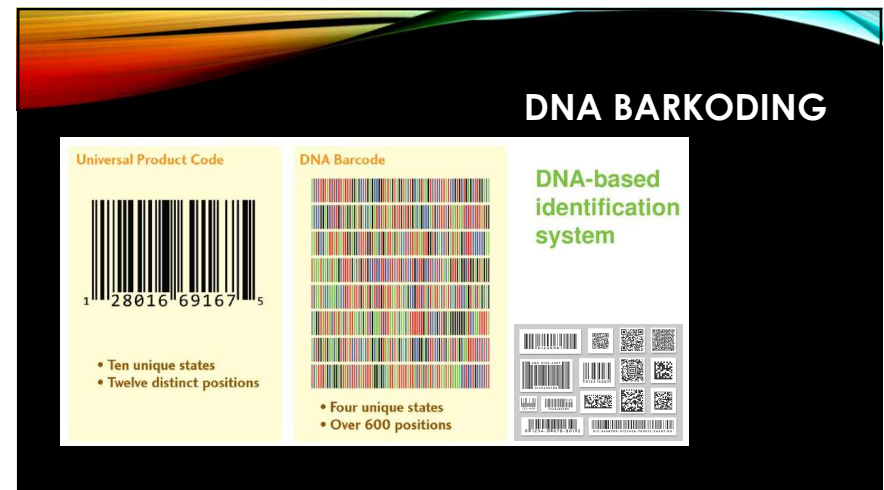




1



2

DNA BARKODING

- Sample yang digunakan adalah DNA
 - Metode ekstraksi DNA.
- Gold standard locus:
 - COX1 (hewan),
 - rbcL dan matK (tumbuhan),
 - ITS (jamur),
 - 16s RNA (bakteri)
- Design primer
 - Tidak seluruh sekuen digunakan hanya sekuen "representatif".
 - Disesuaikan dengan kebutuhan analisis/ identifikasi: level spesies, genus, famili, dst.



1. GEN TARGET

PENGUMPULAN SEKUEN GEN TARGET

Gold standard daerah target untuk barcoding diantaranya:

1. Hewan: *COX1* (cytochrome c oxidase 1)
2. Tumbuhan: *rbcL* (large subunit RuBisCo), *matK* (maturase K)
3. Fungi: ITS
4. Prokariot: 16S rRNA (ribosomal RNA subunit)

Slow evolving region: useful for distantly related taxa (genus, family, ordo)

Fast evolving region: needed when identifying more closely related species such as cryptic/sibling species groups.

5

PENGUMPULAN SEKUEN GEN TARGET

- Lakukan langkah yang sama untuk spesies nyamuk lainnya dan simpan sekuen fasta gen COX1 pada "notepad".

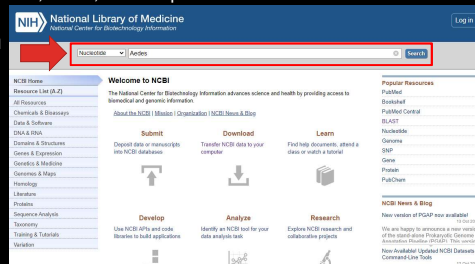
Berikut beberapa complete sequences COX1 gene:

- *Aedes aegypti*: NC_035159 (location: 1298-2834)
- *Aedes albopictus*: NC_006817 (location: 1436-2972)
- *Culex pipiens pallens*: NC_015079 (location: 1446-2982)
- *Culex quinquefasciatus*: NC_014574 (location: 1446-2982)
- *Anopheles cruzii*: NC_04464 (location: 1445-2983)
- *Anopheles gambiae*: NC_002084 (location: 1424-2960)

6

PENGUMPULAN SEKUEN GEN TARGET

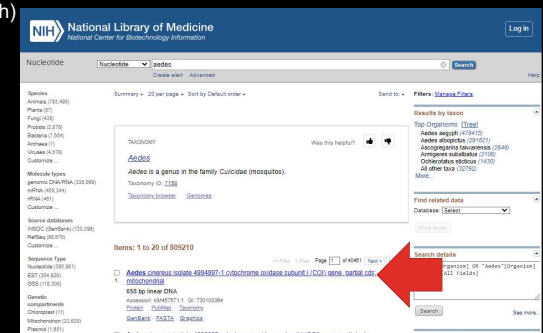
- Data sekuen gen target dapat dicari dan diunduh dari website NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
- Misal, anda diminta merancang primer gen cytochrome c oxidase 1 (COX1) dari beberapa spesies nyamuk, yaitu: *Aedes*, *Culex*, dan *Anopheles*.
- Lakukan pencarian *complete genome* pada NCBI
- Pilih "**nucleotide**" dari menu drop down
- Ketik genus organisme target anda.
- Lalu lakukan pencarian dengan klik "**search**".



7

PENGUMPULAN SEKUEN GEN TARGET

Untuk merancang primer barkoding, gunakan *complete sequence* dari gen target.
Hindari *partial sequence* (panah)



8

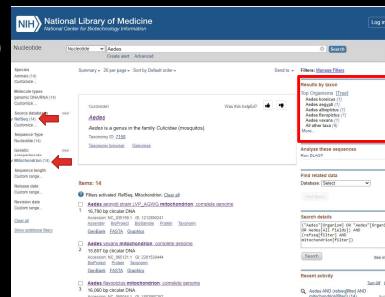
PENGUMPULAN SEKUEN GEN TARGET

Lakukan penyaringan data dengan memilih menu yang ditunjuk oleh panah.

