°C	Dorak, 2006
4.	<i>GC content</i>	45-60%	
5.	Sekuen primer	tidak memiliki ≥ 6 nukleotida sama berurutan	Abd-Elsalam, 2003

Tabel 2. Desain Primer *Internal Transcribed Spacer* (ITS) untuk DNA *Barcoding* Spesies Anggrek

No	Primer	Sekuen (5'-3')	Sampel Anggrek	Barcode DNA	Referensi
1	17SE- F	ACGAATTCATGGTCCGGTGA AGTGTTTCG	Spesies anggrek pada Chikanda	<i>Full-Length</i> ITS	Veldman <i>et al.</i> , 2018
	26SE- R	TAGAATTCCTCCGGTTCGCTCG CCGTTAC	65 spesies anggrek di India mewakili 14 genus <i>Coelogyne cristata</i> , <i>Coelogyne fimbriata</i> , <i>Coelogyne stricta</i> , dan <i>Pleione praecox</i> <i>Vandaeae</i> : <i>subtribe</i> <i>Aerangidinae</i> <i>subtribe Angraecinae</i> <i>subtribe Aeridinae</i>		Chattopadhyay <i>et al.</i> , 2017
			75 spesies <i>Aeridinae</i>		Subedi <i>et al.</i> , 2013
			34 spesies <i>Bifrenaria</i>		Carlswald <i>et al.</i> , 2006
			23 spesies <i>Stanhopea</i>		Hidayat <i>et al.</i> , 2005

2	IT1-F	TCGTAACAAGGTTTCCGTAG GT	94 spesies Anggrek di India yang mewakili 47 genus	Full- Length ITS	Parveen <i>et al.</i> , 2017
	IT2-R	AGCGGAGGAGAAGAACTTA C	16 spesies <i>Paphiopedilum</i> , <i>Cypripedium</i> <i>guttatum</i> , <i>Phragmipedium</i> <i>lindleyanum</i> , <i>Mexipedium</i> <i>xerophyticum</i> 8 spesies <i>Paphiopedilum</i> , 3 hibrida <i>Paphiopedilum</i> 53 spesies <i>Phalaenopsis</i> 12 spesies <i>Dendrobium</i> 52 spesies <i>Phalaenopsis</i> Blume 14 spesies Oncidiinae 10 hibrida onciidiinae		Trung <i>et al.</i> , 2013 Parveen <i>et al.</i> , 2012 Tsai <i>et al.</i> , 2006 Tsai <i>et al.</i> , 2004 Tsai, 2003 Tsai dan Huang, 2001
3	ITS5-F	GGAAGTAAAAGTCGTAACAA GG	4 spesies <i>Cattleya</i> <i>loddigesii</i> 3 spesies <i>Cattleya</i> <i>walkeriana</i>	Full- Length ITS	Rivera-Jiménez <i>et al.</i> , 2017
	ITS4-R	TCCTCCGCTTATTGATATGC	10 spesies <i>Cymbidium</i> 12 spesies <i>Holcoglossum</i> <i>Spiranthes diluvialis</i> dari 23 populasi, <i>S.</i> <i>vernalis</i> , <i>S.</i> <i>magnicamporum</i> , <i>S.</i> <i>romanzoffian</i> , dan <i>S.</i> <i>cernua</i> 295 spesies dari tiap genus subtribe <i>Laeliinae</i> dan <i>Epidendroideae</i>		Sharma <i>et al.</i> , 2012 Xiang <i>et al.</i> , 2011 Szalanski <i>et al.</i> , 2001 Berg <i>et al.</i> , 2000
4	ITS2-F	CGGATATCTTGGCTCTTG	<i>Liparis loeselii</i>	ITS2	Wiland- szymañska <i>et</i> <i>al.</i> , 2016
	ITS2-R	CCGCTTAGTGATATGCTTA			
5	ITS-2F	ATGCGATACTTGGTGTGAAT	64 spesies <i>Dendrobium</i>	ITS2	Feng <i>et al.</i> , 2015
	ITS-3R	GACGCTTCTCCAGACTACAA T			

