

CHARACTERISTICS OF THE *trnL* GENE REGION AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF *Hoya parasitica* (Roxb.) Wall. ex Wight

Tu Quang Tan*, Pham Thi Thu Hien

TNU - University of Education

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 16/3/2023 Revised: 18/4/2023 Published: 20/4/2023	In plants, finding specificity DNA barcodes for species identification is still tricky. Several chloroplast gene regions have been studied and proposed as DNA markers for species identification. The <i>trnL</i> gene region in the chloroplast genome consists of intron <i>trnL</i>(UAA) located between two exons in the large single-copy region and intron <i>trnL</i>(UAA), which is a hypervariable region. <i>Hoya parasitica</i> (Roxb.) Wight) of the <i>Hoya</i> genus is a precious herbal plant. <i>H. parasitica</i> leaves have been used to treat some diseases in humans. The question is, is it possible to use the <i>trnL</i> gene region as a barcode to identify <i>H. parasitica</i> species when the plant samples are deformed or in powder form? This study presents the results of characteristics of the <i>trnL</i> gene region by amplification and nucleotide sequencing method and analysis of molecular evolution using MEGAX; simultaneously suggests potential barcodes for species identification of <i>H. parasitica</i>. The isolation and nucleotide sequencing results showed that the <i>trnL</i> gene region was 829 bp in size. The phylogenetic tree was built based on 32 <i>trnL</i> sequences, showing species distributed in 5 groups and samples <i>H. parasitica</i> TN1 and <i>H. pubicalyx</i> distributed in the same group. The <i>trnL</i> gene region is proposed as a potential chloroplast DNA barcoding candidate for <i>H. parasitica</i> species identification.
KEYWORDS Chloroplast DNA marker <i>Hoya parasitica</i> Phylogenetic tree <i>trnL</i> gene region <i>trnL</i>(UAA) intron	

ĐẶC ĐIỂM CỦA VÙNG GENE *trnL* VÀ PHÂN TÍCH SỰ PHÁT SINH LOÀI *Hoya parasitica* (Roxb.) Wall. ex Wight

Tu Quang Tân*, Phạm Thị Thu Hiền

Trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 16/3/2023 Ngày hoàn thiện: 18/4/2023 Ngày đăng:	Ở thực vật, việc tìm kiếm mã vạch DNA đặc hiệu để định danh loài còn gặp nhiều khó khăn. Một số vùng gene lục lạp đã được nghiên cứu và đề xuất làm chỉ thị DNA sử dụng trong định danh loài. Vùng gene <i>trnL</i> trong hệ gene lục lạp gồm intron <i>trnL</i>(UAA) nằm giữa hai exon trong vùng sao chép đơn lớn và intron <i>trnL</i>(UAA) là vùng siêu biến. <i>Hoya parasitica</i> (Roxb.) Wight) thuộc chi <i>Hoya</i> là cây thảo dược quý. Lá <i>H. parasitica</i> đã được sử dụng để điều trị một số bệnh ở người. Vấn đề đặt ra là có thể sử dụng vùng gene <i>trnL</i> làm mã vạch để nhận diện loài <i>H. parasitica</i> khi các mẫu cây bị biến dạng hoặc ở dạng bột hay không? Nghiên cứu này trình bày kết quả xác định đặc điểm vùng gene <i>trnL</i> bằng phương pháp khuếch đại và giải trình tự nucleotide; phân tích sự tiến hóa phân tử bằng MEGAX; đồng thời đề xuất mã vạch tiềm năng để định danh loài <i>H. parasitica</i>. Kết quả phân lập và giải trình tự nucleotide cho thấy, vùng gene <i>trnL</i> có kích thước là 829 bp. Cây phát sinh gene được xây dựng dựa trên 32 trình tự <i>trnL</i> cho thấy các loài phân bố trong 5 nhóm và mẫu <i>H. parasitica</i> TN1 phân bố cùng một nhóm với <i>H. pubicalyx</i>. Vùng gene <i>trnL</i> được đề xuất là ứng cử viên mã vạch DNA lục lạp tiềm năng phục vụ nhận dạng loài <i>H. parasitica</i>.
TỪ KHÓA Chỉ thị DNA lục lạp <i>Hoya parasitica</i> Cây phát sinh chủng loại Vùng gene <i>trnL</i> Intron <i>trnL</i>(UAA)	