- **RefSeq** (dari menu source databases) dan
- **Mitochondrion** (dari menu genetic compartments)

Pada bagian kanan halaman hasil (kotak merah),

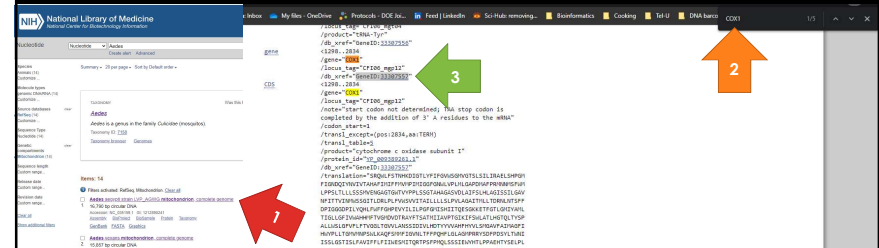
- Terdapat informasi mengenai spesies *Aedes* yang data *complete genome* dari gen COX1 sudah tersedia di NCBI.
- Unduh data complete sequence gen COX1 dari beberapa spesies *Aedes*, misal: *A. aegypti* dan *A. albopictus*



9

PENGUMPULAN SEKUEN GEN TARGET

- Pilih salah satu hasil pencarian setelah disaring, misal "*Aedes aegypti*" (panah merah)
- Kemudian gunakan shortcut find (**Ctrl+F**) untuk mencari "*COX1*" (panah kuning)
- kemudian klik tautan **geneID** untuk gen COX1 (panah hijau)



10

PENGUMPULAN SEKUEN GEN TARGET

- Anda akan diarahkan ke halaman genome viewer yang menunjukkan lokasi COX1 pada genome nyamuk *Aedes aegypti*.
- Buka tautan FASTA pada tab baru (panah).
- Gambar kanan menunjukkan halaman FASTA seq COX1 organisme *Aedes aegypti*

The screenshot shows the NCBI genome viewer for *Aedes aegypti*. The top navigation bar includes 'Genome', 'Annotations', 'Variations', 'Comparative Genomics', and 'Public Data'. The main content area displays the COX1 gene location on the chromosome. A red arrow points to the 'FASTA' tab, which is highlighted. The FASTA sequence for the COX1 gene is displayed on the right side of the screen.

11

PENGUMPULAN SEKUEN GEN TARGET

Tugas UAS (bagian 1):

- Cari dan tentukan kelompok organisme yang akan anda identifikasi menggunakan Teknik DNA Barkoding.
- Cari dan tentukan gen target yang sesuai untuk mengidentifikasi kelompok organisme tersebut.
- Kumpulkan sekuen gen target minimal dari 10 organisme yang ingin anda identifikasi.
- Simpan file dalam notepad.

12

VALIDASI TARGET GEN

Target gen

- Sekuen lengkap (DNA)



Validitas

- Penjajaran
- Rekonstruksi filogenetik (NJ)

□ Target gen

Periksa terlebih dahulu apakah gen terpilih dapat dipergunakan sebagai DNA barcode.

Lakukan **penjajaran** dan rekonstruksi **pohon filogenetik**.

13

2. PENJAJARAN SEKUENS DAN REKONSTRUKSI POHON FILOGENETIK

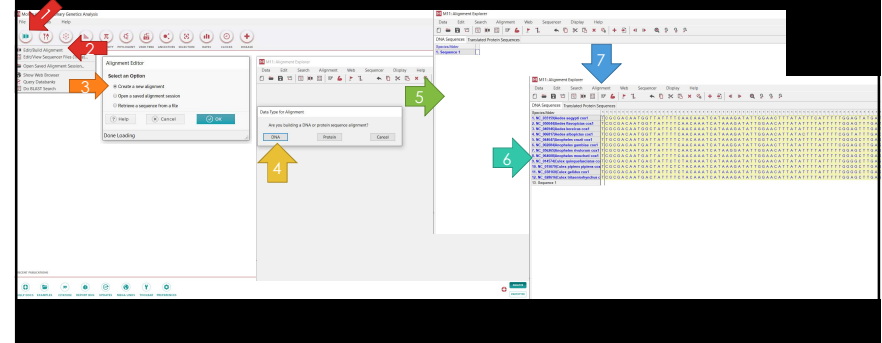
14

UNIVERSAL PRIMER DESIGN

- Primer can be designed to amplify specific regions from specific organism DNA.
- Primer can also be designed to amplify **specific regions from various organisms**. Strategy:
 - Align groups of sequences targeted for amplification
 - Find the most conservative region at 5' and 3' ends
 - Design forward primer at the 5' conservative region
 - Design reverse primer at the 3' conservation region
 - Perform primer pair "Quality Control" to find the best pair
 - Ensure uniqueness in all template sequence
 - Ensure uniqueness in possible contaminant sources

