

ANALYSIS OF THE CHLOROPLAST GENE REGION, *rbcL*, ISOLATED FROM *Hoya parasitica* (Roxb.) Wall. ex Wight PLANT

Hoang Viet Cuong¹, Mai Thi Hoang Anh¹, Tu Quang Tan^{2*}, Chu Hoang Mau²

¹Thai Nguyen Department of Education and Training

²TNU - University of Education

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 29/12/2022 Revised: 30/01/2023 Published: 31/01/2023	<i>Hoya parasitica</i> (Roxb.) Wall. ex Wight), an epiphytic species, is an ornamental and precious medicinal plant. <i>H. parasitica</i> contains many biologically active pharmaceutical substances that are used to treat some human diseases. <i>H. parasitica</i> is morphologically similar to some species of the <i>Hoya</i> genus and the Asclepiadaceae family. How to identify the species and genera in the Asclepiadaceae family when the morphology, growth, and development of the plants are incomplete or the plant specimen is deformed or in powder form was the question posed for this study. In this work, the <i>rbcL</i> gene was isolated and sequenced, analyzed the genetic relationship of <i>H. parasitica</i> was at the species and genera levels by PCR method, nucleotide sequencing, and molecular evolutionary analysis. The analysis showed that the <i>rbcL</i> gene has 547 nucleotides, the coverage is from 99 - 100%, and the similarity rate with the <i>rbcL</i> sequences of other species in the Asclepiadaceae family on GenBank ranges from 98.90 - 99.82%. The phylogenetic tree based on the <i>rbcL</i> sequence of species of the <i>Hoya</i> genus and species of the Asclepiadaceae family has been established. The <i>rbcL</i> gene sequence may be a candidate for chloroplast DNA barcoding for genera-level identification.
KEYWORDS <i>rbcL</i> gene <i>Hoya parasitica</i> cpDNA barcoding Phylogeny Molecular Evolution	

PHÂN TÍCH VÙNG GENE LỤC LẠP, *rbcL*, PHÂN LẬP TỪ CÂY LAN TAI CÁO (*Hoya parasitica* (Roxb.) Wall. ex Wight)

Hoàng Việt Cường¹, Mai Thị Hoàng Anh¹, Từ Quang Tân^{2*}, Chu Hoàng Mậu²

¹Sở Giáo dục & Đào tạo Thái Nguyên

²Trường Đại học Sư phạm - ĐHTN Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 29/12/2022 Ngày hoàn thiện: 30/01/2023 Ngày đăng: 31/01/2023	Lan tai cáo (<i>Hoya parasitica</i> (Roxb.) Wall. ex Wight), một loài thực vật sống phụ sinh, vừa là cây cảnh, vừa là cây dược liệu quý. Lan tai cáo chứa nhiều dược chất có hoạt tính sinh học có tác dụng chữa trị một số bệnh ở người. Lan tai cáo có hình thái tương tự một số loài thuộc chi <i>Hoya</i> và họ Thiên lý. Làm thế nào để nhận diện được các loài, các chi trong họ Thiên lý khi hình thái, sự sinh trưởng và phát triển của cây chưa đầy đủ, hoặc mẫu cây bị biến dạng hay ở dạng bột là câu hỏi đặt ra cho nghiên cứu này. Trong công trình này, gene <i>rbcL</i> được phân lập, giải trình tự và phân tích mối quan hệ di truyền của Lan tai cáo ở cấp độ loài và chi bằng phương pháp PCR, giải trình tự nucleotide và phân tích tiến hoá phân tử. Kết quả phân tích cho thấy, gene <i>rbcL</i> có 547 nucleotide, có độ che phủ từ 99 - 100% và tỷ lệ tương đồng với các trình tự <i>rbcL</i> của các loài khác trong họ Thiên lý trên GenBank từ 98,90 - 99,82%. Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự <i>rbcL</i> của các loài thuộc chi <i>Hoya</i> và các loài thuộc họ Thiên lý đã được thiết lập. Trình tự gen <i>rbcL</i> có thể là ứng cử viên mã vạch DNA lục lap để định danh ở cấp độ chi.
TỪ KHÓA Gene <i>rbcL</i> Lan tai cáo Mã vạch cpDNA Phát sinh chủng loại Tiến hoá phân tử	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.7181>

