

PHÂN TÍCH VÙNG GENE *trnL-trnF* CỦA CÂY SÂM CAU (*Curculigo orchioides*) TỰ NHIÊN THU TẠI TỈNH THỪA THIÊN HUẾ

Bùi Lê Thanh Nhân^{1,2*}, Trương Thị Bích Phương², Hoàng Tấn Quảng³

¹ Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế, 6 Ngô Quyền, Huế, Việt Nam

² Trường Đại học khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, Huế, Việt Nam

³ Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Phú Thượng, Huế, Việt Nam

* Tác giả liên hệ Bùi Lê Thanh Nhân <bltnhan@huemed-univ.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 09-10-2022; Ngày chấp nhận đăng: 30-03-2023)

Tóm tắt. Sâm cau (*Curculigo orchioides*), thuộc chi *Curculigo*, họ Hypoxidaceae, là một loài thảo dược quý và đã được người dân tin dùng để chăm sóc và bảo vệ sức khỏe. Hiện nay, nhu cầu trồng cây Sâm cau ngày càng tăng cao, nhưng các nghiên cứu dựa trên các chỉ thị DNA của Sâm cau nhằm phát triển chỉ thị để tránh nhầm lẫn trong quá trình thu mua nguyên liệu ở dạng khô vẫn chưa có nhiều. Trong nghiên cứu này, vùng gene *trnL-trnF* của 15 nguồn gene Sâm cau thu hái từ ba khu vực thuộc tỉnh Thừa Thiên Huế đã được giải trình tự và phân tích nhằm phục vụ cho công tác định danh, phân loại và phân tích sự tiến hoá. Kết quả cho thấy vùng gene *trnL-trnF* của các mẫu nghiên cứu có trình tự tương đồng 99% và độ bao phủ 100% so với trình tự NC 053892 của loài *Curculigo orchioides*. Chúng tôi đã xác định được năm loại haplotype tại tỉnh Thừa thiên Huế với hệ số đa dạng haplotype (Hd) $0,705 \pm 0,088$. Mức độ khác biệt di truyền giữa các quần thể dao động từ 0 đến 0,49%. Quần thể Sâm cau ở tỉnh Thừa Thiên Huế tiến hoá theo hướng chọn lọc cân bằng, trung tính và quần thể ngẫu nhiên do thiếu các allen hiếm xuất hiện trong quần thể.

Từ khoá: Sâm cau, đa dạng di truyền, *trnF*, *trnL*

trnL-trnF gene region analysis of natural *Curculigo orchioides* collected in Thua Thien Hue

Bui Le Thanh Nhan^{1,2*}, Truong Thi Bích Phuong², Hoang Tan Quang³

¹ University of Medicine and Pharmacy, Hue University, 6 Ngo Quyen St., Hue, Vietnam

² University of Sciences, Hue University, 77 Nguyen Hue St., Hue, Vietnam

³ Institute of Biotechnology, Hue University, Hue, Vietnam

* Correspondence to Bui Le Thanh Nhan <bltnhan@huemed-univ.edu.vn>

(Received: 09 October 2022; Accepted: 30 March 2023)

Abstract. *Curculigo orchioides*, a member of the genus *Curculigo* and the family Hypoxidaceae, is a herbal plant and has been used as traditional medicine. Currently, there is high demand for cultivating this plant. However, there has not been sufficient research into the genetic diversity to assist the authentication of the material, for example, the genetic research based on the DNA indicators of *Curculigo*. In this study, the gene *trnL-trnF* region of 15 *Curculigo orchioides* germplasms collected from

three locations in the province were sequenced and analyzed for identification and evolution. The results show that the sequenced fragment of the gene *trnL-trnF* from the surveyed samples has 99% similarity and 100% coverage compared with the NC 053892 sequence of *Curculigo orchioides*. We identified five haplotypes of *C. orchioides* in the province with a haplotype diversity coefficient (Hd) of 0.705 ± 0.088 . The genetic distances ranged from 0 to 0.49% among the populations. The *Curculigo orchioides* population in Thua Thien Hue has evolved towards balanced, neutral, and random selection because of the lack of rare alleles.