15

LANGKAH MELAKUKAN PENJAJARAN MENGGUNAKAN SOFTWARE MEGA



16

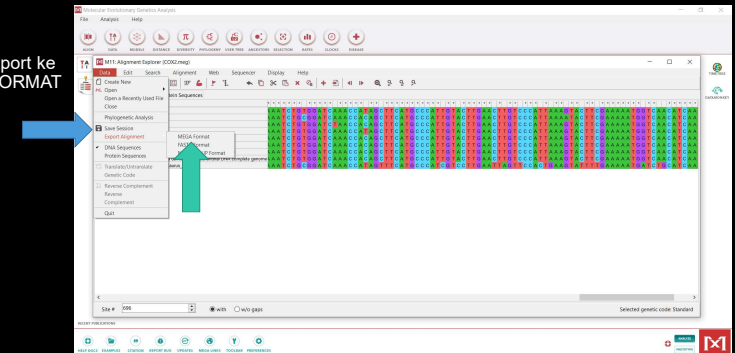
HASIL PENJAJARAN



17

REKONSTRUKSI POHON FILOGENETIKA DENGAN MEGA SOFTWARE

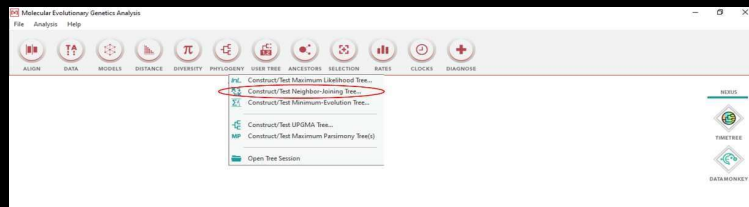
- Save/ export ke MEGA FORMAT



18

REKONSTRUKSI POHON FILOGENETIKA DENGAN MEGA SOFTWARE

Buka aplikasi MEGA X, Lalu pilih, menu **phylogeny**, kemudian pilih **construct/test Neighbor-Joining Tree**

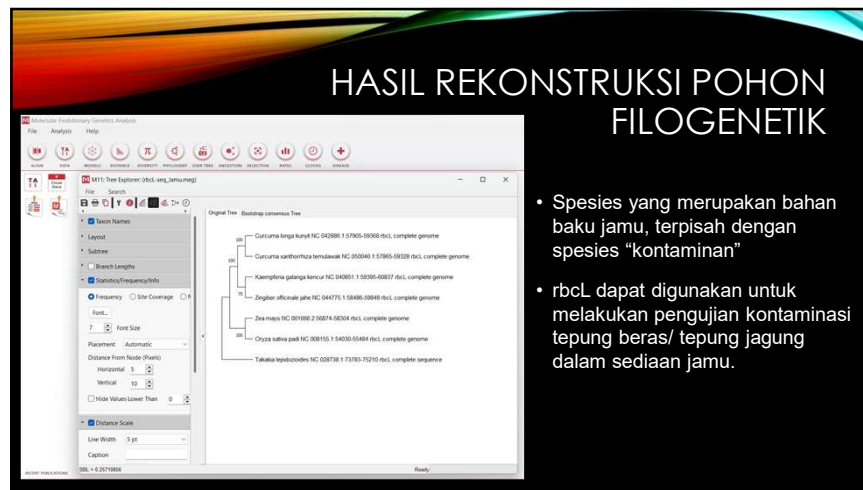


19

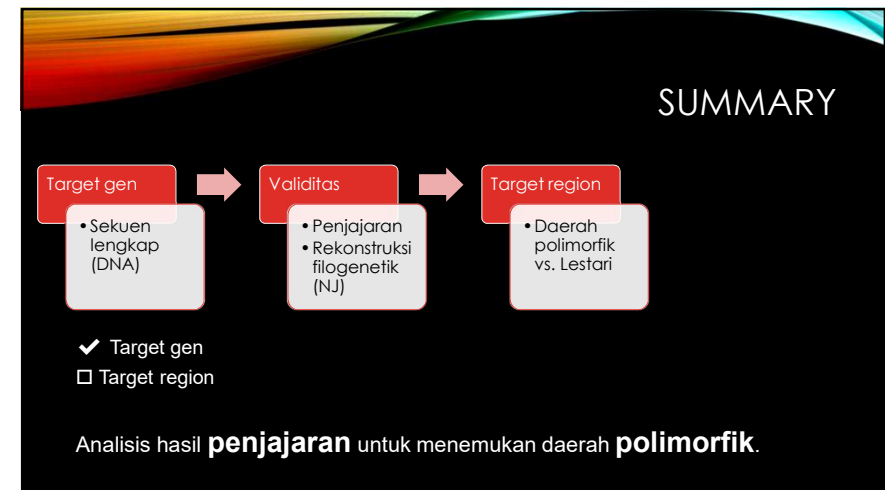
REKONSTRUKSI POHON FILOGENETIKA

- Pilih sekuen yang telah di jajarkan dalam bentuk format data MEGA.
- Kemudian pada menu **PHYLOGENY TEST** pilih **bootstrap method** dan **No. of bootstrap replications diisi 1000**.
- Pada menu **SUBSTITUTION MODEL** pilih model/method dengan **p-distance**. Biarkan parameter lain sesuai **default setting**.
- Pilih **OK**

