

Xác định DNA mã vạch phục vụ giám định loài Lan kim tuyến *Anoectochilus setaceus* Blume

Bùi Thị Mai Hương, Lương Phương Thảo, Tần Long Mây, Nguyễn Thị Thanh, Hà Văn Huân*
Trường Đại học Lâm nghiệp

Determination of DNA barcode sequences of *Anoectochilus setaceus* Blume to identify plant species

Bui Thi Mai Huong, Luong Phuong Thao, Tan Long May, Nguyen Thi Thanh, Ha Van Huan*
Vietnam National University of Forestry
*Corresponding author: huanhv@vnuf.edu.vn

<https://doi.org/10.55250/jo.vnuf.15.3.2026.026-033>

TÓM TẮT

Lan kim tuyến là các loài cây dược liệu có giá trị kinh tế cao. Hiện nay, các sản phẩm dược liệu từ Lan kim tuyến đang được bán trên thị trường tràn lan như dạng viên nén, dạng thuốc Nam với giá thành rất cao. Do vậy, việc xác định các đoạn mã vạch DNA để định danh cho loài Lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus*) phục vụ giám định loài là cần thiết trong các sản phẩm dược liệu đó. DNA tổng số được phân lập từ mẫu mô cây Lan kim tuyến. Các đoạn mã vạch DNA (*rbcl*, *TrnH-psbA* và *ITS2*) được nhân bản từ DNA tổng số của Lan kim tuyến bằng kỹ thuật PCR. Sản phẩm PCR chỉ ra rằng các băng thu được có kích thước giống với kích thước dự kiến, sau đó sản phẩm PCR được xác định trình tự. Kết quả phân tích trình tự đã chỉ ra, đoạn *rbcl* có 669 nucleotide, đoạn *TrnH-psbA* có 747 nucleotide và đoạn *ITS2* có 355 nucleotide. Các trình tự này được đăng ký trên Ngân hàng Gen Quốc tế (NCBI) với các mã số PV330331.1 của đoạn gen *rbcl*, PV330332.1 của đoạn gen *trnH-psbA* và PV262379.1 của đoạn *ITS2* với Lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus*) nghiên cứu. So sánh sự khác biệt của ba đoạn chỉ thị *rbcl*, *trnH-psbA* và *ITS2* cho thấy: đoạn gen *ITS2* có sai khác với tỷ lệ 0,63%. Do vậy, có thể sử dụng chỉ thị *ITS2* cùng với chỉ thị *rbcl*, *trnH-psbA* làm mã vạch DNA để giám định loài Lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus*) trong các sản phẩm dược liệu ở Việt Nam.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 01/12/2025

Ngày phản biện: 10/01/2026

Ngày quyết định đăng: 09/02/2026

Từ khóa:

Giám định loài, Lan kim tuyến, mã vạch DNA, PCR.

Keywords:

Anoectochilus setaceus, DNA barcode, identify species, PCR.

ABSTRACT

Anoectochilus setaceus is a medicinal plant with high economic value. Nowadays, the medicinal products from *Anoectochilus setaceus* are widely sold on the market in tablet form, traditional medicine form with very high prices. Therefore, it is necessary to determine DNA barcode fragments to identify *Anoectochilus setaceus* species in those medicinal products. The total DNA was extracted from the tissue samples of *Anoectochilus setaceus*. The DNA barcodes (*rbcl*, *TrnH-psbA* and *ITS2*) were amplified from total DNA of *Anoectochilus setaceus* by PCR technique. The PCR results indicated that all DNA bands have the size similar to the theoretical size of *rbcl*, *TrnH-psbA* and *ITS2*. Results nucleotide sequencing of PCR products showed that the length of *rbcl* fragment is 669 bp, *trnH-psbA* fragment is 747 bp and *ITS2* fragment is 355 bp. These sequences of studied *Anoectochilus setaceus* species were registered on the National Center for Biotechnology Information (NCBI) with codes PV330331.1 of *rbcl* gene fragment, PV330332.1 of *trnH-psbA* gene fragment and PV262379.1 of *ITS2* gene fragment. Comparing three DNA markers indicated that *ITS2* gene fragment had differences. Therefore, *ITS2* gene fragment can be used as a DNA barcode to identify *Anoectochilus setaceus* species in medicinal products in Vietnam.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lan kim tuyến có tên khoa học là *Anoectochilus setaceus* Blume., thuộc họ Lan Orchidaceae. Lan kim tuyến là cây thảo dược đa tác dụng như: Tăng cường đề kháng, hệ miễn dịch cho cơ thể; điều trị thần kinh suy nhược đau đầu, khó ngủ; điều trị rối loạn tiêu hóa; tiêu viêm, giải độc, lợi tiểu; điều trị các vấn đề liên quan đến hô hấp [1, 2]. Các sản phẩm từ Lan kim tuyến đang bán tràn lan trên thị trường với giá thành rất cao dưới dạng viên nén thuốc thảo dược hay dạng thuốc nam. Tuy nhiên những sản phẩm đó cần được kiểm định nguồn gốc và thành phần loài. Vì vậy, việc xác định các chỉ thị DNA mã vạch cho loài Lan kim tuyến với mục đích định danh chính xác loài Lan kim tuyến trong các sản phẩm dược liệu thương mại trôi nổi trên thị trường là hết sức cần thiết.