Keywords: *Curculigo orchioides*, genetic diversity, *trnF*, *trnL*

1 Đặt vấn đề

Sâm cau (*Curculigo orchioides*) là một loài thảo dược sống lâu năm, thường được người dân biết đến với nhiều tên gọi khác như: Musali đen, Ngải cau, Tiên mao, Cỏ nốc lan,... [1-3]. Trong hệ thống phân loại, Sâm cau được gọi là *Curculigo orchioides* thuộc chi *Curculigo*, họ Hypoxidaceae, tuy nhiên một số tài liệu trước đây sắp xếp cây thuộc họ Amaryllidaceae [4, 5].

Sâm cau đã được sử dụng rộng rãi trong hệ thống y học bản địa ở nhiều quốc gia thuộc Châu Á để điều trị các bệnh khác nhau bao gồm bệnh tiểu đường [6]; bảo vệ gan, chống oxy hóa, chống ung thư [7]; bảo vệ hệ thần kinh, tăng cường khả năng ghi nhớ [8]; nâng cao khả năng điều hòa miễn dịch và trẻ hóa [3, 5]; tăng cường chức năng tình dục [9]; kháng viêm [3, 10]. Dịch chiết từ thân rễ cũng được sử dụng như một loại thuốc bổ để khắc phục chứng bất lực [11], ngăn ngừa mất xương, hoạt động chống khối u [12] và hoạt động kháng khuẩn [13]. Người dân Ấn Độ, Nepal, Philippines và Việt Nam,... có thói quen hòa bột rễ Sâm cau với sữa uống, hoặc dùng Sâm cau tươi thái nhỏ hầm với gà để trị mệt mỏi, suy nhược cơ thể [14, 15].

Trong những năm gần đây, với nhu cầu tiêu thụ Sâm cau ngày càng tăng, người dân đã khai thác các nguồn hoang dã theo hình thức tận thu nên nguồn Sâm cau tự nhiên ngày một khan hiếm. Hơn nữa, cây phát triển rất chậm, và luôn bị đe dọa bởi sự thay đổi môi trường sống, nên nguồn tài nguyên Sâm cau đang bị suy giảm đáng kể. Hiện nay, Sâm cau là một loài thực vật nằm

trong danh mục sách Đỏ cần được bảo tồn và phát triển [16, 17].

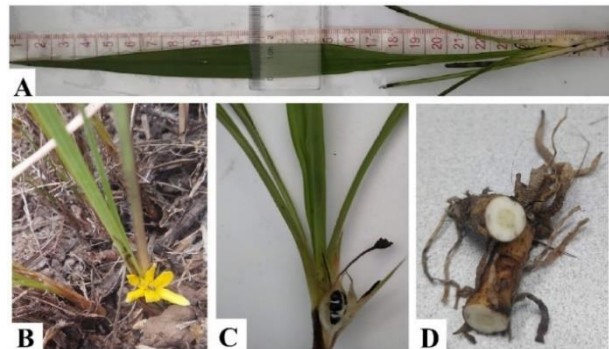
Cơ sở dữ liệu về nguồn gene của Sâm cau có vai trò quan trọng trong việc bảo tồn và phát triển loài cây này. Mã vạch DNA (DNA-barcoding) là một công cụ di truyền hữu ích được hệ thống hóa để thực hiện chính xác việc xác định và định danh cho mọi loài [18]. Đây là một trình tự nucleotide ngắn được lấy từ một phần chuẩn hóa của hệ gene để hỗ trợ các loài trong nhận dạng và khám phá bằng cách sử dụng phân kỳ trình tự dựa trên sự liên kết nucleotide [19-21]. Trong những năm gần đây, một số vùng gene lục lạp (*matK*, *rbcL*, *psbA-trnH*, *atpF-atpH*...) và vùng gene nhân (*ITS-rDNA*) đang được ứng dụng rộng rãi trong các nghiên cứu mối quan hệ phát sinh chủng loại (phylogeny), phân loại (taxonomy) và nhận dạng loài (identity) ở thực vật [22, 20, 23]. Vùng giữa *trnL*(UAA) và *trnF*(GAA) gồm các gene được sắp xếp song song và cách nhau bởi các vùng đệm không mã hóa nằm trong vùng sao chép đơn lớn của hệ gene lục lạp, thường được dùng để xác định mối quan hệ di truyền ở các mức phân loại khác nhau [24, 25].