20



21



22

3. IDENTIFIKASI DAERAH POLIMORFIK

23

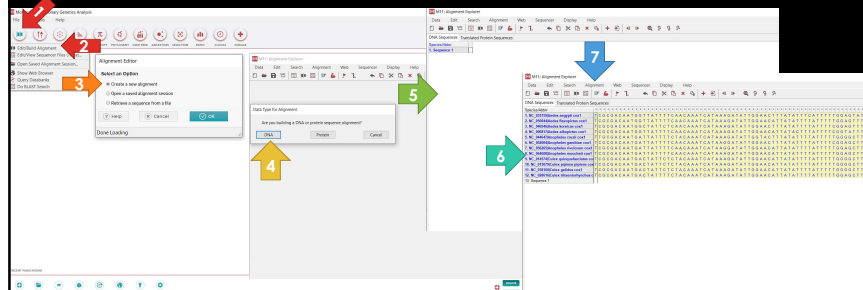
PENJAJARAN (ALIGNMENT)

- Penjajaran sekuen (*alignment*) dilakukan untuk mengidentifikasi daerah lestari (*conserved region*) dan daerah polimorfik (*polymorphic region*).
- Daerah lestari gen: memiliki sekuen DNA yang sama pada tingkatan taksonomi yang berbeda
- Daerah polimorfik gen: daerah yang memiliki variasi sekuen DNA pada tingkatan taksonomi yang berbeda.
- Primer di desain pada daerah yang lestari sehingga sepasang primer dapat dipergunakan untuk **mengamplifikasi DNA** dari beberapa organisme.
- Urutan daerah polimorfik digunakan untuk **mengidentifikasi organisme**.

24

PENAJARAN (ALIGNMENT)

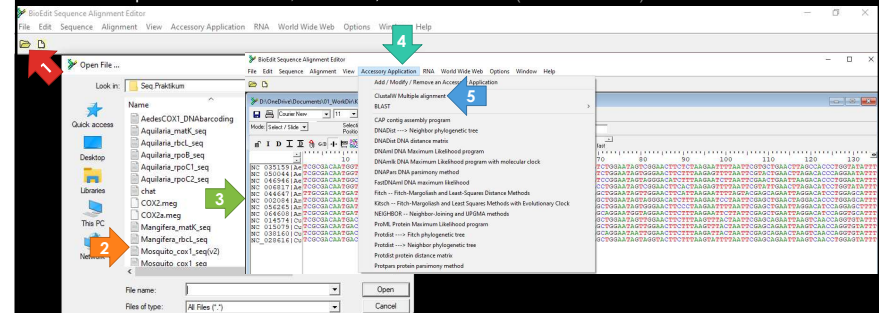
Lakukan alignment/penjajaran pada sekuen gen COX1 yang sudah dikumpulkan, menggunakan tools **clustalW** pada software **MEGA**, **BioEdit**, atau **MUSCLE** (web-based tools).



25

PENAJARAN (ALIGNMENT)

Lakukan alignment/penjajaran pada sekuen gen COX1 yang sudah dikumpulkan, menggunakan tools **clustalW** pada software **MEGA**, **BioEdit**, atau **MUSCLE** (web-based tools).



26

PENJAJARAN (ALIGNMENT)

Lakukan alignment/penjajaran pada sekuen gen COX1 yang sudah dikumpulkan, menggunakan tools **clustalW** pada software MEGA, BioEdit, atau **MUSCLE** (web-based tools).

The screenshot shows the MUSCLE web interface. At the top, there's a navigation bar with links like 'Input form', 'Web services', 'Help & Documentation', 'Bioinformatics Tools FAQ', and 'Feedback'. Below this, the title 'Multiple Sequence Alignment' is displayed. A note mentions that MUSCLE is claimed to achieve both better average accuracy and better speed than ClustalW or T-Coffee. The main section is divided into two steps: 'STEP 1: Enter your input sequences' and 'STEP 2: Set your Parameters'. In Step 1, there's a text area for entering sequences and a file upload button. In Step 2, the 'OUTPUT FORMAT' dropdown menu is set to 'ClustalW', which is highlighted by a red arrow and the text 'Pilih ClustalW'.

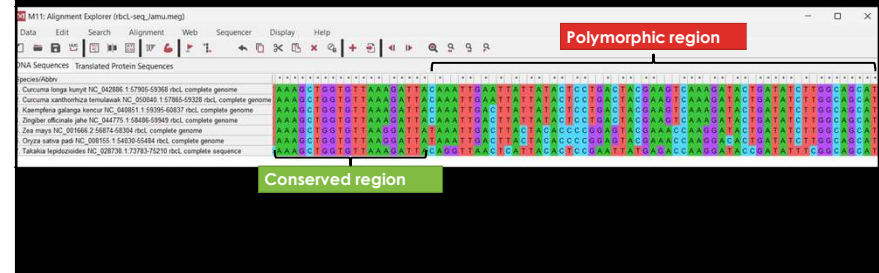
Masukan sekuen disini

Pilih ClustalW

27

PENJAJARAN (ALIGNMENT)

Identifikasi daerah lestari (*conserved*) yang mengapit daerah polimorfisme.