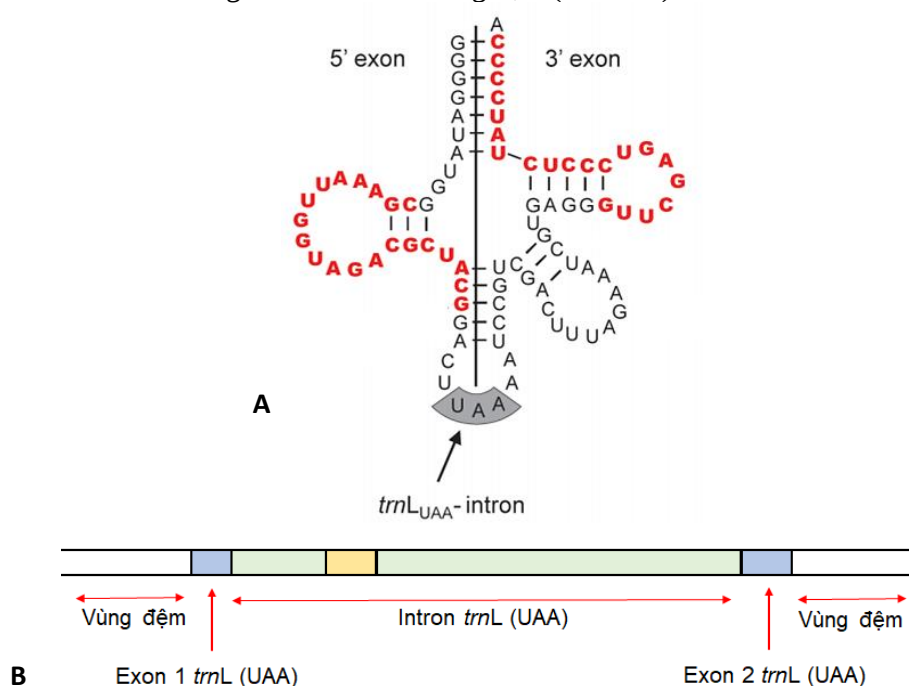
DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.7539>

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

1. Giới thiệu

Trong những năm qua, việc tìm kiếm một đoạn DNA ngắn làm chỉ thị để nhận diện loài sinh vật được quan tâm đặc biệt bởi các nhà khoa học. Ở động vật, một gene ty thể, *cytochrome c oxidase subunit 1 (COX1)* được sử dụng hiệu quả trong định danh loài [1], tuy nhiên, hiện trạng vẫn còn rất nhiều khó khăn trong việc tìm kiếm mã vạch DNA đặc hiệu cho nhận diện loài ở thực vật. Một số đoạn gene trong hệ gene nhân (ITS1, ITS2) hoặc trong hệ gene lục lạp (*matK*, *rpoB*, *rpoC1*, *ycf5*, *rbcL*, *trnH-psbA*, *trnL-F*...) đã được nghiên cứu và đề xuất sử dụng trong định danh loài [2]-[4].

Vùng không mã hóa *trnL-F* của hệ gene lục lạp bao gồm intron *trnL(UAA)* từ vị trí nucleotide 350 đến 600 và đoạn đệm giữa các gene giữa *trnL(UAA)* ở đầu 3' và gene *trnF(GAA)* [5], [6]. Intron *trnL(UAA)* nằm trong vùng sao chép đơn lớn của hệ gene lục lạp làm gián đoạn vòng bộ ba đối mã (anticodon) của tRNA^{Leu} (Hình 1 A). Gene *trnL(UAA)* gồm exon 1, intron và exon 2 được ngăn cách với các vùng DNA khác bởi vùng đệm (Hình 1B).