6	ITS1	TCGGTAGGTGAACCTGCGG	4 spesies Vanilloideae	Full- Length ITS	Poeaim <i>et al.</i> , 2011
7	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	21 sampel Dendrobii Herba	ITS1	Takamiya <i>et al.</i> , 2011
	17SE-F	ACGAATTCATGGTCCGGTGA AGTGTTTCG			
	DR2-R	TCTTCATCGATGCGAGAGCC			
	26SE-F	TAGAATTCCTCCGGTTCGCTCG CCGTTAC			
8	5.8d-F	AACCATCGAGTCTTTGAACG CA	16 spesies <i>Dendrobium</i> ,	ITS2	Lau <i>et al.</i> , 2001
	28cc-R	ACTCGCCGTTACTAGGGGAA	1 spesies <i>Pholidota</i>		

Sekuen primer dapat didesain berdasarkan sekuen DNA target yang telah diketahui maupun dari sekuen gen penghasil protein yang dituju yang dikoleksi dari *GenBank*. Apabila sekuen spesies tumbuhan masih belum terdapat pada *GenBank* maupun referensi lainnya, desain primer dapat dilakukan berdasarkan hasil analisis homologi dari sekuen DNA yang memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan spesies tersebut (39). Data sekuen primer yang telah didesain kemudian dianalisis menggunakan BLAST. Sekuen konservatif pada sekuen DNA tiap spesies dapat digunakan dalam merancang primer agar bersifat universal untuk seluruh spesies anggrek. Jika terdapat nukleotida identik di lokasi tertentu dengan persentase lebih dari 95%, maka situs tersebut dianggap konservatif.

Uji *in silico* pada primer yang baru dirancang dan beberapa primer lain yang umum digunakan dilakukan untuk menemukan primer terbaik. Uji *in silico* pertama yaitu menghitung kesamaan antara sekuen primer dan daerah target untuk semua spesies. Tidak boleh ada *missmatch* di dua situs primer pertama pada ujung 3' untuk meningkatkan spesifisitas ujung 3' primer. Sedangkan rentang *missmatch* pada ujung 5' yang diperbolehkan yaitu 0-5. Primer dengan persentase kecocokan tertinggi dengan sekuen seluruh spesies tumbuhan dianggap sebagai primer universal. Sedangkan primer dengan persentase kecocokan tertinggi pada sekuen spesies tumbuhan tertentu disebut sebagai primer spesifik spesies (38). Uji *in silico* primer yang kedua dilakukan dengan menggunakan set data kedua primer (*forward* dan *reverse*) untuk mengetahui cakupan spesies dari primer yang telah didesain. Primer baru yang telah dirancang kemudian diuji untuk mengetahui bagaimana primer bekerja dibandingkan dengan primer yang telah umum digunakan. Selanjutnya, panjang ampikon pasangan

primer dihitung menggunakan PRIMERBLAST, atau software lainnya. Nilai rata-rata dan standar deviasi panjang ampikon dianalisis menggunakan software untuk kemudian dievaluasi (60). Pasangan primer yang baru dirancang dapat bermanfaat bagi banyak studi molekuler tanaman seperti DNA *barcoding* tumbuhan, DNA *mini-barcoding* tumbuhan, filogeni, keanekaragaman hayati, dan penelitian lainnya yang menggunakan ITS sebagai penanda (11,61–64).

Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)

Lokus ITS belum diakui sebagai lokus yang cocok untuk *barcode* DNA oleh CBOL karena adanya variabilitas intra-genomik, salinan paralog divergen dalam individu (62) dan pseudogen (65) yang dapat menyebabkan kesulitan dalam memperoleh sekuen yang baik melalui proses sekuensing secara langsung dari produk PCR (15). Sekuen berulang pada lokus ITS (yang memuat ITS1 dan ITS2) merupakan salah satu faktor utama yang menyebabkan evolusi bersama yang tidak lengkap pada tumbuhan. Hal tersebut menimbulkan pertanyaan apakah sekuen yang diperoleh melalui PCR akan stabil dan representatif? Ataukah mungkin memberikan konstruksi pohon filogenetik yang salah? (66–68). ITS dapat membantu mengidentifikasi nenek moyang atau garis keturunan yang terlibat dalam hibrida dan introgresi dimana evolusi bersama tidak menghomogenkan salinan sekuens (69). Selain itu, ITS sebagai *barcode* DNA yang telah diaplikasikan secara meluas memiliki kelebihan lainnya yaitu adanya tingkat variasi dan struktur multi-salinan yang memfasilitasi amplifikasi dengan PCR, bahkan dari sampel herbarium (68,70). Alternatif dari permasalahan DNA *barcoding* menggunakan keseluruhan wilayah ITS dapat berupa penggunaan salah satu spacer, terutama *Internal*