28

PENJAJARAN SEKUEN

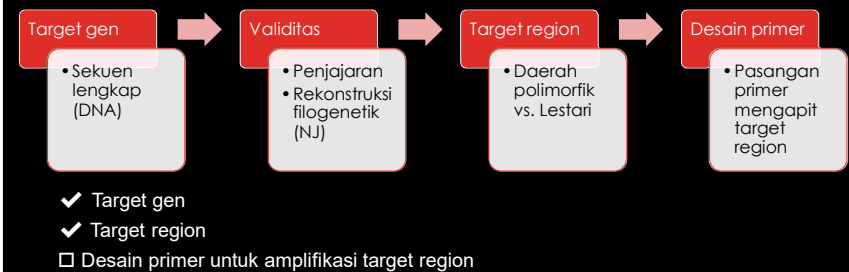
Tugas UAS (bagian 2):

Lakukan penjajaran sekuen gen target pilihan anda menggunakan:

1. Offline tools (installation needed): Mega, BioEdit
2. Web based tools provided by ebi.ac.uk
 - MUSCLE: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>
 - Clustal omega: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

29

SUMMARY



30

DESAIN PRIMER

31

Primer adalah urutan sekuen nukleotida pendek (18-30 basa) yang biasanya Digunakan untuk amplifikasi sekuen DNA spesifik secara *in vitro* pada proses *polymerase chain reaction* (PCR)

Desain Primer dapat dilakukan dengan menggunakan software bioinformatik. Bisa menggunakan software berbasis web atau pun perangkat lunak yang di install pada komputer

32

TAHAP DESAIN PRIMER

1. Menentukan dan mencari sekuen DNA target: gen, intergenic, ekson, intron, UTR
2. Penjajaran (*alignment*) sekuen DNA
3. Menentukan daerah DNA yang akan diampifikasi: *polymorphic region*
4. Uji kualitas primer yang telah didesain
5. Uji spesifisitas primer yang telah di desain (*in silico* PCR)

33

What makes a good primer?

Primer length: 18–22bp

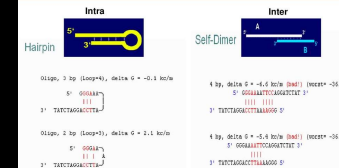
Too small a qPCR primer (<18bp) can increase the likelihood that it will bind to elsewhere in the genome, ie it is not specific enough to the target of interest. Otherwise, too large a qPCR primer (>22bp) can raise the primer melting temperature (T_m) which will impact on the annealing temperature and primer binding properties of the reaction.



T_m: 59–65°C

GC content: 50–60%

Examples of Primer-Dimer Formation



The primer pair is specific to the target of interest

Primers contain a GC clamp

Another feature which I like to include in both my primers is a **GC clamp**. Simply, a GC clamp is the presence of either a guanine (G) or cytosine (C) base in the last 5 bases of the primer.

The reasoning behind using a GC clamp in primers is the fact that G and C bases contain stronger hydrogen bonds, compare with adenine (A) and thymine (T) bases. Therefore, by including at least one G or C base towards the end of the primer will ensure it binds completely to the template sequence.



Other examples of a GC clamp (in red) in PCR primers include are listed below.

- 5'-CTCTGTAGGGTGGCGCA**CTAG**-3'
- 5'-CGCTACCAACCATCGATT**AT**-3'
- 5'-GGATCTGGCTGCTGATGCTAT**AG**-3'

Notice that it does not matter where in the last 5 bases the G or C base is in order for them to be referred to as a GC clamp.

Avoid nucleotide repeats



34

SOFTWARE DESAIN PRIMER

Software **berbasis web** yang dapat digunakan untuk desain primer

- **Primer-Blast (NCBI)**
- **Primer3**
- GenScript
- PerlPrimer
- RExPrimer

Software pada **personal komputer** yang digunakan untuk desain primer

- PrimerSelect
- PrimerPremier6
- Fast PCR
- PrimerDesign
- Oligo 6
- Geneious

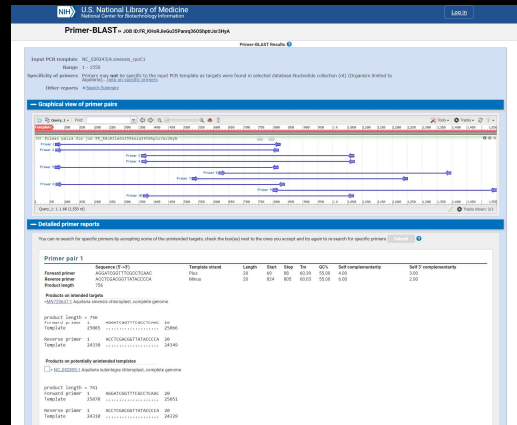
35

WEBPAGE DESAIN PRIMER

- Pencarian data sekuen gen target:
 - NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Desain primer:
 - NCBI primer BLAST: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome
 - Primer3 Plus: <https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>
- Quality check kandidat primer:
 - OligoAnalyzer: <https://sg.idtdna.com/>
 - Beacon designer: <http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1>
 - NCBI primer BLAST

36

Desain primer dengan primer-BLAST



39

REVIEW MINGGU LALU



40

REVIEW MINGGU LALU

Target gen

- Sekuen lengkap (DNA)



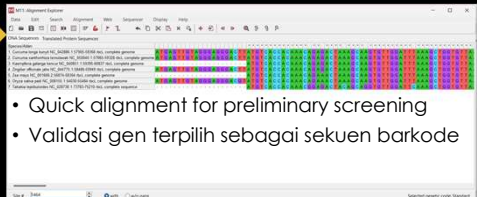
- Sekuen lengkap (gene/genomic region)
- Simpan dalam bentuk FASTA (dalam notepad).