Trong nghiên cứu này, trình tự nucleotide vùng gene *trnL-trnF* từ các mẫu Sâm cau tự nhiên thu tại tỉnh Thừa Thiên Huế đã được tiến hành phân tích nhằm bổ sung các dẫn liệu khoa học chi tiết và chính xác về đặc điểm di truyền của Sâm cau ở Việt Nam.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Mẫu lá của cây Sâm cau tự nhiên thu thập tại vùng núi thuộc 3 khu vực của tỉnh Thừa Thiên Huế, Việt Nam (thành phố Huế, thị xã Hương Thủy, huyện Hương Trà). 15 mẫu lá non thu thập được ký hiệu từ C1-C15 theo Bảng 1.



Hình 1. Hình thái cây Sâm cau bản địa tại thị xã Hương Thủy, tỉnh Thừa Thiên Huế. A. Lá cây; B. Cây mang hoa; C. Quả và hạt; D. Rễ củ

Bảng 1. Địa điểm thu mẫu và ký hiệu mẫu

Địa điểm	Số lượng	Ký hiệu	Tọa độ vùng thu mẫu
Hương Thủy	5	C1, C2, C3, C4, C5	16024'22"N, 107035'20"E
Hương Trà	5	C6, C7, C8, C9, C10	16021'45"N, 107036'49"E
Huế	5	C11, C12, C13, C14, C15	16026'34"N, 107035'54"E

2.2 Phương pháp

Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số được tách chiết bằng kit TopPURE Plant DNA Extraction Kit (ABT, Việt Nam) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tiến hành điện di kiểm tra DNA tổng số thu được trên gel agarose 1 %.

Phân tích đa dạng di truyền

Phản ứng PCR được thực hiện với cặp primer trnL-F (5'-TGGCGAAATTGGTAGACGC-3') và trnF-R (5'-AACCATCTCGTCTCCTGA-3'). Thành phần phản ứng PCR bao gồm: 1 μ L DNA tổng số (100 ng/ μ L), 0,5 μ L mỗi của mỗi loại (10 pmol), 5 μ L 2X GoTaq Green Master Mix (Promega, Mỹ), 3 μ L nước cất, tổng thể tích phản ứng là 10 μ L.

Phản ứng PCR được thực hiện trong máy gia nhiệt (SimpliAmp, ThermoFisher Scientific, USA) với quy trình chạy như sau: 95°C trong 3 phút, 30 chu kỳ ở 95°C trong 1 phút, 57°C trong 45 giây, 72°C trong 1 phút, 72°C trong 10 phút.

Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch được gửi phân tích trình tự nucleotide ở công ty 1st BASE (Apical Scientific Sdn Bhd, Malaysia). Kết quả giải trình tự DNA được xử lý bằng phần mềm Bioedit (v7.2.5). Mức độ tương đồng và độ bao phủ của các trình tự DNA được đánh giá bằng cách đối chiếu với các trình tự có sẵn trên cơ sở dữ liệu của NCBI bằng công cụ BLAST (Basic local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Các trình tự DNA được sắp xếp giống cột bằng chức năng Clustal W trên phần mềm MEGA 11 với các tham số mặc định. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên phương pháp Maximum Likelihood với giá trị bootstrap 1000. Các phân tích di truyền được thực hiện dựa trên tập hợp của 15 trình tự vùng gene *trn*. Đa dạng di truyền giữa các quần thể được tính bằng tổng số haplotype (Nh), đa dạng haplotype (Hd) và đa dạng nucleotide (π), số lượng của vị trí đa hình (S), số vị trí đột biến (η) và sai khác nucleotide trung bình (k). Phân tích Fu's F_s test, Tajima's D test bằng cách sử dụng phần mềm DnaSP v6.12 [26]. Chi số khác biệt di truyền (Fst) được xác định bằng phần mềm Alerquin v3.5 với 95% giá trị tin cậy.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Kết quả khuếch đại vùng gene *trnL-trnF*

DNA tổng số tách chiết từ lá Sâm cau sau khi pha loãng đồng nhất đến nồng độ 100 ng/ μ L được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR với chu kỳ như đã trình bày ở mục 2.2. Kết quả điện di sản phẩm PCR và thang chuẩn DNA trên gel agarose 1% cho thấy đoạn gene *trnL-trnF* đều được khuếch đại ở các mẫu, băng DNA thu được sáng và rõ thể hiện ở Hình 2.

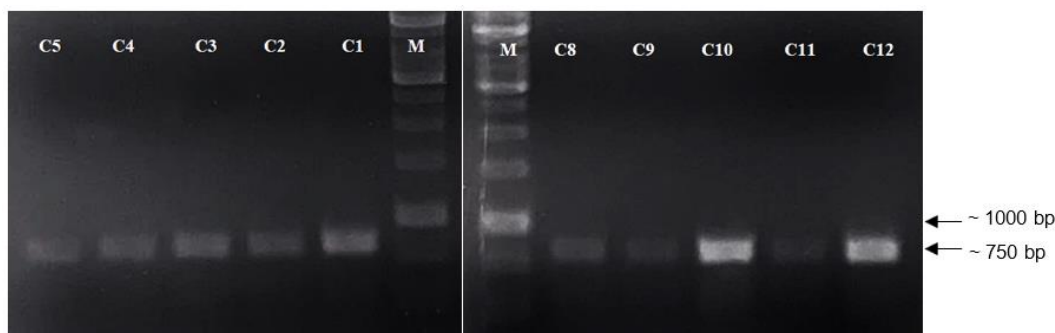
3.2 Phân tích trình tự gene *trnL-trnF* của mẫu nghiên cứu

Trình tự chuỗi nucleotide

Cơ sở dữ liệu trên GenBank được sử dụng nhằm mục đích tham chiếu và xác định một nhóm loài tương đồng nhất với trình tự truy vấn. Sử dụng bộ công cụ BLAST trên cơ sở dữ liệu nr-nt của NCBI cho thấy, các vùng gene *trn* của tất cả 15 mẫu nghiên cứu đều có trình tự có độ tương đồng đạt 99% và độ bao phủ đạt 100% so với trình tự NC 053892 của loài *Curculigo orchioides* (Bảng 2).

Điều này chứng tỏ mẫu vật thu thập ngoài thực địa không bị lẫn tạp các mẫu khác, quá trình bảo quản mẫu tốt đạt độ tin cậy cao. Như vậy, kết hợp các đặc điểm hình thái [27] và phân tích di truyền có thể khẳng định tất cả 15 mẫu Sâm cau thu được tại tỉnh Thừa Thiên Huế là cùng một loài và loài nghiên cứu là *Curculigo orchioides*.