* Corresponding author. Email: tantq@tnue.edu.vn

1. Giới thiệu

Lan tai cáo (*Hoya parasitica* (Roxb.) Wall. ex Wight) được biết đến là loại cây thuốc, được sử dụng làm thuốc lợi sữa, chống suy thận cấp và chữa trị làm lành các vết thương [1]. Lan tai cáo sống phụ sinh, ít khi ở dưới đất. Loài cây này phân bố ở nhiều quốc gia thuộc vùng Tây Á và Đông Nam Á. Ở Việt Nam, Lan tai cáo được tìm thấy trong tự nhiên ở Hà Nam (Võ Xá), Bà Rịa - Vũng Tàu (Núi Dinh) và một số địa phương khác [2]. Trong hệ thống phân loại, Lan tai cáo có tên khoa học là *Hoya parasitica* thuộc chi *Hoya*, họ Thiên lý (Asclepiadaceae) [2].

Trong những năm gần đây, việc nhận diện cây được liệu phục vụ khai thác, chế biến và sử dụng được nhiều tác giả quan tâm, không những dựa vào các đặc điểm hình thái, giải phẫu [3], mà còn dựa trên các chỉ thị DNA [4], [5]. Định danh loài bằng chỉ thị phân tử DNA hay mã vạch DNA (DNA barcoding) là một công cụ cho tính chính xác cao và nhanh chóng. Đặc biệt, bằng việc sử dụng trình tự DNA ngắn, định danh loài bằng chỉ thị DNA là hữu dụng đối với các loài có hình thái tương tự, hoặc đối với cây có hình thái và sự sinh trưởng, phát triển chưa đầy đủ, hoặc mẫu cây bị biến dạng hay ở dạng bột [4], [6].

DNA lục lạp (chloroplast DNA- cpDNA) có nhiều đặc điểm phù hợp với việc xây dựng mã vạch DNA, như cấu trúc của cpDNA là vòng kép, bền vững và chứa nhiều vùng gene bảo thủ. Đặc điểm này đã được nhiều tác giả nghiên cứu ứng dụng trong phân loại học phân tử và phân tích phát sinh loài thực vật. Một số ít nghiên cứu giải mã và phân tích đặc điểm hệ gene lục lạp ở cây được liệu đã được công bố như Sâm Ngọc Linh [7], cây Sưa [8], cây *Adinandra megaphylla* [9]. Tuy nhiên, cho đến nay chưa tìm thấy báo cáo nào công bố về việc sử dụng mã vạch là các vùng gene thuộc hệ gene lục lạp (chloroplast genome) của loài Lan tai cáo (*H. parasitica*). Một số vùng gene lục lạp như *matK*, *rbcL*, *psbA-trnH*, *atpF-atpH*... và vùng gene nhân (*ITS-rDNA*) đang được ứng dụng rộng rãi trong phân tích tiến hoá phân tử và nghiên cứu mối quan hệ phát sinh chủng loại (phylogeny), phân loại học (taxonomy) và định danh loài (identity) ở thực vật [10], [11]. Cùng với các gene lục lạp khác, gene mã hoá tiểu đơn vị lớn của ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (*rbcL*) trong hệ gene lục lạp cũng được sử dụng trong phân tích phát sinh chủng loại ở thực vật [12]. Ribulose- 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) là nền tảng của quá trình cố định CO₂ trong khí quyển trong quá trình quang hợp. Ribulose- 1,5-bisphosphate carboxylase xúc tác việc bổ sung CO₂ vào ribulose 1,5-bisphosphate (RuBP) đã được enol hóa, tạo ra 3-phosphoglycerate, sau đó được chuyển hóa thành đường [13].

Gene *rbcL* là một trình tự DNA thuộc cpDNA và vùng mã hóa của gene *rbcL* có tính phổ quát, dễ khuếch đại và phân tích nên có thể được sử dụng làm mã vạch DNA [14], [15]. Trình tự gene *rbcL* có mức độ đột biến thấp và tương đồng cao giữa các loài cùng chi [16]. Nghiên cứu này nhằm mục đích khuếch đại và giải trình tự nucleotide của gene *rbcL* từ cây Lan tai cáo (*H. parasitica*), thiết lập cây phát sinh chủng loại, tìm kiếm chỉ thị cpDNA phục vụ định danh loài hoặc chi. Các kết quả nghiên cứu thu được nhằm bổ sung dẫn liệu khoa học về đặc điểm di truyền tiến hoá phân tử của cây Lan tai cáo ở Việt Nam.