Hình 1. Sơ đồ vùng gene *trnL* ở thực vật (A) và tRNA^{Leu} (UAA) (B) [7]

Trong DNA lục lạp, *trnL* là vùng gene chứa intron có khả năng xúc tác cho quá trình ghép nối của chính chúng với các exon bên cạnh. Cấu trúc bậc II của *trnL* intron chứa các vùng của các trình tự bổ sung tạo thành chín cấu trúc vòng từ P1 đến P9 [8]. Vùng vòng lặp gốc P8 của intron *trnL* được biết là có kích thước siêu biến đổi với nhiều kiểu lặp lại [9], [10]. Thuộc tính siêu đột biến của intron *trnL(UAA)* là cơ sở thiết lập mã vạch DNA trong phân biệt loài và nghiên cứu phát sinh chủng loài và tiến hoá phân tử của chi *Hoya*.

Hoya là một chi gồm hơn 500 loài thuộc họ Apocynaceae. Hầu hết có nguồn gốc từ một số quốc gia châu Á như Philippines, Ấn Độ, Thái Lan, Malaysia, Việt Nam, Bangladesh, Indonesia, Polynesia, New Guinea và nhiều loài cũng được tìm thấy ở Australia [11]. Lan Tai cáo (*Hoya parasitica* (Roxb.) Wight) là cây dược liệu thuộc chi *Hoya* được sử dụng trong y học cổ truyền, chữa trị một số bệnh như suy thận cấp, chữa lành các vết thương, lợi sữa [12]. Mục tiêu của nghiên cứu này phân tích đặc điểm của trình tự gene *trnL* phân lập từ cây *Hoya parasitica* thu tại Thái Nguyên và xây dựng cây phát sinh chủng loài của các loài thuộc chi *Hoya* dựa trên trình tự

đoạn gene này; đồng thời xác định vùng gene *trnL* là ứng viên mã vạch DNA lục lập phục vụ định danh loài thuộc chi *Hoya*.

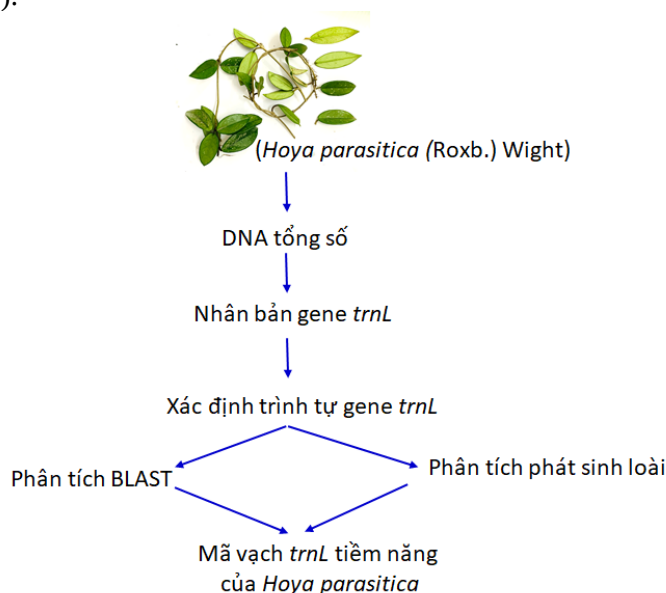
2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Mẫu cây *H. parasitica* thu tại huyện Võ Nhai, Thái Nguyên được kí hiệu là TN1 và được định danh là loài *H. parasitica* bằng phương pháp hình thái so sánh. Mẫu cây *H. parasitica* đang trồng tại vườn Thực nghiệm Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên. Đặc điểm hình thái và giải phẫu của loài *H. parasitica* đã được mô tả bởi Phạm Thị Thu Hiền và cộng sự (2022) [13].