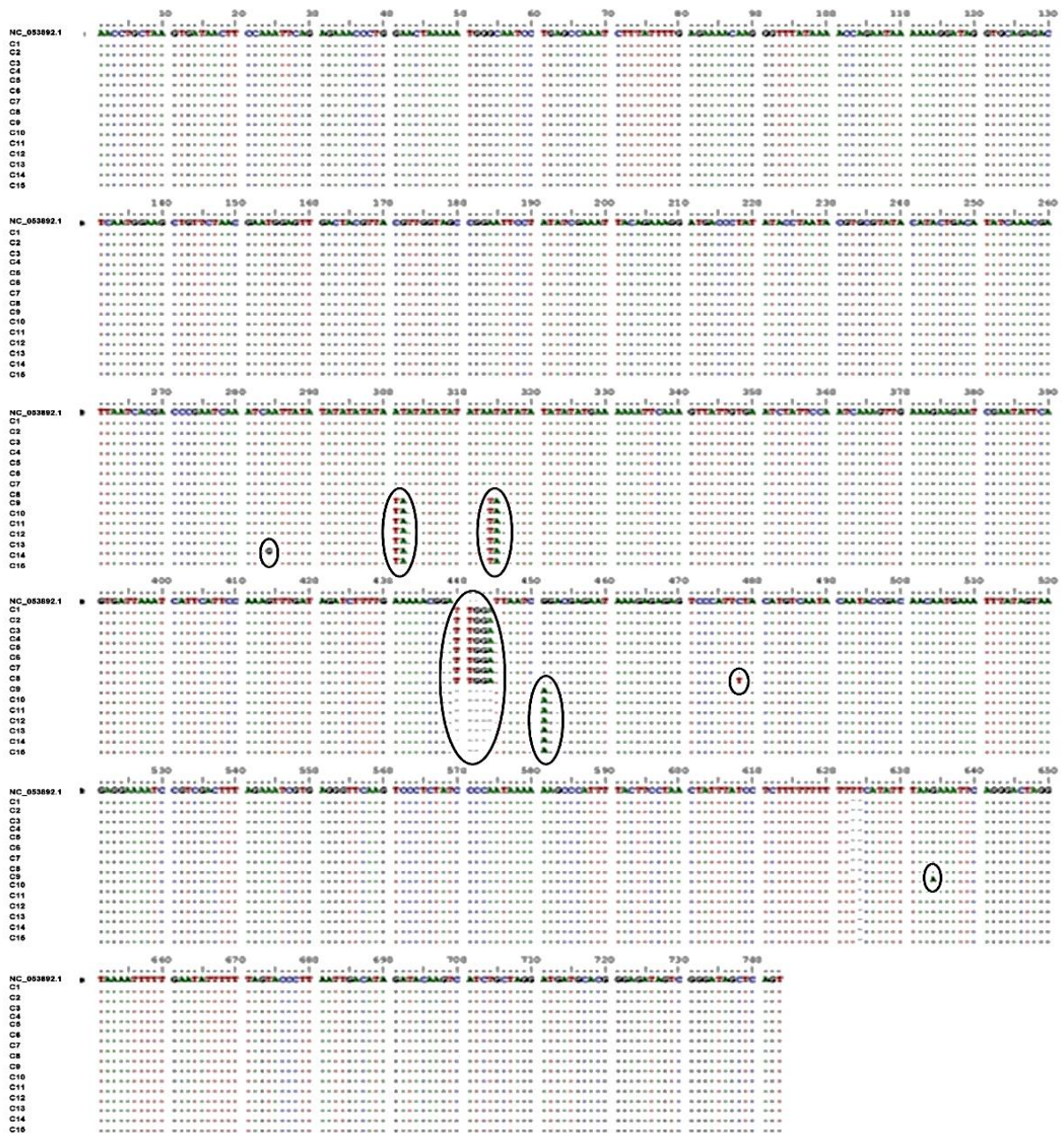
Kết quả về sự sai khác trong trình tự nucleotide trình bày ở Hình 3 cho thấy: các mẫu thu tại Hương Thủy (C1 - C5) giống nhau 100%; các mẫu ở núi Ngự Bình (C11 - C15) gần như giống nhau, trừ mẫu C14 xuất hiện đa hình 284 A>G; các mẫu C6 - C8 thu tại Hương Trà có trình tự nucleotide tương đồng với các mẫu ở Hương Thủy, còn 2 mẫu C9 - C10 thì tương đồng với các mẫu ở Huế. Ngoài ra, khi so sánh với trình tự tham chiếu (Mã số NC 053892), sự đa hình của các mẫu Sâm cau nghiên cứu còn được thể hiện rõ nét ở một số vị trí như: đa hình 301 A>T, đa hình 302 T>A, đa hình 314 A>T, đa hình 315 T>A, 446 G>A, đa hình 478 C>T, đa hình 628 G>A, thêm trình tự TTGGA ở vị trí 440-444, mất trình tự TT ở vị trí 623-624.