2. Phương pháp nghiên cứu

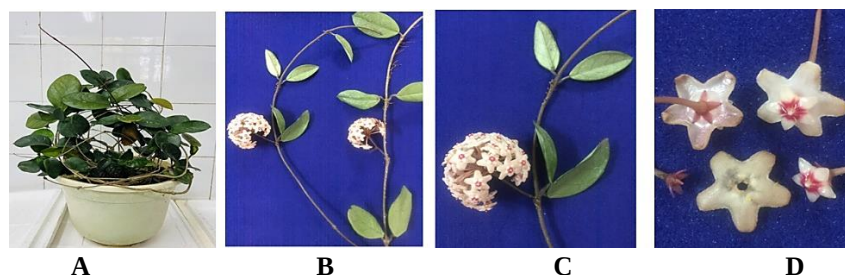
2.1. Vật liệu

Mẫu lá được thu từ cây Lan tai cáo (*H. parasitica*) đang được lưu giữ tại vườn Thực nghiệm Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên –Ký hiệu TN (Hình 1).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khuếch đại và giải trình tự gene *rbcL*

Tách chiết DNA tổng số theo phương pháp CTAB theo Saghai Maroof và cộng sự (1984) [17]. Nhân bản gene *rbcL* bằng PCR trên thiết bị Biorad T100 với cặp mồi *rbcLa-F/rbcLa-R* có trình tự nucleotide được trình bày ở bảng 1. Chu trình nhiệt của PCR gồm 95° trong 5 phút, lặp lại 35 chu kỳ với 95° trong 30 giây, 56° - 30 giây, 72° - 60 giây; 72° trong 5 phút, 25° - 2 phút.



Hình 1. Hình ảnh Lan tai cáo (*Hoya parasitica* (Roxb.) Wight). A. Lan tai cáo trồng trong chậu; B, C: Thân Lan tai cáo mang cụm hoa; D: Hoa Lan tai cáo

Bảng 1. Trình tự nucleotide của cặp mồi PCR nhân bản gene *rbcL*

Cặp mồi	Trình tự nucleotide (5' -3')	Kích thước dự kiến (kb)
rbcLa-F/rbcLa-R	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC GTAAAATCAAGTCCACCRCG	~ 600

Trình tự nucleotide của gene *rbcL* của Lan tai cáo được xác định trên thiết bị ABI 3500xl và phân tích bằng phần mềm BioEdit, BLAST trong NCBI.

2.2.2. Phân tích di truyền tiến hoá phân tử

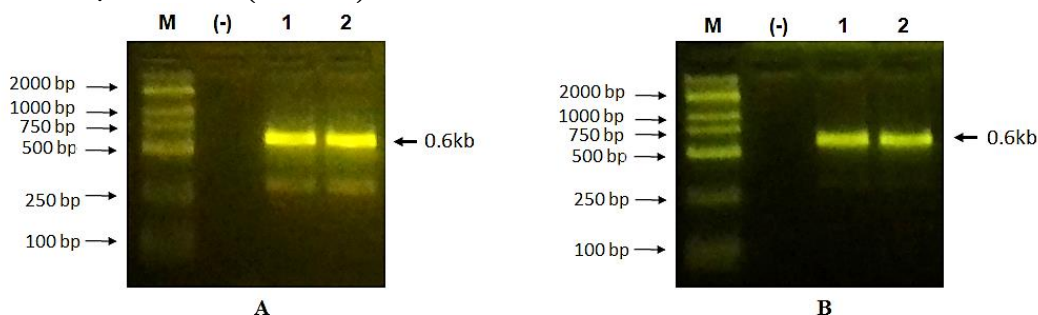
Phân tích tiến hoá phân tử và thiết lập cây phát sinh chủng loại thực hiện bằng MEGA X [18]. Phân tích tiến hóa phân tử theo phương pháp Maximum Likelihood (ML). Lịch sử tiến hóa được suy luận bằng phương pháp ML và mô hình Tamura-Nei [19]. Sơ đồ hình cây gồm các đơn vị phân loại được nhóm lại với nhau, với giá trị bootstrap với 1000 lần lặp lại được hiển thị bên cạnh các nhánh [20]. Phân tích này liên quan đến 37 trình tự nucleotide. Các vị trí codon bao gồm 1st+2nd+3rd+Noncoding. Tất cả các vị trí chứa khoảng trống và dữ liệu bị thiếu đã bị loại bỏ và có tổng cộng 196 vị trí trong tập dữ liệu cuối cùng.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả nhân bản và giải trình tự gene *rbcL*