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết DNA tổng số từ mẫu cây *H. parasitica* và khuếch đại *trnL* từ DNA bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu. Phân lập đoạn DNA từ gel điện di và tinh sạch. Giải trình tự nucleotide gene *trnL*. Trình tự *trnL* được phân tích bằng BLAST trong NCBI và sử dụng để phân tích phát sinh chủng loại (Hình 2).



Hình 2. Sơ đồ thí nghiệm phân tích gene *trnL* và phát sinh loài *H. parasitica*

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

DNA tổng số được chiết rút từ mẫu lá *H. parasitica* theo phương pháp CTAB [14]. Cụ thể là hút 600 μ l buffer CTAB 2X cho vào ống eppendorf 1,5 ml, sau đó ủ ở 65°C trên heatblock. Cắt nhỏ 100 mg lá *H. parasitica*, làm nhuyễn. Thêm 600 μ l dung dịch CTAB 2X đã ủ và đảo đều. Hút toàn bộ dung dịch sau khi nghiền cho vào eppendorf 1,5 ml, bỏ bã, tiến hành ủ mẫu tiếp ở 65°C trong 1 giờ. Hút 500 μ l dịch trong phía trên chuyển sang ống eppendorf 1,5 ml mới. Thêm 500 μ l dung dịch isopropanol đảo nhẹ, ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Ly tâm 13000 vòng trong 5 phút, đổ bỏ dịch trong phía trên, thu tủa. Tiếp tục thêm 400 μ l dung dịch ethanol 70%, đảo nhẹ, ly tâm 13000 vòng trong 5 phút, đổ bỏ dịch trong phía trên, thu tủa. Mở nắp để khô tự nhiên trong 5-10 phút. Hòa tan tủa (DNA) trong 50 μ l dung dịch TE1X. Gene *trnL* được khuếch đại bởi PCR với cặp mồi *trnL*-F/*trnL*-R (Bảng 1) bằng thiết bị Biorad T100. Chu trình nhiệt của PCR gồm 95° trong 5 phút, lặp lại 35 chu kỳ với 95° trong 30 giây, 52° - 30 giây, 72° - 60 giây; 72° trong 5 phút, 25° - 2 phút.

Bảng 1. Trình tự nucleotide của cặp mồi PCR nhân bản gen *trnL*

Cặp mồi	Trình tự nucleotide (5' -3')	Kích thước dự kiến (kb)
<i>trnL</i> -F/ <i>trnL</i> -R	TGGCGAAATTGGTAGACGC AACCATCTCGTCTCTCTGA	~ 800

Xác định trình tự nucleotide của gene *trnL* thực hiện trên thiết bị ABI 3500xl và trình tự nucleotide được phân tích bằng phần mềm BioEdit, BLAST trong NCBI.

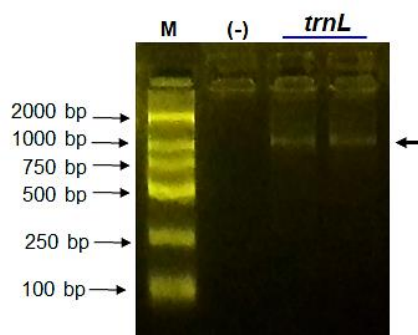
2.2.2. Phân tích di truyền tiến hoá phân tử

Sử dụng phần mềm MEGA X [15] cho phân tích phát sinh gene *trnL*. Mô hình Tamura-Nei và phương pháp Maximum Likelihood (ML) được sử dụng trong phân tích sự tiến hóa phân tử [16]. Giá trị bootstrap với 1000 lần lặp lại được hiển thị bên cạnh các nhánh trên sơ đồ hình cây [17].

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Đặc điểm của trình tự gene *trnL* phân lập từ cây *H. parasitica*

DNA tổng số tách từ lá *H. parasitica* có chất lượng đảm bảo tiến hành phản ứng PCR khuếch đại gene *trnL*. Đoạn gene *trnL* được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,0% và một băng DNA có kích thước khoảng hơn 0,8 kb đúng với gene *trnL* như dự kiến (Hình 3). Đoạn gene *trnL* thu được từ gel điện di được tinh sạch và giải trình tự nucleotide.