41

REVIEW MINGGU LALU

Validitas

- Penjajaran
- Rekonstruksi filogenetik (NJ)



- Quick alignment for preliminary screening
- Validasi gen terpilih sebagai sekuen barcode

42

REVIEW MINGGU LALU

Target region

- Daerah polimorfik vs. Lestari

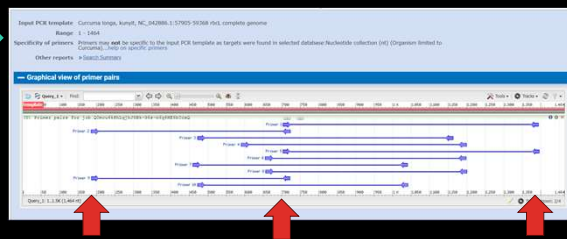


44

REVIEW MINGGU LALU

Desain primer

- Pasangan primer mengapit target region



45

TAHAP DESAIN PRIMER: PRIMER3PLUS

- Buka website Primer3Plus

- Copy-paste salah satu sekuen gen COX1 ke kotak sekuen yang disediakan.

46

TAHAP DESAIN PRIMER: PRIMER3PLUS

- Pilih general, tentukan:
 - ✓ Ukuran produk PCR
 - ✓ Panjang primer,
 - ✓ T_m ,
 - ✓ GC% dan max. T_m Difference
- Klik [*pick primers*]

Primer3Plus

pick primers from a DNA sequence

Task: *Select primer pairs to detect the given template sequence. Options included/excluded regions can be specified.*

Main **General Settings** **Advanced Settings** **Internal Oligo** **Penalty Weights** **Sequence Quality**

Product Size Range: (600-700)

Primer Size Min: 18 Opt: 23 Max: 27

Primer Tm Min: 57.0 Opt: 60.0 Max: 63.0

Primer GC% Min: 20.0 Opt: Max: 60.0

Concentration of monovalent cations: 50.0 Ammonium Cl₄ Concentration: 50.0

Concentration of divalent cations: 0.0 Concentration of dNTPs: 0.0

Max Tm Difference: 5.0

Fix the 5' [prime end](#) of the primer

Minimize/Reset Library: NONE

Load and Save

Please select special settings here: ☐ (use Active Settings button to load the selected settings)

To upload or save a settings file from your local computer, choose here:

No file chosen

TAHAP DESAIN PRIMER: PRIMER3PLUS

Primer3 akan memberikan beberapa kandidat primer (biasanya 5 pasang primer). Seleksi lebih lanjut dilakukan dengan mencari primer yang memenuhi kriteria dan **target-specific**

49

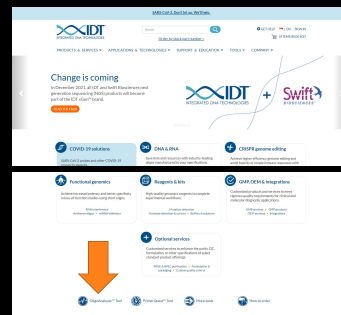
SESUAIKAN PRIMER SETTINGS HINGGA DIPEROLEH PASANGAN PRIMER YANG MEMENUHI KRITERIA

50

ANALISIS KUALITAS PRIMER MENGUNAKAN OLYGOANALYZER

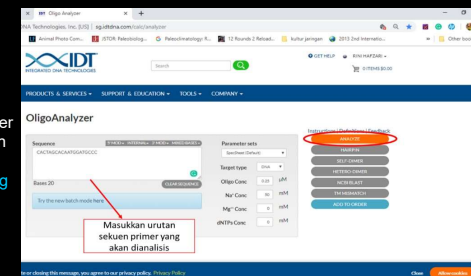
1. Akses website
(<https://sg.idtdna.com/>).

Pada bagian paling bawah website
klik **OligoAnalyzer Tool**



ANALISIS KUALITAS PRIMER MENGUNAKAN OLYGOANALYZER

- Lakukanlah *sign in* jika sudah memiliki akun, namun jika belum lakukan *register* terlebih dahulu kemudian *sign in*
- Pilihlah salah satu primer forward dari kandidat primer hasil pick primer di Primer3, kemudian *paste* sekuen primer tersebut di OlygoAnalyzer. Lalu pilih *analyze*. Lakukan hal yang sama untuk mengetahui kualitas primer reverse



ANALISIS KUALITAS PRIMER MENGGUNAKAN BEACON DESIGNER

- Buka website Beacon Designer. Isikan identitas primer.
- Pada drop-down [Type], pilih "Primer pair". Salin urutan primer forward dan reverse pada kotak tersedia. Klik [Analyze]

The screenshot displays the Beacon Designer software interface. At the top left, there's a logo for "Beacon Designer Free Edition". The main window has a menu bar with "Oligo Analysis" and "Sequence Analysis". Below the menu bar, there are several input fields and options:

- Assay Type:** Two radio buttons labeled "TaqMan®" (selected) and "SYBR Green".
- Name:** A text box containing "NR_026758.1_viruses_qpcr".
- Description:** A text box containing "Primer pair".
- Type:** A dropdown menu set to "primer pair".
- Internal Primer:** A checkbox that is unchecked.
- Anti-sense Primer:** A checkbox that is checked.
- Probe:** An unchecked checkbox.

To the right of these fields, there are four red arrows pointing to specific elements:

- Arrow 1 points to the "Name" field.
- Arrow 2 points to the "Description" field.
- Arrow 3 points to the "Anti-sense Primer" checkbox.
- Arrow 4 points to the "Assay Type" radio buttons.