Phương pháp DNA mã vạch là một phương pháp sử dụng một đoạn hoặc nhiều đoạn DNA chuẩn ngắn nằm trong bộ genome của sinh vật đang nghiên cứu để phục vụ giám định loài, mang lại hiệu quả cao trong thời gian ngắn, góp phần không nhỏ vào sự định danh và bảo tồn các loài thực vật trên thế giới. Đây là phương pháp phân loại phân tử hiện đại khắc phục những hạn chế cho phương pháp phân loại dựa vào hình thái [3]. Ở thực vật, các DNA mã vạch nằm ở hệ gen nhân như *ITS*, *ITS2*, *18S*, *5,8S*... một số nằm ở hệ gen lục lạp như *matK*, *rbcl*, *TrnH-psbA*, *psbK-psbI* được sử dụng để giám định các loài thực vật [4-8]. Trước đó, Vũ Huyền Trang và cộng sự (2013) đã sử dụng các đoạn *matK*, *psbA-trnH* và *ITS* để định danh cho loài *Anoectochilus roxburghii*. Lò Thị Mai Thu và cộng sự (2014) đã sử dụng chỉ thị *rpoC1* và *ITS* định danh cho loài Lan kim tuyến thu tại Thuận Châu, Sơn La. Hiện nay việc sử dụng các chỉ thị DNA mã vạch cho loài Lan kim tuyến còn hạn chế. Trong nghiên cứu này, ba đoạn DNA mã vạch được sử dụng là: *rbcl*, *TrnH-psbA* và *ITS2*. Các đoạn trình tự này đều có tính đặc trưng cao cho loài, có thể đem lại kết quả khả quan nhằm phân loại, giám định và xác định mối quan hệ giữa các loài, từ đó góp phần nâng cao hiệu

quả bảo tồn và phát triển loài Lan kim tuyến ở Việt Nam.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng, vật liệu, hóa chất

Đối tượng nghiên cứu: Mẫu cây mô Lan kim tuyến được lấy tại Viện công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp, Xuân Mai, Hà Nội.

Vật liệu nghiên cứu: mẫu mô của cây Lan kim tuyến, bước đầu nghiên cứu được tiến hành lấy 3 mẫu mô từ 3 cây khác nhau. Ký hiệu các mẫu Lan kim tuyến được lấy: KT1; KT2; KT3.

Trình tự các cặp mồi *rbcl*
 (rP1F: TGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC;
 rP1R: GTAAAATCAAGTCCACCTCG) với nhiệt độ gắn mồi 52°C; mồi *TrnH-psbA* (*trnPF1*: CGCGCATGGTGGATTCAATCC;
psbPR1: GTTATGCATGACGTAATGCTC) với nhiệt độ gắn mồi 50°C; mồi *ITS2* (*IsP1F*: ATGCGATACTTGGTGTGAAT;
IsP1R: TCCTCCGCTTATTGATATGC) với nhiệt độ gắn mồi 48°C.

Hóa chất: Kit tách chiết DNA tổng số (Plant DNA Isolation Kit) của hãng Norgen, Canada; hóa chất cho phản ứng PCR nhân bản các đoạn mã vạch DNA: Master mix của hãng Intron Biotechnology, Hàn Quốc; Kit tinh sạch sản phẩm PCR (PCR Purification Kit) của Norgen, Canada; hóa chất cho điện di trên gel Agarose: Agarose, DNA marker, Redsafe...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tách chiết DNA tổng số từ các mẫu cây mô của cây Lan kim tuyến bằng Kit tách chiết DNA thực vật của hãng Norgen. Nhân bản đoạn gen *rbcl*, *TrnH-psbA* và *ITS2* từ các mẫu DNA tổng số bằng kỹ thuật PCR trên máy PCR 9700, mỗi phản ứng PCR bao gồm: H₂O deion (7 µl), 2x PCR Master mix Solution (10 µl), 10 pmol/ µl mồi xuôi (1,0 µl), 10 pmol/ µl mồi ngược (1,0 µl) và 50 ng/µl DNA khuôn (1 µl). Chương trình phản ứng PCR: 95°C: 5 phút; (95°C: 30 giây, 48-52°C: 30 giây, 72°C: 1 phút) lặp lại 40 chu kỳ; 72°C: 5 phút; giữ tại 4°C. Nhiệt độ gắn mồi các phản ứng phụ thuộc vào cặp mồi sử dụng. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng Kit tinh sạch của