**Hình 3.** Kết quả kiểm tra sản phẩm khuếch đại gene *trnL* của cây *H. parasitica*

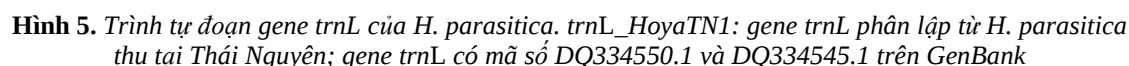
M: Thang DNA; (-) Đối chứng âm là H₂O; 1, 2: Gene *trnL* của mẫu *H. parasitica* TN1.

Kích thước đoạn gene *trnL* phân lập từ cây *H. parasitica* sau khi xử lý bằng BioEdit là 829 bp. Phân tích bằng BLAST trong NCBI cho thấy trình tự *trnL* của *H. parasitica* có tỷ lệ tương đồng rất cao so với trình tự *trnL* của hai loài *Hoya pubicalyx* (mã số DQ334530.1) và *Hoya imbricata* (mã số DQ334545) trên GenBank là 99,16% (Hình 4).

☒ select all 100 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results	MSA Viewer			
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒ <i>Hoya imbricata</i> tRNA-Leu (trnL) gene, and trnL-F intergenic spacer, partial sequence; chloroplast	Hoya imbricata	1489	1489	100%	0.0	99.16%	842	DQ334545.1
☒ <i>Hoya pubicalyx</i> tRNA-Leu (trnL) gene, and trnL-F intergenic spacer, partial sequence; chloroplast	Hoya pubicalyx	1489	1489	100%	0.0	99.16%	843	DQ334530.1

Hình 4. Phân tích BLAST trong NCBI

Tuy nhiên, trình tự nucleotide của đoạn gene *trnL* của *H. parasitica* TN1 có 7 vị trí nucleotide sai khác (thứ tự bp 68, 69, 139, 172, 417, 715, 772) so với *H. pubicalyx* và *H. imbricata*. Sự sai khác thể hiện ở dạng thêm nucleotide (vị trí 68, 69) và thay thế nucleotide, như A → T; G → C; C → A; A → G ở các vị trí còn lại (Hình 5).



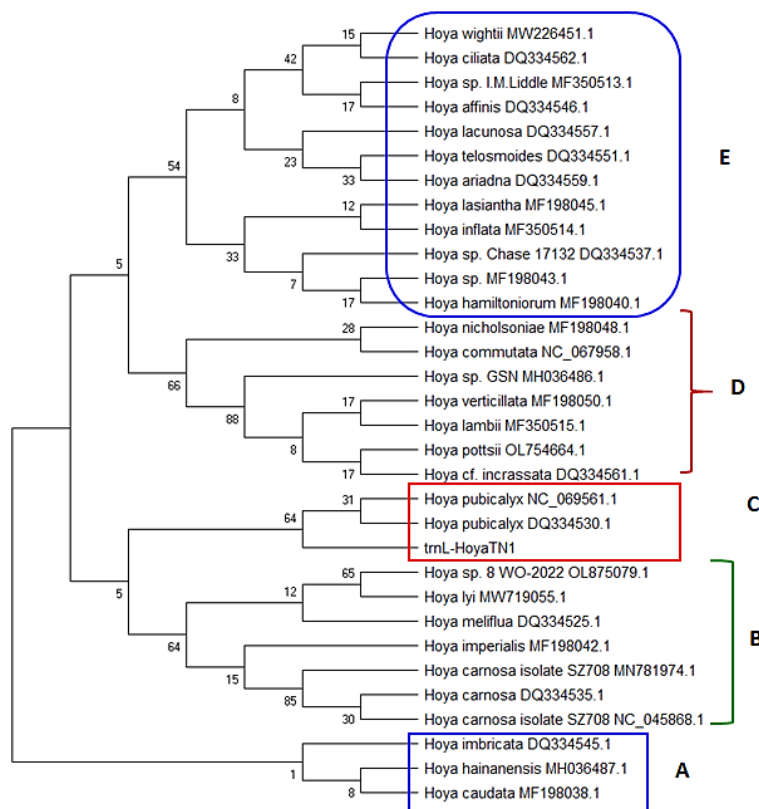
3.2. Phân tích phát sinh gene *trnL* của *H. parasitica*