Transcribed Spacer 2 (ITS2) sebagai *barcode* karena ITS2 memiliki wilayah yang lebih konservatif dibandingkan ITS1 (13,71). Masalah yang terkait dengan amplifikasi dan sekuensing seluruh wilayah ITS (ITS1-5.8S rRNA- ITS2) juga berkurang dengan hanya menggunakan ITS2 (13).

ITS2 memiliki fungsi dalam regulasi transkripsi subunit ribosom aktif yang menyediakan molekul struktural yang diperlukan dalam regulasi pra-rRNA (72). Saat ini, ITS2 telah diusulkan sebagai *barcode* standar untuk autentikasi tanaman obat (13,67,68,73,74) karena memiliki wilayah konservatif untuk merancang primer universal, mudah diamplifikasi, variabilitas sekuen yang cukup untuk membedakan spesies bahkan yang memiliki kekerabatan dekat, dan memberikan penandaan taksonomi dalam evolusi sistematis yang dapat digunakan untuk klasifikasi taksonomi secara cepat (75–77). Beberapa penelitian menggunakan anggrek obat telah menunjukkan bahwa lokus ITS2 memberikan diskriminasi spesies yang lebih baik dibandingkan ITS1 dan bahkan ITS1+ITS2 (13,78).

ITS2 adalah penanda filogenetik yang banyak digunakan. Awalnya, ITS2 secara khusus digunakan untuk analisis filogenetik interspesifik pada spesies tingkat rendah. Namun, penerapannya sebagai penanda molekuler telah meningkat untuk identifikasi spesies dalam sampel lingkungan selama beberapa tahun terakhir (79). Selain itu, tingkat keberhasilan identifikasi menggunakan *barcode* ITS2 adalah 92,7% pada tingkat spesies di berbagai tumbuhan (13). Feng *et al.*, (2015) juga merekomendasikan ITS2 sebagai *barcode* DNA dalam identifikasi spesies anggrek *Dendrobium*. Hasil analisis filogenetik menggunakan lokus ITS2 menunjukkan kesesuaian dengan identifikasi spesies anggrek *Dendrobium* yang telah ditetapkan menggunakan metode konvensional dan analisis molekuler sebelumnya. Hal tersebut menunjukkan bahwa lokus ITS2 dapat digunakan sebagai *barcode* efisien untuk mengidentifikasi spesies anggrek *Dendrobium* dan memiliki potensi sebagai *barcode* DNA yang menjanjikan dalam analisis filogenetik anggrek dari genus *Dendrobium* (1,42). ITS2 juga berpotensi digunakan sebagai penanda molekuler dalam DNA *mini-barcoding*.

KESIMPULAN

Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) memiliki kemampuan resolusi spesies yang lebih

tinggi dibandingkan ITS1 dan keseluruhan sekuen wilayah ITS (ITS1-5.8S-ITS2) dalam identifikasi molekuler spesies anggrek. Permasalahan dalam DNA *barcoding* anggrek dapat diatasi dengan menggunakan DNA *mini-barcoding* ITS2. Pengembangan metode identifikasi molekuler menggunakan DNA *mini-barcode* perlu ditingkatkan sehingga dapat dipatenkan penggunaannya dalam studi molekuler tumbuhan, terutama pada anggrek mengingat potensi ITS2 sebagai *barcode* yang terbukti dapat memberikan hasil filogenetik terbaik dibandingkan *barcode* tumbuhan lainnya pada spesies anggrek.