Below the input fields, there are two columns of results:

	Size	Temp
Nucleic Acid Concentration	0.25	nM
Ionic Ion Concentration	50	mM
Final Mg++ Concentration	5	mM
Total Na+ Concentration	100.04	mM

At the bottom of the window, there are two buttons: "Restore Default" and "Analyze".

ANALISIS KUALITAS PRIMER MENGUNAKAN BEACON DESIGNER

Name: NC_029243 A.sinensis_rpoC1										November 10, 2021	
Description:										Assay Type: TaqMan®	
Reaction Conditions:											
Nucleic Acid Concentration (nM)				0.25		Monovalent Concentration (mM)				50	
Free Mg ²⁺ Concentration (mM)				5		Total Na ⁺ Concentration (mM)				332.84	
Sense Primers:											
GTGTGGTATTGAAAGCTCTCTCT											
Length (bp)		Tm (°C)		GC%		GC Clamp		Cross Dimer (ΔG)		Self Dimer (ΔG)	
24		58.43		41.67		2		-2.0		-3.3	
Anti-sense Primers:											
CTCTCATCGGCTCAAGTAGTGA											
Length (bp)		Tm (°C)		GC%		GC Clamp		Cross Dimer (ΔG)		Self Dimer (ΔG)	
23		58.1		47.83		2		-2.0		-3.3	

As a rule of thumb:

- Never accept primers where the 3' end has 3 bp matches, as these will tend to form primer dimers preferentially over hybridizing with the sequence.
- If self-dimers or cross dimers cannot be avoided, choose primers with the highest $-\Delta G$ (meaning the least negative number—the one closest to zero). Discard primers with ΔG s more negative than -3.5 kcal/mol.

Reference: Thornton and Basu, 2011 (<https://doi.org/10.1002/jmb.20461>)

Delta G Base Pairs	-6.14 kcal/mole	Delta G Base Pairs	-0.96 kcal/mole
5' GGGCTAACTTCAATGTCATCCC		5' GGGCTAACTTCAATGTCATCCC	
3' CCTACTGTACTTCAATCGGG		3' CCTACTGTACTTCAATCGGG	

Avoid 3' bp matches >2bp

Example of acceptable self-dimer

ANALISIS KUALITAS PRIMER MENGGUNAKAN BEACON DESIGNER SECONDARY STRUCTURE OF PRIMERS

Secondary Structures for Sense Primer

Dimer:-

```

5' GTGTGGTATTGAAAGCTCTCTCT 3'
   |||||
3' TCCTTCTGAAAGTTTATGCTGTG 5'
-3.3

5' GTGTGGTATTGAAAGCTCTCTCT 3'
   |||
3' TCCTTCTGAAAGTTTATGCTGTG 5'
-0.6

5' GTGTGGTATTGAAAGCTCTCTCT 3'
   | | | | |
3' TCCTTCTGAAAGTTTATGCTGTG 5'
-0.1

```

Hairpin:-

```

/CAAGTTTATGCTGTG 5'
6 |||
\TCTTCT 3'
-0.6

```

Secondary Structures for Anti-sense Primer

Dimer:-

```

5' CTCTCATCGGCTCAAGTAGTGA 3'
   |||||
3' ATTGTAAGCTGGCTACTCTC 5'
-2.8

Hairpin:-
Not Found

Cross Dimer
Cross Dimer between Sense Primer and Anti-sense Primer:-
5' GTGTGGTATTGAAAGCTCTCTCT 3'
   |||||
3' ATTGTAAGCTGGCTACTCTC 5'
-2.8

5' GTGTGGTATTGAAAGCTCTCTCT 3'
   |||
3' ATTGTAAGCTGGCTACTCTC 5'
-0.5

5' GTGTGGTATTGAAAGCTCTCTCT 3'
   |||
3' ATTGTAAGCTGGCTACTCTC 5'
-0.7

```

UJI SPESIFISITAS PRIMER (IN SILICO) MENGGUNAKAN BLAST PRIMER NCBI

1. Akses Website NCBI, pilih Blast, kemudian Pilih Blast Primer

57

UJI SPESIFISITAS PRIMER (IN SILICO) MENGGUNAKAN BLAST PRIMER NCBI

2. Copy dan paste primer forward dan primer reverse yang didapat dari hasil [pick primer] pada Primer3 ke Primer-BLAST
3. Gunakan default setting pada menu "Primer parameter" dan "Exon/intron selection".
4. Pada bagian "Primer pair specificity checking parameters", pilih 'nr' pada menu 'Database' dan kosongkan menu 'Organism'.

Klik [Get primer]

58

UJI SPESIFISITAS PRIMER (IN SILICO) MENGGUNAKAN BLAST PRIMER NCBI

4. Perhatikan hasil blast primer, pastikan spesies yang terdapat pada hasil blast merupakan spesies yang sama atau satu genus dengan spesies yang digunakan pada saat desain primer. Apabila sudah sama, maka pasangan primer tersebut dapat digunakan untuk amplifikasi sekuen DNA target dengan metode PCR

Primer-BLAST Results

Input PCR template: none
Specificity of primers: Target templates were found in selected database: Nucleotide collection (nt) (Organism limited to Aquilaria)
Other reports: >Search Summary

--- Detailed primer reports

Primer pair 1	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GTGTGGTATTGAAAGCTCTCTCT	24	59.49	41.67	0.00	2.00
Reverse primer	CTCTCATCCGGCTCAAGTAGTTA	23	59.37	47.83	4.00	2.00