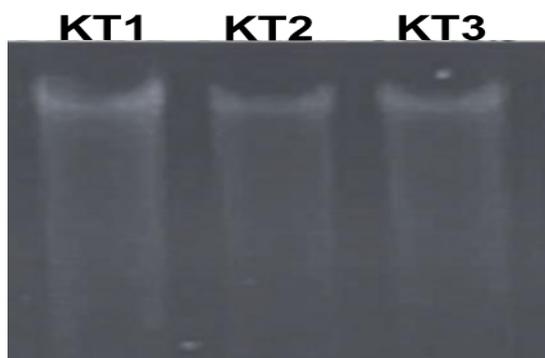
Canada. Sau khi tinh sạch sản phẩm PCR được gửi cho phòng thí nghiệm 1st Base ở Malaysia để giải trình tự.

Trình tự nucleotide của đoạn DNA được xử lý, phân tích bằng các phần mềm chuyên dụng như Bioedit, Mega10, NCBI... Xây dựng cây phát sinh chủng loại của từng đoạn gen bằng Maximum likelihood tree của MegaX1.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số của cây Lan kim tuyến

DNA tổng số sau khi được tách chiết từ các mẫu mô cây Lan kim tuyến bằng Kit tách chiết của hãng Norgen. Sau đó, kết quả DNA tổng số được điện di để kiểm tra sự nguyên vẹn của sản phẩm (Hình 1). Kết quả điện di cho thấy các băng DNA khá sắc nét, nguyên vẹn, ít đứt gãy. Nồng độ DNA từ 150-200 ng/ μ l, độ tinh sạch từ 1,8-2,0. Sản phẩm tách chiết DNA tổng số đảm bảo làm khuôn cho nhân bản các đoạn DNA quan tâm bằng kỹ thuật PCR.

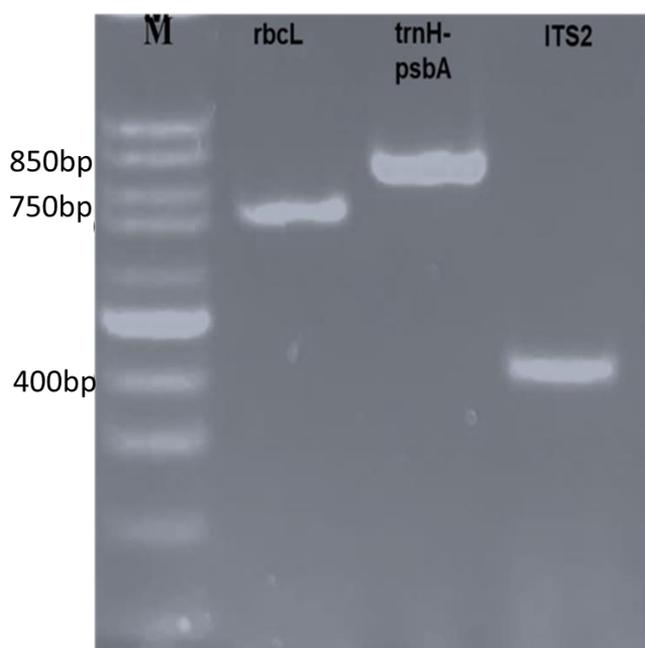


Hình 1. Ảnh điện di DNA tổng số của 3 mẫu Lan kim tuyến (KT1: Lan kim tuyến 1; KT2: Lan kim tuyến 2; KT3: Lan kim tuyến 3)

3.2. Kết quả nhân bản các đoạn mã vạch DNA bằng kỹ thuật PCR

DNA tổng số tách chiết từ các mẫu mô của

cây Lan kim tuyến được sử dụng làm khuôn để nhân bản các đoạn gen *rbcL*, *TrnH-psbA* và *ITS2* bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu.