DAFTAR PUSTAKA

1. Feng S, Jiang Y, Wang S, Jiang M, Chen Z, Ying Q, et al. Molecular Identification of *Dendrobium* Species (Orchidaceae) Based on the DNA Barcode ITS2 Region and Its Application for Phylogenetic Study. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2015 Sep 11 [cited 2023 Feb 9];16(9):21975–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26378526/>
2. Gao Z, Liu Y, Wang X, Wei X, Han J. DNA Mini-Barcoding: A Derived Barcoding Method for Herbal Molecular Identification. *Front Plant Sci*. 2019 Aug;10:1–11.
3. Fay MF, Krauss SL. Orchid conservation genetics in the molecular age. In: Dixon KW, Kell SP, Barrett RL, Cribb PJ, editors. *Orchid Conservation*. Kota Kinabalu, Sabah: Natural History Publications; 2003. p. 91–112.
4. Ghorbani A, Gravendeel B, Naghibi F, de Boer H. Wild orchid tuber collection in Iran: A wake-up call for conservation. *Biodivers Conserv*. 2014 Jul;23(11):2749–60.
5. Subedi A, Kunwar B, Choi Y, Dai Y, van Andel T, Chaudhary RP, et al. Collection and trade of wild-harvested orchids in Nepal. *J Ethnobiol Ethnomed*. 2013 Aug;9(1):64.
6. Veldman S, Kim S-J, van Andel T, Bello Font M, Bone R, Bytebier B, et al. Trade in Zambian Edible Orchids-DNA Barcoding Reveals the Use of Unexpected Orchid Taxa for Chikanda. *Genes (Basel)*. 2018 Nov;9(12):595.
7. Vu THT, Le TL, Nguyen TK, Tran DD, Tran HD. Review on molecular markers for identification of Orchids. *Vietnam J Sci Technol Eng*. 2017;59(2):62–75.
8. Mishra P, Kumar A, Nagireddy A, Mani DN,