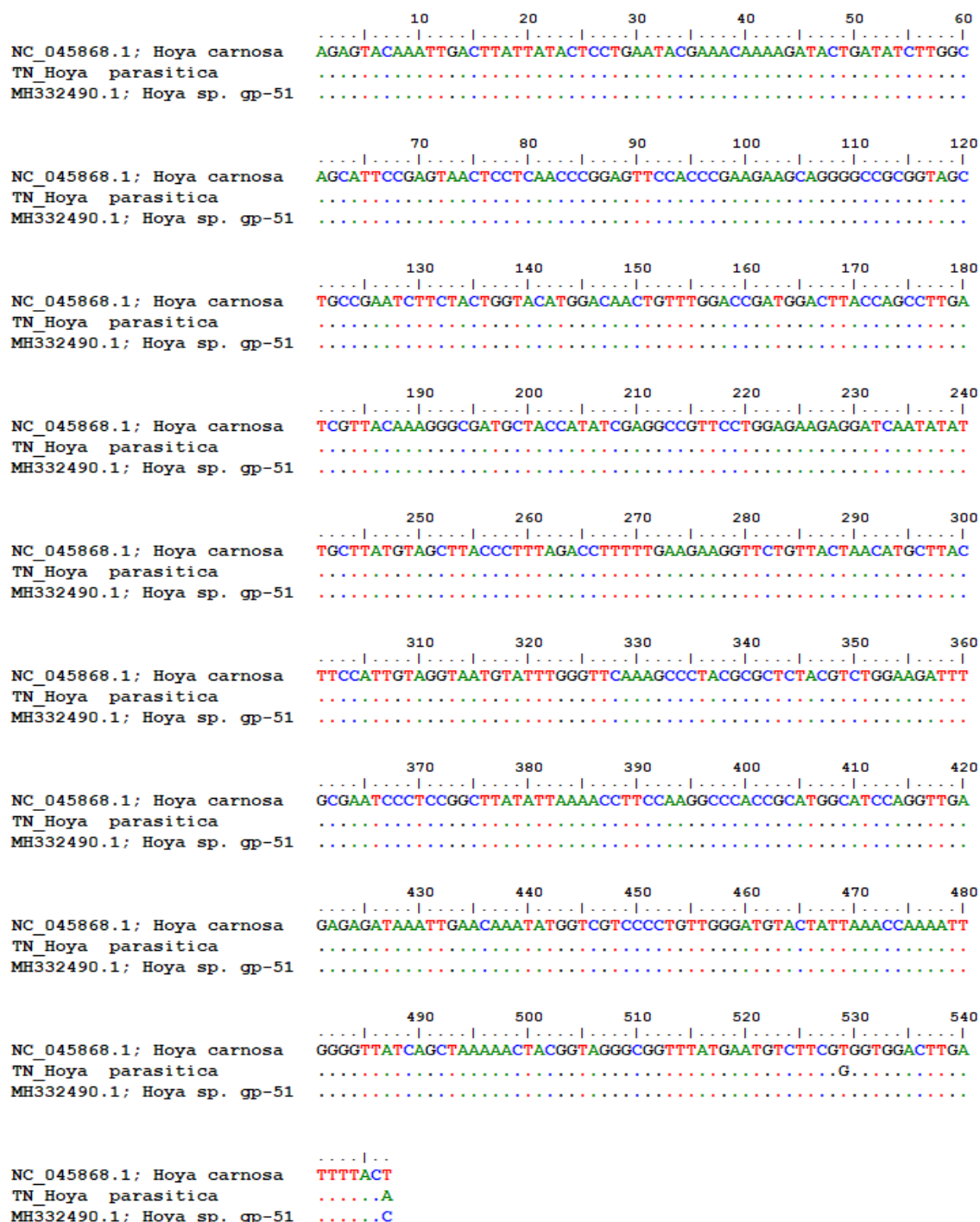
DNA tổng số tách từ lá Lan tai cáo có hàm lượng 356,20 ng/μL. Kết quả kiểm tra DNA tách chiết được bằng quang phổ hấp thụ thu được tỷ lệ $A_{260}/A_{280} = 2,07$ đã cho thấy DNA đảm bảo chất lượng cho PCR để nhân bản gene *rbcL*.