Hình 2. Kết quả PCR của các đoạn gen *rbcL*, *trnH-psbA*, *ITS2* của mẫu Lan kim tuyến M: marker CSL-MDNA 100BPH RTU

Kết quả điện di cho thấy các băng sáng rõ nét, không xuất hiện băng phụ, các băng DNA có kích thước tương ứng với kích thước của các đoạn mã vạch DNA dự kiến (Hình 2). Đoạn gen *rbcl* có chiều dài là gần 750 bp, đoạn gen *trnH-psbA* có chiều dài gần 850 bp, đoạn gen *ITS2* là gần 400 bp. Điều này cho thấy mỗi được sử dụng khá đặc hiệu và nhiệt độ bắt mồi là tối ưu. Các mẫu đều được tinh sạch và đem đi giải trình tự.

3.3. Kết quả xác định và phân tích trình tự nucleotide của đoạn mã vạch DNA

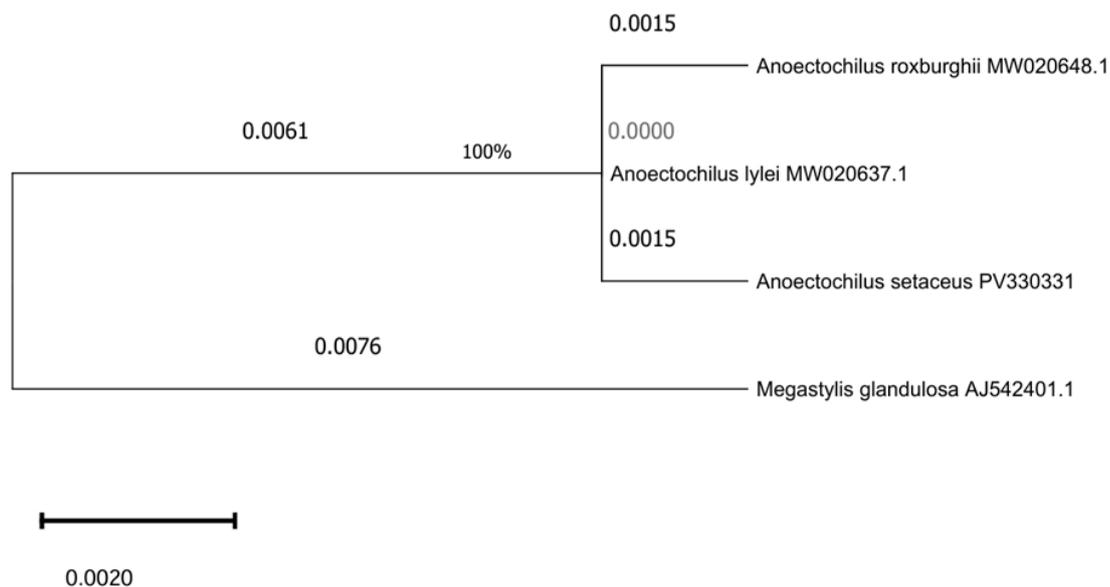
3.3.1. Trình tự DNA của đoạn gen *rbcl*

Kết quả xác định trình tự nucleotide cho thấy, đoạn gen *rbcl* được nhân bản có kích thước 669 bp. Kết quả giải trình tự đoạn gen *rbcl* của mẫu Lan kim tuyến được đăng ký trên Ngân hàng Gen Quốc tế (NCBI) với mã số *Anoectochilus setaceus* (PV330331.1). Sau đó tiếp tục sử dụng đoạn gen *rbcl* để so sánh với các loài khác trên Ngân hàng NCBI như: *Anoectochilus lylei* (MW020637.1), *Anoectochilus roxburghii* (MW020648.1), *Megastylis glandulosa* (AJ542401.1) để tìm ra sự khác biệt giữa các loài được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Sự tương đồng trên đoạn gen *rbcl* của cây Lan kim tuyến với các loài khác trên NCBI

TT	Tên loài	Mã số	Tỷ lệ tương đồng (%)
1	<i>Anoectochilus lylei</i>	MW020637.1	99,85
2	<i>Anoectochilus roxburghii</i>	MW020648.1	99,70
3	<i>Megastylis glandulosa</i>	AJ542401.1	98,50

Sau đó các loài ở Bảng 1 được sử dụng để xây dựng cây phân loại bằng phần mềm MegaXI thu được ở Hình 3.



Hình 3. Cây phân loại dựa vào trình tự trên đoạn *rbcl* tạo bởi Maximum Likelihood Tree

Từ cây phân loại dựa trên số liệu trình tự đoạn gen *rbcl* kết hợp với hệ số tương đồng của loài Lan kim tuyến với các loài khác trên NCBI ta thấy: loài Lan kim tuyến nghiên cứu có trình tự gen giống 99,85% với đoạn gen của loài *Anoectochilus lylei* trên NCBI với mã số

MW020637.1 và có quan hệ xa nhất với loài *Megastylis glandulosa* với hệ số tương đồng 98,50%.