Phân tích BLAST trình tự gene *trnL* của *H. parasitica* TN1, từ 100 trình tự *trnL*, 31 trình tự đã được lựa chọn với độ che phủ 98-100%, tổng điểm từ 1458-1495 và tỷ lệ tương đồng là 98,43 - 98,92% (Bảng 2).

Bảng 2. Độ che phủ, tổng điểm và tỉ lệ tương đồng của trình tự gene *trnL* ở 31 loài thuộc chi *Hoya* bằng phân tích BLAST trong NCBI

TT	Loài	Mã số	Độ che phủ (%)	Tổng điểm	Tỉ lệ tương đồng (%)
1	<i>trnL-Hoya TN1</i>				
2	<i>Hoya pubicalyx</i>	NC_069561.1	100	1495	99,28
3	<i>Hoya imbricata</i>	DQ334545.1	100	1489	99,16
4	<i>Hoya pubicalyx</i>	DQ334530.1	100	1489	99,16
5	<i>Hoya commutata</i>	NC_067958.1	100	1480	98,92
6	<i>Hoya meliflua</i>	DQ334525.1	100	1480	98,92
7	<i>Hoya sp. 8 WO-2022</i>	OL875079.1	100	1478	98,91
8	<i>Hoya lyi</i>	MW719055.1	100	1478	98,91
9	<i>Hoya sp. TL-2019</i>	MF198043.1	100	1478	98,91
10	<i>Hoya hamiltoniorum</i>	MF198040.1	100	1478	98,91
11	<i>Hoya nicholsoniae</i>	MF198048.1	100	1474	98,80
12	<i>Hoya caudata</i>	MF198038.1	100	1474	98,80
13	<i>Hoya carnososa</i>	NC_045868.1	100	1472	98,79
14	<i>Hoya carnososa</i>	MN781974.1	100	1472	98,79
15	<i>Hoya sp. I.M.Liddle 1705</i>	MF350513.1	100	1472	98,79
16	<i>Hoya pottsii</i>	OL754664.1	100	1472	98,79
17	<i>Hoya carnososa</i>	DQ334535.1	100	1469	98,67
18	<i>Hoya cf.incrassata</i>	DQ334561.1	100	1469	98,67
19	<i>Hoya ciliata</i>	DQ334562.1	100	1469	98,67
20	<i>Hoya verticillata</i>	MF198050.1	100	1469	98,67
21	<i>Hoya affinis</i>	DQ334546.1	100	1467	98,67
22	<i>Hoya hainanensis</i>	MH036487.1	100	1467	98,67
23	<i>Hoya sp. GSN</i>	MH036486.1	100	1467	98,67
24	<i>Hoya wightii</i>	MW226451.1	100	1467	98,67
25	<i>Hoya lambii</i>	MF350515.1	99	1467	98,67
26	<i>Hoya telosmoides</i>	DQ334551.1	100	1463	98,56
27	<i>Hoya ariadna</i>	DQ334559.1	100	1461	98,55
28	<i>Hoya inflata</i>	MF350514.1	100	1461	98,55
29	<i>Hoya sp. Chase17132</i>	DQ334537.1	100	1461	98,55
30	<i>Hoya lacunosa</i>	DQ334557.1	98	1461	98,90
31	<i>Hoya imperialis</i>	MF198042.1	100	1458	98,43
32	<i>Hoya lasiantha</i>	MF198045.1	100	1458	98,43