Tiến hành phản ứng PCR để khuếch đại gene *rbcL* từ DNA tách chiết được và điện di kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose 1,0%, kết quả thu được đoạn DNA có kích thước khoảng hơn 0,6 kb đúng như kích thước dự kiến (Hình 2A). Phân đoạn DNA (gene *rbcL*) thu được từ gel điện di được tinh sạch và kiểm tra bằng điện di, kết quả cho thấy phân đoạn DNA đảm bảo độ tinh sạch để giải trình tự nucleotide (Hình 2B).



Hình 2. Ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân bản gene *rbcL* (A) và điện di kiểm tra độ tinh sạch sản phẩm PCR (B). M: Thang DNA; (-) H₂O làm đối chứng âm; 1, 2: Gene *rbcL* của mẫu TN 1 và 2

Kết quả giải trình tự nucleotide và xử lý bằng phần mềm BioEdit cho thấy gene *rbcL* của mẫu TN có 547 nucleotide (Hình 3). So với loài *Hoya carnosa* mang mã số NC_045868.1 trên GenBank thì trình tự gene *rbcL* của loài Lan tai cáo (*H. parasitica*) phân lập từ mẫu TN cơ bản giống nhau, chỉ khác ở vị trí 529 (T → G) và ở vị trí 547 (T → A); còn khi so sánh với *Hoya sp.* gp-51 lại chỉ khác ở vị trí 547 (C → A). Kết quả này cho thấy gene *rbcL* có tính bảo thủ cao.



Hình 3. Trình tự nucleotide của gene *rbcL* của *H. parasitica* TN so với trình tự gene *rbcL* của *Hoya carnosa* mang mã số NC_045868.1 và *Hoya sp.* gp-51 trên GenBank

3.2. Phân tích tiến hoá phân tử và sự phát sinh chủng loại

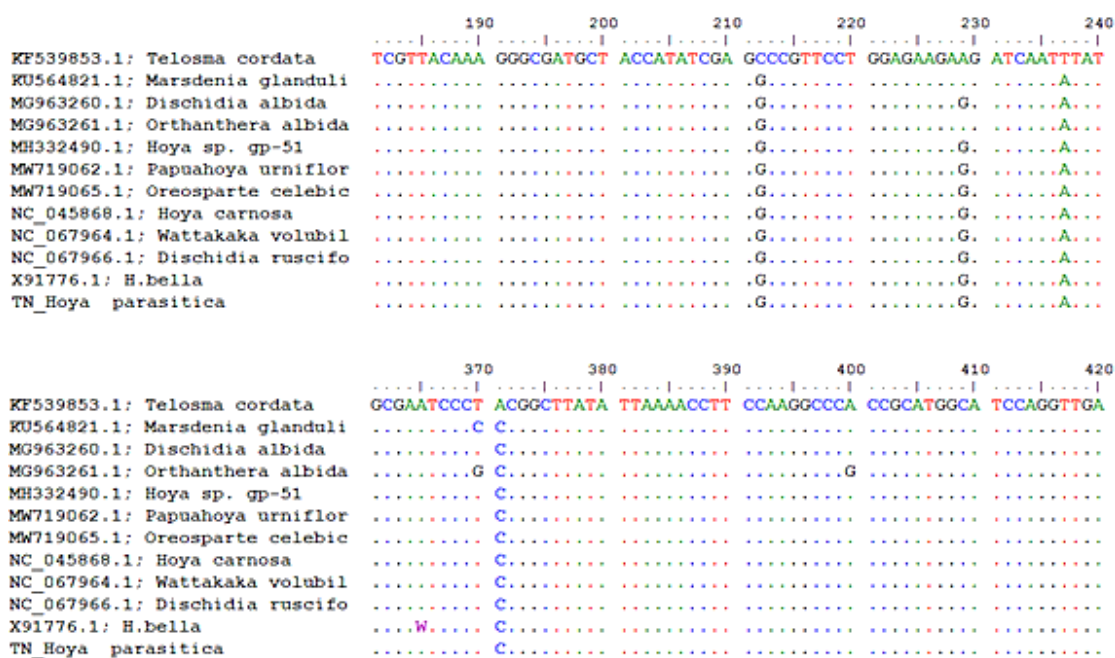
Sử dụng chương trình phân tích tương đồng trực tuyến BLAST trong NCBI, kết quả cho thấy dữ liệu gene *rbcL* phân lập từ loài Lan tai cáo (*H. parasitica*) có độ che phủ từ 99 - 100% và tỷ lệ tương đồng với các trình tự *rbcL* của các loài khác từ 98,90 - 99,82%. Từ 100 trình tự gene *rbcL* của các loài thuộc chi *Hoya*, các loài thuộc các chi khác trong họ Asclepiadaceae và các đối tượng thực vật khác, 36 trình tự *rbcL* của các loài thuộc chi *Hoya* và trình tự *rbcL* của Lan tai cáo đã được chọn làm dữ liệu phân tích tiến hoá phân tử và xây dựng cây phát sinh chủng loại. Hình 4 thể hiện cây phát sinh loài được thiết lập bằng MEGAX dựa trên trình tự nucleotide của gene *rbcL* phân lập từ loài Lan tai cáo (*H. parasitica*) và 36 trình tự *rbcL* của các loài khác thuộc chi *Hoya* trên GenBank.