Products on target templates

>NC_052859.1 Aquilaria subintegra chloroplast, complete genome

product length = 803
Forward primer 1 GTGTGGTATTGAAAGCTCTCTCT 24
Template 24760 24737
Reverse primer 1 CTCTCATCCGGCTCAAGTAGTTA 23
Template 23958 23980

>MN147870.1 Aquilaria sinensis chloroplast, complete genome

product length = 798
Forward primer 1 GTGTGGTATTGAAAGCTCTCTCT 24
Template 24774 24751
Reverse primer 1 CTCTCATCCGGCTCAAGTAGTTA 23
Template 23977 23999

59

HASIL PRIMER-BLAST APABILA MENU 'ORGANISM' DIISI DENGAN SPESIES TARGET

Primer-BLAST Results

Input PCR template: none
Specificity of primers: Target templates were found in selected database: Nucleotide collection (nt) (Organism limited to Aquilaria)
Other reports: >Search Summary

--- Detailed primer reports

Primer pair 1	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GTGTGGTATTGAAAGCTCTCTCT	24	59.49	41.67	0.00	2.00
Reverse primer	CTCTCATCCGGCTCAAGTAGTTA	23	59.37	47.83	4.00	2.00

Products on target templates

>NC_052859.1 Aquilaria subintegra chloroplast, complete genome

product length = 803
Forward primer 1 GTGTGGTATTGAAAGCTCTCTCT 24
Template 24760 24737
Reverse primer 1 CTCTCATCCGGCTCAAGTAGTTA 23
Template 23958 23980

>MN147870.1 Aquilaria sinensis chloroplast, complete genome

product length = 798
Forward primer 1 GTGTGGTATTGAAAGCTCTCTCT 24
Template 24774 24751
Reverse primer 1 CTCTCATCCGGCTCAAGTAGTTA 23
Template 23977 23999

60

DNA BARKODING

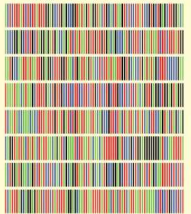
Universal Product Code



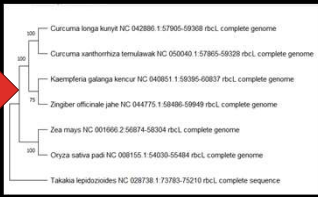
1 28016 69167 5

- Ten unique states
- Twelve distinct positions

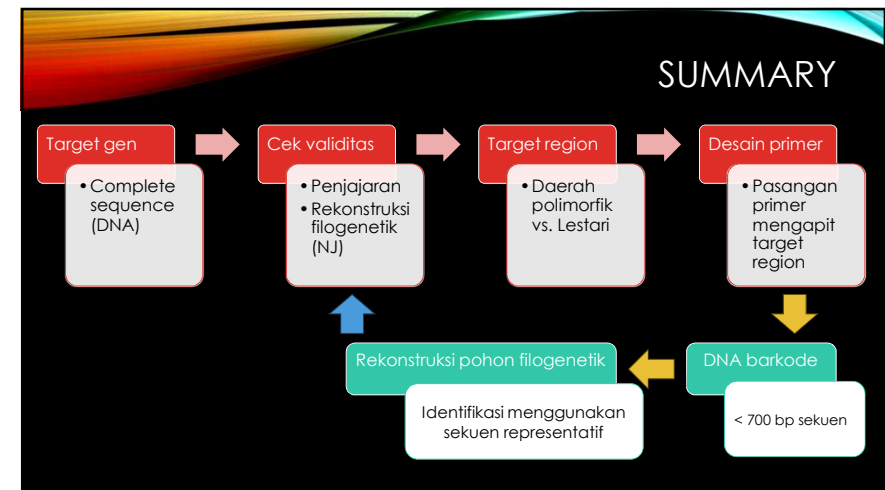
DNA Barcode



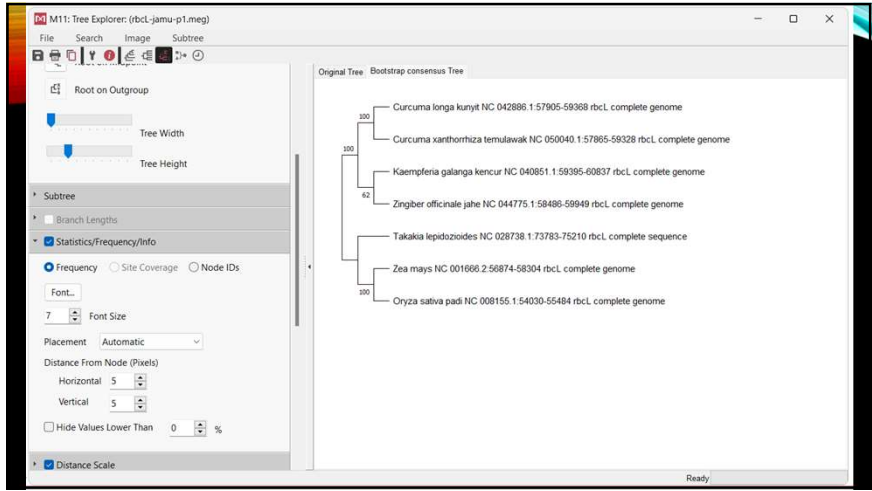
- Four unique states
- Over 600 positions



61



62



63



64