3.3.2. Trình tự đoạn gen *trnH-psbA*

Kết quả xác định trình tự nucleotide cho thấy, đoạn gen *trnH-psbA* được nhân bản có

kích thước 747 bp. Kết quả giải trình tự đoạn gen *trnH-psbA* của mẫu Lan kim tuyến được đăng ký trên Ngân hàng Gen Quốc tế (NCBI) với mã số *Anoectochilus setaceus* (PV330332.1). Sau đó tiếp tục sử dụng đoạn gen *trnH-psbA* để so sánh loài nghiên cứu với các loài khác trên NCBI. Một số loài có trình

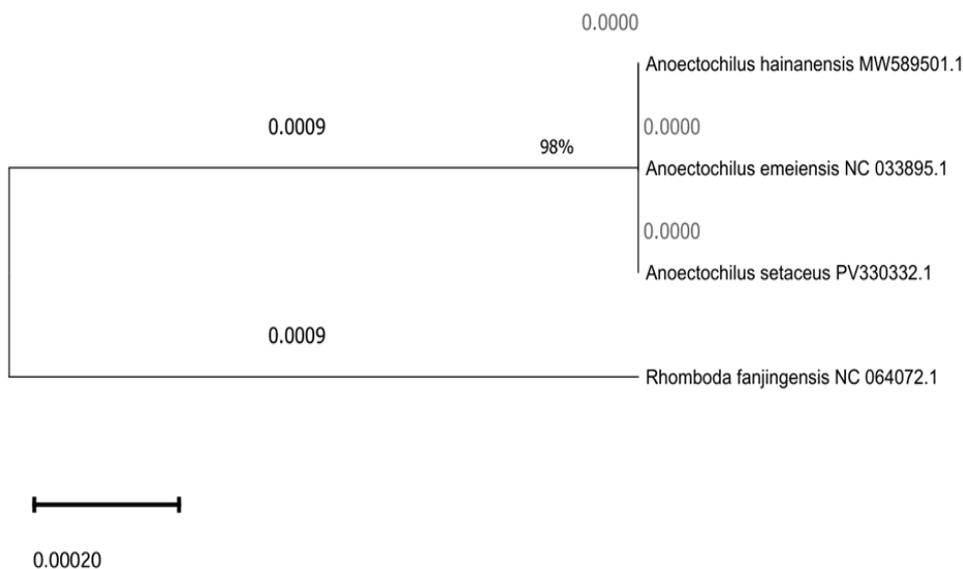
tự gen tương đồng với Lan kim tuyến như: *Anoectochilus emeiensis* (NC_033895.1), *Anoectochilus hainanensis* (MW589501.1), *Rhomboda fanjingensis* (NC_064072.1) để tìm ra sự khác biệt giữa các loài được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. Sự tương đồng trên đoạn *trnH-psbA* của cây Lan kim tuyến với các cây khác trên NCBI

TT	Tên loài	Mã số	Tỷ lệ tương đồng (%)
1	<i>Anoectochilus emeiensis</i>	NC_033895.1	98,13
2	<i>Anoectochilus hainanensis</i>	MW589501.1	98,01
3	<i>Rhomboda fanjingensis</i>	NC_064072.1	97,79

Kết quả trình tự trên được sử dụng phần mềm Mega 11 để xây dựng cây phân loại thu

được ở Hình 4.



Hình 4. Cây phân loại dựa vào trình tự trên đoạn *trnH-psbA* tạo bởi Maximum Likelihood Tree

Từ cây phân loại dựa trên số liệu trình tự đoạn gen *trnH-psbA* kết hợp với hệ số tương đồng của loài Lan kim tuyến với các loài khác trên NCBI ta thấy: loài Lan kim tuyến nghiên cứu có trình tự gen giống 98,13% với đoạn gen của loài *Anoectochilus emeiensis* trên NCBI với mã số NC_033895.1 và có quan hệ xa nhất với loài *Rhomboda fanjingensis* với hệ số tương đồng 97,79%.