Hình 4. Cây phát sinh chủng loại ở cấp độ loài của các mẫu nghiên cứu dựa trên trình tự gene *rbcL* phân lập từ Lan tai cáo, (*H. parasitica*) mẫu TN và 36 trình tự *rbcL* của các loài khác trên GenBank

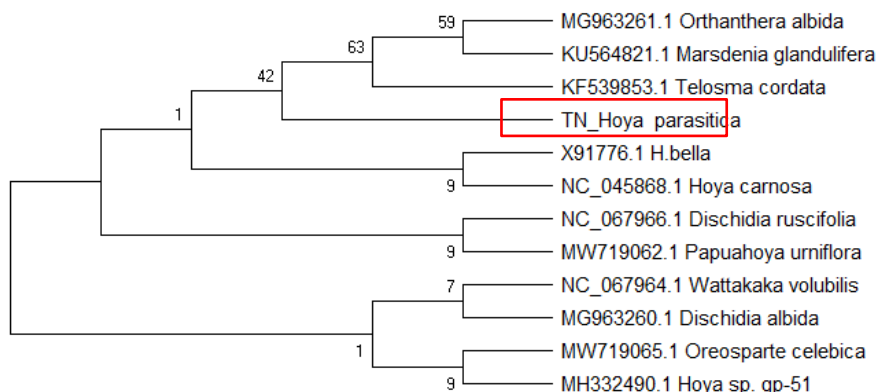
Sơ đồ phát sinh chủng loại của loài *H. parasitica* và các loài khác thuộc chi *Hoya* ở hình 4 cho thấy 37 mẫu *Hoya* được chia làm hai nhánh, nhánh I chỉ có loài *Hoya pubicalyx* (mã số OL754663) và nhánh II gồm 36 mẫu *Hoya* còn lại. Nhánh II lại chia làm hai nhóm, nhóm 1 có 4 loài và nhóm 2 gồm 32 loài. Loài Lan tai cáo (*H. parasitica*) nằm trong nhóm 2.

cpDNA có dạng vòng kép, với kích thước khoảng 85-2000 kb. Hệ gene lục lạp có kích thước nhỏ và có cấu trúc ổn định. Hệ gene lục lạp bảo thủ hơn so với hệ gene nhân với mức độ thay thế nucleotide trung bình thấp và không trải qua quá trình tái tổ hợp. cpDNA kiểm soát tổng hợp các phân tử RNA vận chuyển (tRNA), RNA ribosome (rRNA) và hầu hết các loại protein được tìm thấy trong lục lạp. Ba mươi vùng mã hoá cho các phức hợp protein quang hợp tạo thành các tiểu đơn vị, cụ thể là cho photosystem I, photosystem II, ribulose-1,5-biphosphate carboxylase-oxygenase, cytochrome b6-f complex và ATP synthase. Protein ribulose-1,5-biphosphate carboxylase-oxygenase (RuBisCO) là một loại enzyme quan trọng tham gia vào quá trình cố định carbon trong quá trình quang hợp. RuBisCO được mã hóa bởi gene *rbcL* thuộc cpDNA. Kết quả phân tích BLAST trên NCBI trong nghiên cứu này cho thấy trình tự *rbcL* giữa các loài *Hoya* có tỷ lệ tương đồng cao (98,90 - 99,82%) và gene *rbcL* phân lập từ Lan tai cáo là nghiên cứu đầu tiên cho loài *H. parasitica*. Một số nghiên cứu đã báo cáo và nhận xét rằng, gene *rbcL* có thể sử dụng làm mã vạch nhận diện mức độ chi [21], [22]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, khi so sánh với 36 dữ liệu gene *rbcL* thuộc các loài khác nhau của chi *Hoya* trên GenBank đã cho thấy gene *rbcL* có tính bảo thủ cao, khó có thể sử dụng làm chỉ thị phân tử để phân biệt được ở mức độ loài (Hình 4). Kết quả so sánh trình tự gene *rbcL* phân lập từ Lan tai cáo (*H. parasitica*) với 11 trình tự *rbcL* của một số loài trong họ Thiến lý (Asclepiadaceae) cho thấy có sự sai khác so với loài *Telosma cordata* ở các vị trí 212, 229, 237, 370, 371 và một số vị trí khác (Hình 5).