Hình 2. Sản phẩm PCR của vùng gene *trnL-trnF* điện di trên gel agarose 1% của các mẫu đại diện. M: thang chuẩn kích thước DNA (GeneRulerTM 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific, Mỹ).

Bảng 2. So sánh trình tự vùng gene *trnL-trnF* ở các mẫu nghiên cứu với trình tự NC 053892 (loài *Curculigo orchioides*) trên GenBank

Ký hiệu mẫu	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15
Độ bao phủ (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Độ tương đồng (%)	99,06	99,06	99,06	99,06	99,06	99,06	99,06	98,92	99,05	99,19	99,19	99,19	99,19	99,05	99,19



Hình 3. Vị trí sai khác của các mẫu nghiên cứu dựa trên trình tự DNA vùng *trnL-trnF* so với trình tự NC053892 trên GenBank.

Phân tích trình tự DNA của vùng gene *trnL-trnF* bằng phần mềm MEGA11 cho kết quả vùng bảo tồn của trình tự *trnL-trnF* ở 15 mẫu Sâm cau nghiên cứu là 734/742 vị trí, vùng biến đổi của trình tự *trnL-trnF* là 8/742 vị trí (các vị trí 284, 301, 302, 314, 315, 451, 478, 633).

Đa dạng di truyền quần thể Sâm cau tại Thừa Thiên Huế

Đa dạng di truyền (haplotype, nucleotide) của quần thể có thể bị ảnh hưởng bởi một loạt các yếu tố bao gồm quy mô mẫu, thời gian thu mẫu, địa điểm thu mẫu cũng như các yếu tố diễn ra trong quá trình chọn lọc tự nhiên, tỷ lệ đột biến, lưu lượng gene giữa các quần thể và các yếu tố con người [28]. Đa dạng haplotype (Hd) là chỉ số đánh giá mức độ xuất hiện kiểu đơn bội trong một quần thể. Hd = 1 khi toàn bộ cá thể trong

quần thể có kiểu đơn bội khác nhau. Đa dạng nucleotide (π) là chỉ số thể hiện giá trị trung bình tỷ lệ sai khác nucleotide giữa các cặp trình tự so sánh trong mỗi khảo sát [29].

Kết quả nghiên cứu đã xác định được 5 loại haplotype tại tỉnh Thừa thiên Huế với hệ số đa dạng haplotype (H_d) là $0,705 \pm 0,088$ (Bảng 3). Mức độ đa dạng nucleotide ở Hương Trà là cao nhất ($\pi = 0,005 \pm 0,001$ và có 7 điểm đột biến), thấp nhất là ở Hương Thủy ($\pi = 0$).

Các chỉ số Fu's F_s test, Tajima's D test được sử dụng trong nghiên cứu để ước tính tính trung lập trong xu hướng tiến hóa di truyền quần thể. Kết quả trình bày ở Bảng 4 cho thấy phần lớn các chỉ số này đều có giá trị dương, ngoại trừ chỉ số Tajima's D test ở Huế. Sự sai khác đều không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,10$). Chỉ số Fu's F_s test thể hiện sự trung tính trong việc mở rộng quần thể,

kết quả phân tích toàn bộ mẫu cho giá trị Fu's F_s test = 0,907. Như vậy, quần thể Sâm cau ở Thừa Thiên Huế có xu hướng mở rộng theo hướng ngẫu nhiên, trung tính. Dựa trên chỉ số Tajima's D test có thể thấy quần thể Sâm cau ở tỉnh Thừa Thiên Huế tiến hóa theo hướng chọn lọc cân bằng, thiếu các allele hiếm xuất hiện trong quần thể, tuy nhiên các xu hướng này chưa đạt mức tạo ra sự khác biệt có ý nghĩa ($P > 0,10$).