- Shukla AK, Tiwari R, et al. DNA barcoding: An efficient tool to overcome authentication challenges in the herbal market. *Plant Biotechnol J*. 2015 Jan;14(1):8–21.
9. CBOL plant working group. A DNA barcode for land plants. *PNAS*. 2009;106(31):12794–7.
 10. Guo Y, Huang L, Liu Z, Wang X. Promise and challenge of DNA barcoding in Venus Slipper (*Paphiopedilum*). *PLoS One*. 2016;11(1):1–13.
 11. Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(23):8369–74.
 12. Chase MW, Salamin N, Wilkinson M, Dunwell JM, Kesanakurthi RP, Haidar N, et al. Land plants and DNA barcodes: Short-term and long-term goals. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2005 Oct;360(1462):1889–95.
 13. Chen S, Yao H, Han J, Liu C, Song J, Shi L, et al. Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. *journals.plos.org*. 2010 Jan;5(1).
 14. Chattopadhyay P, Banerjee G, Banerjee N. Distinguishing Orchid Species by DNA Barcoding: Increasing the Resolution of Population Studies in Plant Biology. *Omi A J Integr Biol*. 2017 Dec;21(12):711–20.
 15. Singh H, Parveen I, Raghuvanshi S, Babbar SB. The loci recommended as universal barcodes for plants on the basis of floristic studies may not work with congeneric species as exemplified by DNA barcoding of *Dendrobium* species. *BMC Res Notes*. 2012 Jan;5(42):1–11.
 16. Takamiya T, Wongsawad P, Tajima N, Shioda N, Lu JF, Wen CL, et al. Identification of *Dendrobium* species used for herbal medicines based on ribosomal DNA Internal transcribed spacer sequence. *Biol Pharm Bull*. 2011;34(5):779–82.
 17. Little DP. A DNA mini-barcode for land plants. *Mol Ecol Resour*. 2014 May;14(3):437–46.
 18. Bauer T, Weller P, Hammes WP, Hertel C. The effect of processing parameters on DNA degradation in food. *Eur Food Res Technol*. 2003 Oct;217(4):338–43.
 19. Särkinen T, Staats M, Richardson JE, Cowan RS, Bakker FT. How to open the treasure chest? optimising DNA extraction from herbarium specimens. *PLoS One*. 2012;7(8):1–9.
 20. Wu C-T, Gupta SK, Wang AZ-M, Lo S-F, Kuo C-L, Ko Y-J, et al. Internal Transcribed Spacer Sequence Based Identification and Phylogenetic Relationship of *Herba Dendrobii*. *J Food Drug Anal*. 2012;20(1):143–51.
 21. Meusnier I, Singer GAC, Landry JF, Hickey DA, Hebert PDN, Hajibabaei M. A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BMC Genomics*. 2008 May;9(1):214.
 22. Shneyer VS, Rodionov A V. Plant DNA Barcodes. *Biol Bull Rev*. 2019 Jul;9(4):295–300.
 23. Hossain MM, Kant R, Van PT, Winarto B, Zeng S, Teixeira da Silva JA. The Application of Biotechnology to Orchids. Vol. 32, *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2013. p. 69–139.
 24. Blattner FR. Direct amplification of the entire ITS region from poorly preserved plant material using recombinant PCR. *Biotechniques*. 1999 Aug;27(6):1180–6.
 25. Shneyer VS. DNA barcoding is a new approach in comparative genomics of plants. Vol. 45, *Russian Journal of Genetics*. Springer; 2009. p. 1267–78.
 26. Hao H. DNA Barcoding and Molecular Phylogeny of *Holcoglossum* Schltr. (Orchidaceae). Gansu Agricultural University; 2010.
 27. Morrison CL, Hovatter K, Eackles M, Spidle AP, King TL. Molecular Identification of Cypripedioid Orchids in International Trade. *Selbyana*. 2005;26(1/2):196–216.
 28. Yukawa T, Kinoshita A, Tanaka N. Molecular identification resolves taxonomic confusion in *Grammatophyllum speciosum* complex (Orchidaceae). *Bull Natl Museum Nat Sci*. 2013;39(3):137–45.
 29. Chiang C-H, Yu T-A, Lo S-F, Kuo C-L, Peng W-H, Tsay H-S. Molecular Authentication of *Dendrobium* Species by Multiplex Polymerase Chain Reaction and Amplification Refractory Mutation System Analysis. *Am Soc Hortic Sci*. 2012;137(6):438–44.
 30. Wiland-szymańska J, Buczkowska K, Drapikowska M, Maślak M, Bączkiewicz A, Czylok A. Genetic structure and barcode identification of an endangered orchid species, *Liparis loeselii*, in Poland. *Syst Biodivers*. 2016 Jul;14(4):345–54.
 31. Lau DT-W, Shaw P-C, Wang J, But PP-H. Authentication of medicinal *Dendrobium* species by the internal transcribed spacer of ribosomal DNA. *Planta Med*. 2001;67:456–60.