3.3.3. Trình tự đoạn gen *ITS2*

Kết quả xác định trình tự nucleotide cho thấy, đoạn gen *ITS2* được nhân bản có kích

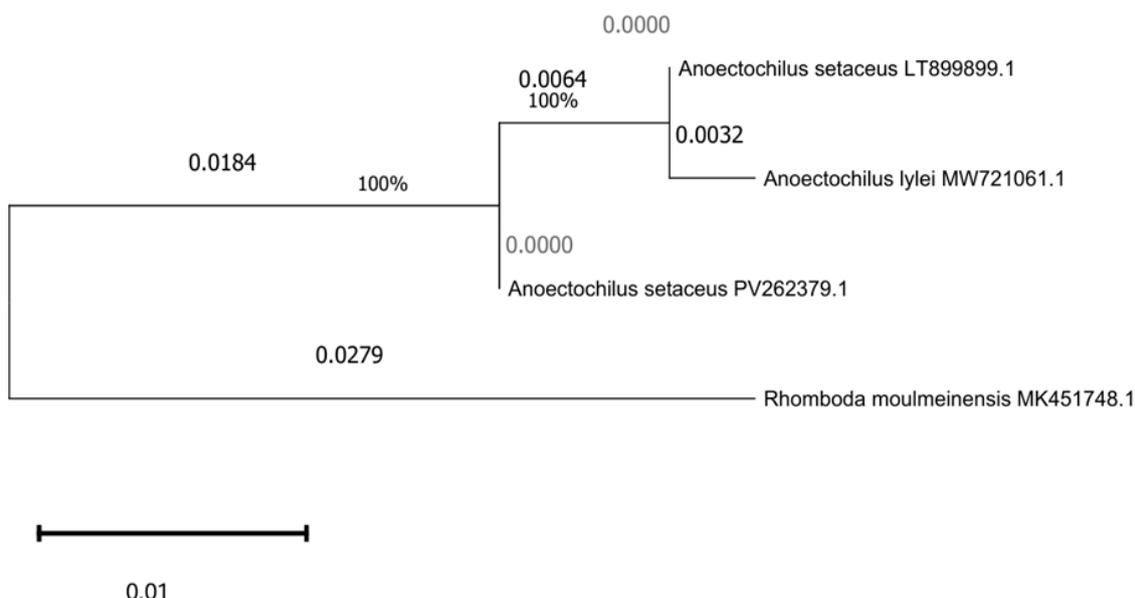
thước 355 bp. Kết quả giải trình tự đoạn gen *ITS2* của mẫu Lan kim tuyến được đăng ký trên NCBI với mã số *Anoectochilus setaceus* (PV262379.1). Sau đó, nhóm tác giả tiếp tục sử dụng đoạn gen *ITS2* để so sánh loài nghiên cứu với các loài khác trên NCBI. Một số loài có trình tự gen tương đồng với Lan kim tuyến như: *Anoectochilus setaceus* (LT899899.1), *Anoectochilus lylei* (MW721061.1), *Rhomboda moulmeinensis* (MK451748.1) để tìm ra sự khác biệt giữa các loài được thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3. Mức độ tương đồng ITS2 của cây Lan kim tuyến với các cây khác trên NCBI

TT	Tên loài	Mã số	Tỷ lệ tương đồng (%)
1	<i>Anoectochilus setaceus</i>	LT899899.1	99,37
2	<i>Anoectochilus lylei</i>	OP787946.1	99,05
3	<i>Rhomboda moulmeinensis</i>	MT872165.1	95,49

Kết quả trình tự trên được sử dụng phần mềm Mega 11 để xây dựng cây phân loại thu

được ở Hình 5.



Hình 5. Cây phân loại dựa vào trình tự trên đoạn ITS2 tạo bởi Maximum Likelihood Tree

Từ cây phân loại dựa trên số liệu trình tự đoạn gen ITS2 kết hợp với hệ số tương đồng của loài Lan kim tuyến với các loài khác trên NCBI ta thấy: loài Lan kim tuyến nghiên cứu có trình tự gen giống 99,37% với đoạn gen của loài *Anoectochilus setaceus* trên NCBI với mã số LT899899.1 và có quan hệ xa nhất với loài *Rhomboda moulmeinensis* với hệ số tương đồng 95,49%.

Như vậy, dựa vào cây phân loại của cả 3 đoạn gen ITS2, *trnH-psbA* và *rbcl* cho thấy loài Lan kim tuyến nghiên cứu tương đồng cao nhất với loài Lan kim tuyến trên Ngân hàng Gen Quốc tế với các tỷ lệ tương đồng như 99,37% của đoạn gen ITS2 với loài Lan kim tuyến *Anoectochilus setaceus* trên Ngân hàng Gen Quốc tế với mã số LT899899.1, hai đoạn

gen *trnH-psbA* và *rbcl* chưa được tìm thấy trên Ngân hàng Gen Quốc tế của loài Lan kim tuyến, do vậy nhóm nghiên cứu so sánh loài Lan kim tuyến nghiên cứu với các loài gần của chi *Anoectochilus*.