Hình 5. Một số vị trí sai khác từ vị trí 190-240 và 370-420 giữa 12 trình tự gene *rbcL* của một số loài trong họ Thiến lý

Kết quả phân tích phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gene *rbcL* với 545 vị trí nucleotide của loài *H. parasitica* với 11 loài thuộc các chi khác nhau trong họ Thiến lý cho thấy, các loài phân bố ở các nhánh khác nhau với hệ số bootstrap với 1000 lần lặp lại được hiển thị bên cạnh các nhánh là rất thấp. Kết quả này đã củng cố nhận xét trình tự gene *rbcL* có thể sử dụng làm chỉ thị phân tử cpDNA trong định danh thực vật ở mức độ chi (Hình 6).



Hình 6. Cây phát sinh chủng loại ở cấp độ chi của các mẫu nghiên cứu dựa trên trình tự gene *rbcL* phân lập từ Lan tai cáo mẫu TN và 11 trình tự *rbcL* của các loài thuộc một số chi khác trong họ Thiến lý

4. Kết luận

Gene *rbcL* đã được khuếch đại, giải trình tự nucleotide thành công từ cpDNA của cây Lan tai cáo (*H. parasitica*) với kích thước 547 bp. Trình tự gene *rbcL* của Lan tai cáo có độ tương đồng hơn 99% với trình tự gene *rbcL* của các loài khác thuộc chi *Hoya*. Trình tự gene *rbcL* có tính bảo thủ cao và khó có thể được sử dụng làm chỉ thị phân tử để phân biệt các đối tượng thực vật ở mức độ loài. Kết quả phân tích tiến hoá phân tử và sự phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gene *rbcL* của loài Lan tai cáo và một số loài thuộc chi khác trong họ Thiến lý đã cho thấy, gene *rbcL* có thể là ứng cử viên mã vạch cpDNA sử dụng trong định danh chi của họ Thiến lý (Asclepiadaceae).

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Bộ Giáo dục và Đào tạo thông qua đề tài cấp Bộ, mã số B2022-TNA-22-CT 562. Các tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] Medicinal Search, "Hoya parasitica (Roxb.) Wall. ex Wight,". [Online]. Available: <https://tracuuduoclieu.vn/hoya-parasitica-roxb-wall-ex-wight-asclepias-parasitica-roxb.html>. [Accessed Dec. 26, 2022].
- [2] H. H. Pham, *Plants of Vietnam*. Ho Chi Minh City Youth Publishing House, pp. 473-475, 2003.
- [3] T. T. H. Pham, T. T. H. Nguyen, T. P. T. Cao, T. N. L. Nguyen, Q. T. Tu, and H. M. Chu, "Morphological and anatomical characteristics of wild and *in vitro* of *Hoya parasitica* Wall. ex Wight," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 228, no. 01, pp. 401-407, 2022.
- [4] P. D. N. Hebert, E. H. Penton, J. M. Burns, D. H. Janzen, and W. Hallwachs, "Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the Neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 101, pp. 14812-14817, 2004.
- [5] V. Manzanilla, A. Kool, and N. L. Nguyen, "Phylogenomics and barcoding of *Panax*: toward the identification of ginseng species," *BMC Evol Biol.*, vol. 18, no. 44, 2018, doi: [10.1186/s12862-018-1160-y](https://doi.org/10.1186/s12862-018-1160-y).
- [6] H. Ledford, "Botanical identities," *Nature*, vol. 451, 2008, Art. no. 616, doi: [10.1038/451616b](https://doi.org/10.1038/451616b).
- [7] T. T. H. Le, D. B. Hugo, M. Vincent, V. H. Ha, and V. H. Nong, "Genome sequencing in plants and the genus *Panax* L," *VAST Journal of Biotechnology*, vol. 14, pp. 1-13, 2016.
- [8] Y. Lee, Y. I. Kim, S. Y. Kim, T. B. Tran, S. Eum, T. T. Nguyen, and S. Choi, "The complete chloroplast genome sequence of avulnerable legume species *Dalbergiatonkinensis* prain in Vietnam," *Mitochondrial DNA Part B*, vol. 4, pp. 2604-2605, 2019, doi: [10.1080/23802359.2019.1641441](https://doi.org/10.1080/23802359.2019.1641441).
- [9] H. Q. Nguyen, T. N. L. Nguyen, T. N. Doan, T. T. N. Nguyen, M. H. Pham, T. L. Le, D. T. Sy, and H. M. Chu, "Complete chloroplast genome of novel *Adinandra megaphylla* Hu species: molecular