32. Vu H-T, Le L. Bioinformatics Analysis on DNA Barcode Sequences for Species Identification: A Review. *Annu Res Rev Biol*. 2019 Dec;34(1):1–12.
33. Novak J, Grausgruber-Gröger S, Lukas B. DNA-based authentication of plant extracts. *Food Res Int*. 2007 Apr;40(3):388–92.
34. Lo YT, Shaw PC. DNA barcoding in concentrated Chinese medicine granules using adaptor ligation-mediated polymerase chain reaction. *J Pharm Biomed Anal*. 2018 Feb;149:512–6.
35. Müller K. SeqState: Primer design and sequence statistics for phylogenetic DNA datasets. *Appl Bioinformatics*. 2005 Aug;4(1):65–9.
36. Abd-Elsalam KA. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *African J Biotechnol*. 2003;2(5):91–100.
37. Mitsuhashi M. Technical report: Part 2. Basic requirements for designing optimal PCR primers. *J Clin Lab Anal*. 1996 Jan;10(5):285–93.
38. Cheng. Barcoding the kingdom Plantae: New PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. *Mol Ecol Resour*. 2016;16(1):138–49.
39. Handoyo D, Rudiretna A. Prinsip umum dan pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Unitas*. 2000;9(1):17–29.
40. Dorak MT. *Real-Time PCR*. UK: Taylor & Francis Group; 2006.
41. Gardes M, Bruns TD. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol*. 1993;2(2):113–8.
42. Yuan ZQ, Zhang JY, Liu T. Phylogenetic relationship of China *Dendrobium* species based on the sequence of the internal transcribed spacer of ribosomal DNA. *Biol Plant*. 2009;53(1):155–8.
43. Carlswald BS, Whitten WM, Williams NH, Bytebier B. Molecular phylogenetics of *Vandaeae* (Orchidaceae) and the evolution of leaflessness. *Am J Bot*. 2006;93(5):770–86.
44. Hidayat T, Yukawa T, Ito M. Molecular phylogenetics of subtribe *Aeridinae* (Orchidaceae): Insights from plastid *matK* and nuclear ribosomal ITS sequences. *J Plant Res*. 2005;118:271–84.
45. Koehler S, Williams NH, Whitten WM, Amaral MCE. Phylogeny of the *Bifrenaria* (Orchidaceae) Complex Based on Morphology and Sequence Data from Nuclear rDNA Internal Transcribed Spacers (ITS) and Chloroplast *trnL-trnF* Region. *Int J plant Sci*. 2002;163(6):1055–66.
46. Williams NH, Whitten WM. Molecular phylogeny and floral fragrances of male euglossine bee-pollinated orchids: A study of *Stanhopea* (Orchidaceae). *Plant Species Biol*. 1999;14:129–36.
47. Parveen I, Singh HK, Malik S, Raghuvanshi S, Babbar SB. Evaluating five different loci (*rbc L*, *rpo B*, *rpo C1*, *mat K*, and ITS) for DNA barcoding of Indian orchids. Archambault A, editor. *Genome*. 2017 Aug;60(8):665–71.
48. Trung KH, Khanh TD, Ham LH, Duong TD, Khoa NT. Molecular phylogeny of the endangered Vietnamese *Paphiopedilum* species based on the Internal Transcribed Spacer of the nuclear ribosomal DNA. *Adv Stud Biol*. 2013;5(7):337–46.
49. Parveen I, Singh HK, Raghuvanshi S, Pradhan UC, Babbar SB. DNA barcoding of endangered Indian *Paphiopedilum* species. *Mol Ecol Resour*. 2012 Jan;12(1):82–90.
50. Tsai CC, Huang SC, Chou CH. Molecular phylogeny of *Phalaenopsis* Blume (Orchidaceae) based on the internal transcribed spacer of the nuclear ribosomal DNA. *Plant Syst Evol*. 2006;256:1–16.
51. Tsai CC, Peng CI, Huang SC, Huang PL, Chou CH. Determination of the genetic relationship of *Dendrobium* species (Orchidaceae) in Taiwan based on the sequence of the internal transcribed spacer of ribosomal DNA. *Sci Hortic (Amsterdam)*. 2004;101:315–25.
52. Tsai C-C. *Molecular Phylogeny, Biogeography, and Evolutionary Trends of the genus Phalaenopsis (Orchidaceae)*. National Sun Yat-sen University; 2003.
53. Tsai CC, Huang SC. The internal transcribed spacer of ribosomal DNA as a marker for identifying species and hybrids of the *Oncidiinae*. *J Hortic Sci Biotechnol*. 2001;76(6):674–80.
54. Rivera-Jiménez B, Rossini H, César B, Tambarussi V, Veasey E, Ann E, et al. DNA barcode regions for differentiating *Cattleya walkeriana* and *C. loddigesii*. *Acta Sci Biol Sci*. 2017;39(1):45–52.
55. Sharma SK, Dkhar J, Kumaria S, Tandon P, Rao