4. THẢO LUẬN

DNA mã vạch được sử dụng để định danh loài ở nhiều nhóm sinh vật khác nhau như thực vật, động vật, vi khuẩn, virus và nấm [9]. Hiện nay, các nghiên cứu về DNA mã vạch đối với loài Lan kim tuyến vẫn còn rất hạn chế. Trong khi đó, việc ứng dụng DNA mã vạch để giám định chính xác loài Lan kim tuyến trong các sản phẩm dược liệu thương mại trên thị trường hiện nay là rất cần thiết. Trong nghiên cứu này sử dụng 3 đoạn gen là *rbcl*, *trnH-psbA* và ITS2. Đây là các đoạn gen được sử dụng

rộng rãi trong phân loại thực vật bằng DNA mã vạch. Đoạn *rbcl* là đoạn DNA mã vạch tiềm năng nhất cho phân loại thực vật, đoạn gen này nằm ở lục lạp, đoạn gen này sử dụng phân loại cho mức độ phân loại bộ, chi và họ. Với mức độ loài *rbcl* hạn chế cho sự phân giải bởi đây là đoạn gen khá bảo thủ ở lục lạp vì vậy cho sự tương đồng khá cao giữa các loài. Đoạn *rbcl*, *trnH-psbA* là các đoạn dễ nhân bản, thông thường đạt 90% cho các cặp mồi tiêu chuẩn. Đoạn *trnH-psbA* là đoạn chứa các đoạn không mã hóa ở lục lạp thích hợp cho việc phân loại ở mức độ loài có thể được sử dụng riêng lẻ hoặc tổ hợp với các đoạn DNA mã vạch cho độ chính xác cao hơn ở mức độ phân loại loài [10]. Đoạn *ITS* (internal transcribed spacer) nằm trong gen nhân, chứa các vùng không mã hóa và có khả năng biến đổi lớn, do vậy là một trong những đoạn DNA mã vạch tiềm năng cho phân loại ở mức độ loài [11-14]. Trong nghiên cứu này sử dụng 3 đoạn *rbcl*, *trnH-psbA* và *ITS2* với hiệu suất nhân bản đạt 100%. Tuy nhiên, đoạn *rbcl*, *trnH-psbA* cho mức độ phân loại loài chưa được công bố trên Ngân hàng Gen Quốc tế cho loài Lan kim tuyến, chỉ có đoạn *ITS2* đã được công bố trên NCBI với mức độ tương đồng là 99,37% so với loài Lan kim tuyến nghiên cứu. Lò Thị Mai Thu và cộng sự (2014) đã sử dụng chỉ thị *rpoC1* và *ITS* định danh cho loài Lan kim tuyến thu tại Thuận Châu, Sơn La. Như vậy, các đoạn *rbcl*, *trnH-psbA* và *ITS2* là thích hợp cho việc sử dụng để giám định loài Lan kim tuyến trong sản phẩm thảo dược chứa Lan kim tuyến nhưng bị dán nhãn sai trên thị trường. Tuy nhiên, đây mới là nghiên cứu bước đầu cho việc định danh loài, nhóm tác giả cần nghiên cứu trên nhiều chỉ thị hơn và trên các mẫu dược liệu đã được chế biến sẵn.