- structure, comparative and phylogenetic analysis,” *Sci Rep.* vol. 11, 2021, Art. no. 11731, doi: 10.1038/s41598-021-91071-z.
- [10] M. Guo, C. Yuan, L. Tao, Y. Cai, and W. Zhang, “Life Barcoded by DNA Barcodes,” *Conservation Genetics Resources*, vol. 14, pp. 351-365, 2022.
- [11] C. P. W. Group, “A DNA Barcode for Land Plants,” *PNAS.*, vol. 106, pp. 12794-12797, 2009.
- [12] N. Sundari and N. Papuungan, “Amplification and Analysis of RbcL Gene (Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase) of Clove in Ternate Island,” *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, vol. 276, 2019, Art. no. 012061, doi: 10.1088/1755-1315/276/1/012061.
- [13] C. Bathellier, L. J. Yu, G. D. Farquhar, and G. Tcherkez, “Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activates O₂ by electron transfer,” *PNAS*, vol. 117, pp. 24234-24242, 2020, doi: 10.1073/pnas.2008824117.
- [14] M. Hasebe, T. Otori, M. Nakazawa, T. Sano, M. Kato, and K. Iwatsuki, “rbcL gene sequen provide evidence for the evolutionary lineages of leptosporangiate ferns,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 91, pp. 5730-5734, 1994.
- [15] S. G. Newmaster, A. J. Fazekas, and S. Ragupathy, “DNA barcoding in land plants: evaluation of rbcL in a multigene tiered approach,” *Canadian Journal of Botany*, vol. 84, pp. 335-341, 2006.
- [16] E. A. Kellogg and N. D. Juliano, “The structure and function of RuBisCO and their Implications for Systematic Studies,” *American Journal of Botany*, vol. 84, pp. 413-428, 1997.
- [17] M. A. S. Maroof, K. M. Soliman, R. A. J. Orgensen, and R. W. Allard, “Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics,” *PNAS*, vol. 81, pp. 8014-8019, 1984.
- [18] S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura, “MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms,” *Molecular Biology and Evolution*, vol. 35, pp. 1547-1549, 2018.
- [19] K. Tamura and M. Nei, “Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees,” *Molecular Biology and Evolution*, vol. 10, pp. 512-526, 1993.
- [20] J. Felsenstein, “Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap,” *Evolution*, vol. 39, pp. 783-791, 1985.
- [21] S. Sundari, I. Khadijah, A. M. Jayali, and N. H. Sukanto, “The application of barcode DNA rbcL gene for identification of medicinal plants: red jabon and gofasa,” *IOP Conf. Series: Journal of Physics: Conf. Series*, vol. 1146, 2019, Art. no. 012030, doi: 10.1088/1742-6596/1146/1/012030.
- [22] S. O. Bafeel, I. A. Arif, M. A. Bakir, A. A. Al Homaidan, A. H. Al Farhan, and H. A. Khan, “DNA barcoding of arid wild plants using rbcL gene sequences,” *Genet. Mol. Res.*, vol. 11, pp. 1934-1941, 2012.