- SR. Assessment of phylogenetic inter-relationships in the genus *Cymbidium* (Orchidaceae) based on internal transcribed spacer region of rDNA. *Gene*. 2012 Mar;495(1):10–5.
56. Xiang XG, Hu H, Wang W, Jin XH. DNA barcoding of the recently evolved genus *Holcoglossum* (Orchidaceae: Aeridinae): A test of DNA barcode candidates. *Mol Ecol Resour*. 2011 Nov;11(6):1012–21.
 57. Szalanski AL, Steinauer G, Bischof R, Petersen J. Origin and conservation genetics of the threatened Ute ladies'-tresses, *Spiranthes diluvialis* (Orchidaceae). *Am J Bot*. 2001;88(1):177–80.
 58. Berg CVD, Higgins WE, Dressler RL, Whitten WM, Arenas MAS, Culham A, et al. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana*. 2000;15(2):96–114.
 59. Poeaim S, Poeaim A, Soyong K. Determination of the Genetic Relationship of Vanilloideae (Orchidaceae) Based on the Sequence of the Internal Transcribed Spacer of Ribosomal DNA. 20315814010. 2011;7–11.
 60. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012 Jun;13(1):134.
 61. Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS, Donoghue MJ. The ITS Region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on Angiosperm phylogeny. *Ann Missouri Bot Gard*. 1995;82(2):247–77.
 62. Álvarez I, Wendel JF. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol Phylogenet Evol*. 2003;29(3):417–34.
 63. Hollingsworth. Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS One*. 2011;6(5).
 64. Li M, Cao H, But PPH, Shaw PC. Identification of herbal medicinal materials using DNA barcodes. *J Syst Evol*. 2011;49(3):271–83.
 65. Bailey CD, Carr TG, Harris SA, Hughes CE. Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes. *Mol Phylogenet Evol*. 2003 Dec;29(3):435–55.
 66. De Sousa Queiroz C, De Carvalho Batista FR, De Oliveira LO. Evolution of the 5.8S nrDNA gene and internal transcribed spacers in *Carapichea ipecacuanha* (Rubiaceae) within a phylogeographic context. *Mol Phylogenet Evol*. 2011 May;59(2):293–302.
 67. Gao T, Yao H, Song J, Liu C, Zhu Y, Ma X, et al. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. *J Ethnopharmacol*. 2010 Jul;130(1):116–21.
 68. Yao H, Song J, Liu C, Luo K, Han J, Li Y, et al. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PLoS One*. 2010;5(10).
 69. Sang T, Crawford DJ, Stuessy TF. Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: Implications for biogeography and concerted evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jul;92(15):6813–7.
 70. Feliner GN, Rosselló JA. Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. Vol. 44, *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Academic Press; 2007. p. 911–9.
 71. Yao H, Song J-Y, Ma X-Y, Liu C, Li Y, Xu H-X, et al. Identification of *Dendrobium* Species by a Candidate DNA Barcode Sequence: The Chloroplast *psbA-trnH* Intergenic Region. *Planta Med*. 2009 May;75(06):667–9.
 72. Van Nues RW, Rientjes MJM, Morré SA, Mollee E, Planta RJ, Venema J, et al. Evolutionary conserved structural elements are critical for processing of internal transcribed spacer 2 from *Saccharomyces cerevisiae* precursor ribosomal RNA. *J Mol Biol*. 1995 Jun;250(1):24–36.
 73. Gu W, Song J, Cao Y, Sun Q, Yao H, Wu Q, et al. Application of the ITS2 Region for Barcoding Medicinal Plants of Selaginellaceae in Pteridophyta. *PLoS One*. 2013 Jun;8(6).
 74. Chiou SJ, Yen JH, Fang CL, Chen HL, Lin TY. Authentication of medicinal herbs using PCR-amplified ITS2 with specific primers. *Planta Med*. 2007 Oct;73(13):1421–6.
 75. Liu Z, Zeng X, Yang D, Ren G, Chu G, Yuan Z, et al. Identification of medicinal vines by ITS2 using complementary discrimination methods. *J Ethnopharmacol*. 2012 May;141(1):242–9.
 76. Coleman AW. ITS2 is a double-edged tool for

- eukaryote evolutionary comparisons. *Trends Genet.* 2003 Jul;19(7):370–5.
77. Schultz J, Wolf M. ITS2 sequence-structure analysis in phylogenetics: A how-to manual for molecular systematics. Vol. 52, *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Academic Press; 2009. p. 520–3.
78. Michel CI, Meyer RS, Taveras Y, Molina J. The nuclear internal transcribed spacer (ITS2) as a practical plant DNA barcode for herbal medicines. *J Appl Res Med Aromat Plants.* 2016 Sep;3(3):94–100.
79. Engelmann JC, Rahmann S, Wolf M, Schultz J, Fritzilas E, Kneitz S, et al. Modelling cross-hybridization on phylogenetic DNA microarrays increases the detection power of closely related species. *Mol Ecol Resour.* 2009 Jan;9(1):83–93.