5. KẾT LUẬN

Đã tách chiết được 3 mẫu DNA tổng số của Lan kim tuyến. Nhân gen thành công các

đoạn gen *ITS2*, *trnH-psbA* và *rbcl* từ DNA tổng số của loài Lan kim tuyến bằng kỹ thuật PCR. Kết quả xác định trình tự nucleotide của các đoạn mã vạch DNA cho thấy đoạn *rbcl* có kích thước là 669 bp, đoạn *TrnH-psbA* có 747 bp và đoạn *ITS2* có 355 bp. So sánh trình tự nucleotide của các đoạn mã vạch DNA (*ITS2*, *trnH-psbA* và *rbcl*) của loài Lan kim tuyến với trình tự nucleotide của các đoạn mã vạch tương ứng của các loài Lan kim tuyến trên NCBI đã chỉ ra: loài Lan kim tuyến nghiên cứu có các tỷ lệ tương đồng 99,37% của đoạn *ITS2* với loài Lan kim tuyến trên NCBI. Như vậy, kết quả so sánh của cả 3 đoạn (*ITS2*, *trnH-psbA* và *rbcl*) với loài Lan kim tuyến, nhóm tác giả tìm ra được đoạn *ITS2* làm mã vạch có khả năng phân biệt loài Lan kim tuyến nghiên cứu. Tuy nhiên, để chính xác nhất nên sử dụng cả 2 chỉ thị *trnH-psbA* và *rbcl* để bổ trợ định danh loài Lan kim tuyến.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Nguyen Thuong Tuan & Nguyen Van Hong (2021). Research completing the process of flavonoid compound fractional extraction from *Noectochilus setaceus* Blume Cao Bang plant. *TNU Journal of Science and Technology* 226(10): 350-355. DOI: 10.34238/tnu-jst.4414
- [2]. Le Dinh Chac, Bui Bao Thinh & Nguyen Thi Yen (2021). Anti-cancer activity of dry extract of *Anoectochilus setaceus* Blume against BT474 breast cancer cell line and A549 lung cancer cell line. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 14(2): 730-734.
- [3]. W. J. Kress (2017). Plant DNA barcodes: Applications today and in the future. *Journal of Systematics and Evolution*. 55: 291-307. DOI: 10.1111/jse.12254.
- [4]. Muhammad Ismail, Aftab Ahmad, Muhammad Nadeem, Muhammad Asif Javed, Sultan Habibullah Khan, Iqra Khawaish, Aftab Alam Sthanadar, Sameer H. Qari, Suliman M. Alghanem, Khalid Ali Khan, Muhammad Fiaz Khan & Samina Qamer (2020). Development of DNA barcodes for selected *Acacia* species by using *rbcl* and *matK* DNA markers. *Journal of Biological Sciences*. 27(12): 3735-3742.
- [5]. S. Zhu, Q. Li, S. Chen, Y. Wang, L. Zhou, C. Zeng & J. Dong (2018). Phylogenetic analysis of *Uncaria* species based on internal transcribed spacer (*ITS*)

region and ITS2 secondary structure. *Pharm Biol.* 56(1): 548-58. DOI: 10.1080/13880209.2018.1499780.

[6]. V. V. Thakur, S. Tiwari, N. Tripathi & G. Tiwari (2019). Molecular identification of medicinal plants with amplicon length polymorphism using universal DNA barcodes of the atpF–atpH, trnL and trnH–psbA regions. *Biotech.* 9: 1-10. DOI: 10.1007/s13205-019-1724-6.

[7]. S. Zhu, Q. Liu, S. Qiu, J. Dai & X. Gao (2022). DNA barcoding: an efficient technology to authenticate plant species of traditional Chinese medicine and recent advances. *Chinese Medicine.* 17: 112. DOI: 10.1186/s13020-022-00655-y.

[8]. Ha Van Huan, Hoang Minh Trang & Nguyen Van Toan (2018). Identification of DNA Barcode Sequence and Genetic Relationship among Some Species of Magnolia Family. *Asian Journal of Plant Sciences.* 17(1): 56-64. DOI: 10.3923/ajps.2018.56.64.

[9]. M. L. Hollingsworth, A. A. Clark, L. L. Forrest, J. Richardson, R. T. Pennington, D. G. Long, R. Cowan, M. W. Chase, M. Gaudeul & P. M. Hollingsworth (2009). Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three

divergent groups of land plants. *Mol Ecol Resour.* 9(2): 439-457.

[10]. Xiaohui Pang, Chang Liu, Linchun Shi, Rui Liu, Dong Liang, Huan Li, Stacey S. Cherny & Shilin Chen (2012). Utility of the trnH–psbA Intergenic spacer region and its combinations as plant DNA barcodes: A meta-analysis *PLOS ONE.* 7(11): e48833

[11]. M. A. Ali, G. Gyulai, N. Hidvegi, B. Kerti, F. M. Al Hemaïd, A. K. Pandey & J. Lee (2014). The changing epitome of species identification– DNA barcoding. *Saudi J. Biol. Sci.* 21: 204–231.

[12]. Z. Kowalska, F. Pniewski & A. Latała (2019). DNA barcoding–A new device in phylogol’st’s toolbox. *Ecohydrol. Hydrobiol.* 19: 417–427. DOI: 10.1016/j.ecohyd.2019.01.002.

[13]. S.G. Newmaster, A.J. Fazekas & S Ragupathy (2006). DNA barcoding in land plants: Evaluation of rbcl in a multigene tiered approach. *Botany.* 84: 335–341. DOI: 10.1139/b06-047.

[14]. K. Vijayan & C. H. Tsou (2010). DNA barcoding in plants: Taxonomy in a new perspective. *Curr. Sci.* 99: 1530–1541.