Khoảng cách di truyền giữa các mẫu thông qua chỉ số Fst được thể hiện ở Bảng 5, kết quả cho thấy quần thể nghiên cứu hầu như không có sự khác biệt (ở Hương Thủy) hoặc sai khác rất nhỏ với mẫu tham chiếu trên GenBank (mã số NC 053892). Điều này chứng tỏ mức độ tương đồng di truyền cao giữa quần thể so sánh và trình tự tham chiếu.

Bảng 3. Các chỉ số đa dạng di truyền của quần thể Sâm cau tại Thừa Thiên Huế

Quần thể	N	Nh	$H_d \pm SD$	$\pi \pm SD$	S	η	k
Hương Thủy	5	0	0	0	0	0	0
Hương Trà	5	4	$0,900 \pm 0,161$	$0,005 \pm 0,001$	7	7	3,800
Huế	5	2	$0,400 \pm 0,056$	$0,001 \pm 0,0003$	1	1	0,400
Toàn bộ mẫu	15	5	$0,705 \pm 0,088$	$0,004 \pm 0,0004$	8	8	3,067

Bảng 4. Phân tích tính trung lập của quần thể Sâm cau tại Thừa Thiên Huế

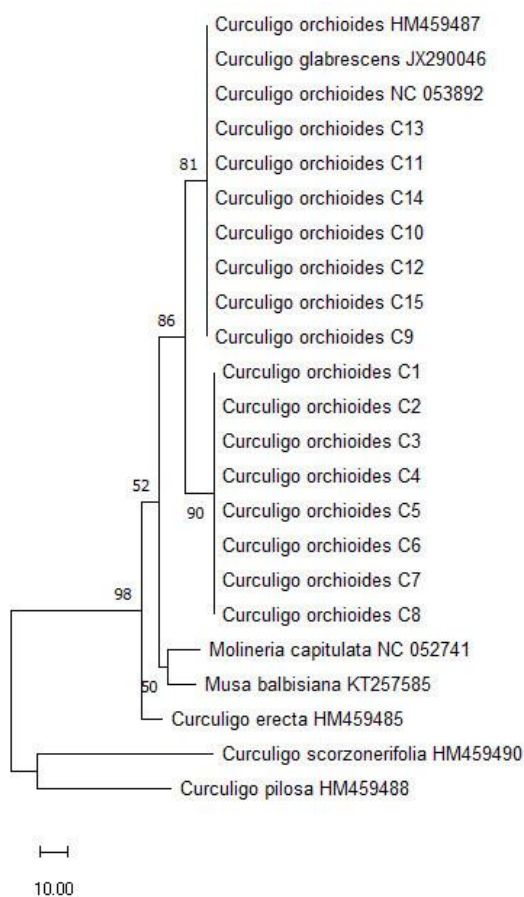
Quần thể	Tajima's D	Fu's F_s
Hương Thủy	0	0
Hương Trà	$0,913 (P > 0,1)$	0,051
Huế	$-0,817 (P > 0,1)$	0,090
Tổng cộng	$0,907 (P > 0,1)$	1,347

Bảng 5. Khoảng cách di truyền giữa các mẫu

Quần thể	NC 053892	Hương Thủy	Hương Trà	Huế
NC 053892	*			
Hương Thủy	0.0000	*		
Hương Trà	0.0023	0.0023	*	
Huế	0.0049	0.0049	0.0034	*