Sử dụng trình tự gene *trnL* của *H. parasitica* TN1 và 31 trình tự *trnL* trên GenBank ở bảng 2 làm dữ liệu phân tích di truyền tiến hoá phân tử và sự phát sinh chủng loại bằng MEGAX. Tất cả các vị trí chứa khoảng trống và dữ liệu bị thiếu đã bị loại bỏ. Dữ liệu cuối cùng của tất cả 32 trình tự nucleotide của *trnL* là 810 nucleotide. Cây phát sinh gene được thiết lập dựa trên trình tự *trnL* thể hiện ở hình 6. Trên cây phát sinh chủng loại ở hình 6, trình tự *trnL* của 32 loài *Hoya* chia làm hai nhánh lớn, nhánh I có 3 loài (DQ334545, MH036487, MF198038) và nhánh II gồm 29 loài còn lại. Nhánh thứ II lại chia làm hai nhánh phụ và nhánh II.1 có 10 loài, nhánh II.2 có 19 loài. Các loài trong sơ đồ này phân bố trong 5 nhóm (kí hiệu A, B, C, D, E) với hệ số bootstrap phổ biến là thấp. Trình tự gene *trnL* của *H. parasitica* thuộc nhóm C cùng với *Hoya pubicalyx* (NC_069561.1 và DQ334530.1) với hệ số bootstrap là 64%.



Hình 6. Cây phát sinh chủng loại ở mức độ loài thuộc chi *Hoya* được thiết lập từ 32 trình tự gene *trnL*

Như vậy có thể nhận xét rằng, gene *trnL* có thể là chỉ thị DNA lục lạp phục vụ phân biệt các loài thuộc chi *Hoya*. Kết quả này đã xác nhận ý kiến của Taberlet và cộng sự (2006) về vùng gene *trnL* đã mang lại cơ hội đặc biệt để xây dựng mã vạch DNA ở thực vật [7], đồng thời phù hợp với nghiên cứu của Chen và cộng sự (2013) ở Pteridaceae [18], của Kishor và Sharma (2018) ở các loài orchid [19], của Huỳnh và cộng sự (2021) trên cây *Solanum procumbens* [20]. Trong nghiên cứu trước, gene *rbcL* của cây *H. parasitica* đã được đề xuất làm mã vạch DNA để xác định chi *Hoya* của họ Thiên lý (Asclepiadaceae) [21] và ở nghiên cứu này vùng gene *trnL* có thể là ứng cử viên mã vạch DNA sử dụng trong định danh các loài thuộc chi *Hoya*.

4. Kết luận

Vùng gene *trnL* có kích thước 829 bp đã được nhân bản và xác định trình tự nucleotide từ DNA lục lạp của cây *H. parasitica*. Tỷ lệ tương đồng của vùng gene *trnL* của loài *H. parasitica* so với loài *H. pubicalyx* (DQ334530.1) và *Hoya imbricata* (DQ334545) là 99,16%. Vùng gene *trnL* chứa vùng siêu biến intron *trnL*(UAA) có thể được sử dụng làm chỉ thị phân tử để phân biệt loài và vùng gene *trnL* có thể là ứng cử viên mã vạch DNA lục lạp sử dụng trong nhận diện loài thuộc chi *Hoya*.

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] P. D. N. Hebert, S. Ratnasingham, and J. R. De Waard, "Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related animals," *Proc Roy Soc London, Ser B, Biol Sci.*, vol. 270, pp. S96–S99, 2003.
- [2] M. W. Chase, R. S. Cowan, P. M. Hollingsworth, C. van den Berg, S. Madrinan, and G. Petersen, "A proposal for a standardized protocol to barcode all land plants," *Taxon*, vol. 56, pp. 95–299, 2007.
- [3] W. J. Kress and D. L. Erickson, "DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics," *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 105, pp. 2761–2762, 2008, doi: [10.1073/pnas.0800476105](https://doi.org/10.1073/pnas.0800476105).
- [4] P. M. Hollingsworth, S. W. Graham, and D. P. Little, "Choosing and using a plant DNA Barcode," *PLoS One.*, vol. 6, pp. 1–13, 2011, Art. no. e19254.
- [5] P. Taberlet, L. Gielly, and G. Pautou, "Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA," *Plant Mol Biol.*, vol. 17, pp. 1105–1109, 1991, doi: 10.1007/BF00037152.
- [6] L. Gielly and P. Taberlet, "A phylogeny of European gentians inferred from chloroplast trnL(UAA) intron sequences," *Bot J Linnean Soc.*, vol. 120, pp. 57–75, 1996.
- [7] P. Taberlet, E. Coissac, F. Pompanon, L. Gielly, C. Miquel, A. Valentini, T. Vermat, G. Corthier, C. Brochmann, and E. Willerslev, "Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding," *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, 2007, doi: 10.1093/nar/gkl938.
- [8] L. Gielly and P. Taberlet, "The use of chloroplast DNA to resolve phylogenies: noncoding versus rbcL sequences," *Mol Biol Evol.*, vol. 11, pp. 769–777, 1994.
- [9] T. R. Cech, S. H. Damberg, and R. R. Gutell, "Representation of the secondary and tertiary structure of group I introns," *Nat Struct Biol.*, vol. 1, pp. 273–280, 1994.
- [10] T. Borsch, K. W. Hilu, D. Quandt, V. Wilde, C. Neinhuis, and W. Barthlott, "Noncoding plastid trnT–trnF sequences reveal a well resolved phylogeny of basal angiosperms," *J Evol Biol.*, vol. 16, pp. 558–576, 2003.
- [11] H. H. Pham, *Plants of Vietnam*. Ho Chi Minh City Youth Publishing House, 2003, pp. 473–475.
- [12] Danh lục cây thuốc: *Hoya parasitica* (Roxb.) Wall. ex Wight. Tra cứu dược liệu [Online]. Available: <https://tracuuduclicieu.vn/hoya-parasitica-roxb-wall-ex-wight-asclepias-parasitica-roxb.html>. [Accessed January 20, 2023].
- [13] 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(01), pp. 401–407, 2023, doi: 10.34238/tnu-jst.6977.
- [14] OPS Diagnostics, "CTAB Protocol for Isolating DNA from Plant Tissues," [Online]. Available: https://opsdiagnostics.com/notes/protocols/ctab_protocol_for_plants.htm#phenolpr. [Accessed August 25, 2022].
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] J. Felsenstein, "Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap," *Evolution*, vol. 39, pp. 783–791, 1985.
- [18] C. W. Chen, Y. M. Huang, L. Y. Kuo, Q. D. Nguyen, H. T. Luu, J. R. R. Callado, D. R. Farrar, and W. L. Chiou, "trnL-F is a powerful marker for DNA identification of field vittarioid gametophytes (Pteridaceae)," *Annals of Botany*, vol. 111, pp. 663–673, 2013, doi:10.1093/aob/mct004.
- [19] R. Kishor and G. J. Sharma, "The use of the hypervariable P8 region of trnL(UAA) intron for identification of orchid species: Evidence from restriction site polymorphism analysis," *PLoS ONE*, vol. 13, 2018, Art. no. e0196680, doi: 10.1371/journal.pone.0196680.
- [20] T. T. H. Huynh, T. T. H. Nguyen, T. T. H. Le, and D. T. Nguyen, "Analysis of the *trnL-trnF* gene region on *Solanum procumbens* Lour. (*Solanum procumbens* Lour.) of Vietnam," *Journal of Biotechnology*, vol. 19, pp. 309–319, 2021.
- [21] V. C. Hoang, T. H. A. Mai, Q. T. Tu, and M. H. Chu, "Analysis of the chloroplast gene region, rbcL, isolated from *Hoya parasitica* (Roxb.) Wall. ex Wight plant," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 228(01), pp. 474–481, 2023.