Xây dựng cây phả hệ

Kết quả biểu đồ hình cây về mối quan hệ phát sinh loài dựa trên trình tự nucleotide vùng gene *trnL-trnF* được xây dựng bằng phương pháp Maximum-Likelihood. Kết quả trên Hình 4 cho thấy các mẫu Sâm cau được chia làm 2 nhóm, nhóm 1 gồm 7 mẫu của huyện Hương Trà và Hương Thủy, nhóm 2 gồm 8 mẫu thuộc thị xã Hương Thủy và thành phố Huế. Như vậy có thể thấy, các mẫu được thu tại tỉnh Thừa Thiên Huế đều cùng một loài *Curculigo orchioides* thuộc họ Hypoxidaceae.



Hình 4. Cây phát sinh chủng loại các mẫu nghiên cứu dựa trên vùng gene *trnL-trnF*

4 Kết luận

Vùng gene *trnL-trnF* đã được phân lập và xác định trình tự nucleotide từ các mẫu lá tươi cần kiểm định là Sâm cau. Kết quả phân tích và so

sánh với cơ sở dữ liệu trên GenBank cho thấy các mẫu thu được có tỉ lệ giống 99% với trình tự gene *trnL-trnF* của loài *Curculigo orchioides* (NC053892). Bên cạnh đó, khi đối chiếu trình tự gene *trnL-trnF* của các mẫu nghiên cứu với một số loài trong chi Cồ nốc (*Curculigo*) cho thấy khoảng cách di truyền dao động ở biên độ nhỏ, từ 0,0000 – 0,0049. Như vậy, Sâm cau nghiên cứu tại tỉnh Thừa Thiên Huế là cùng một loài *Curculigo orchioides* thuộc họ Hypoxidaceae. Các số liệu thu thập được từ nghiên cứu đã góp phần bổ sung vào hệ thống cơ sở dữ liệu về đa dạng di truyền cây thuốc của Việt Nam.

Tài liệu tham khảo

1. Bản NT. Sách đỏ Việt Nam. Phần II: Thực vật. Hà Nội: NXB Khoa Học Tự Nhiên và Công Nghệ; 2007. 691 p.
2. Viện Dược liệu. Cây thuốc và động vật làm thuốc Việt Nam Hà Nội: Nxb Khoa học và Kỹ thuật; 2006.
3. Murali VP, Kuttan G. *Curculigo orchioides* Gaertn Effectively Ameliorates the Uro- and Nephrotoxicities Induced by Cyclophosphamide Administration in Experimental Animals. Integrative cancer therapies. 2016;15(2):205-15.
4. Lợi ĐT. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. 14, editor. Hà Nội: Nxb Y học; 2004. 910 p.
5. Srivastava RaDK. Ethnobotanical Studies on *Curculigo orchioides* from Sonebhadra District of Uttar Pradesh Indian Journal of Science Research. 2014;5(2):123-4.
6. Madhavan V, Joshi R, Murali A, Yoganarasimhan SN. Antidiabetic Activity of *Curculigo orchioides* Root Tuber. Pharmaceutical Biology. 2007;45(1):18-21.
7. Chauhan NS, Sharma V, Thakur M, Dixit VK. *Curculigo orchioides*: the black gold with numerous health benefits. Journal of Chinese integrative medicine. 2010;8(7):613-23.
8. Chukwuma S, Ezeonu, Chigozie M. Ejikeme. Qualitative and Quantitative Determination of Phytochemical Contents of Indigenous Nigerian Softwoods. New Journal of Science. 2016;2016:1-9.
9. Anandakirouchenane E, Chandiran IS, Kadalmani B. An Investigation on Preliminary Phytochemical

- and Safety Profiles of Methanolic Root Extract of *Curculigo orchioides*. Journal of Pharmacy Research. 2013;7(8):692-6.
10. Tan S, Xu J, Lai A, Cui R, Bai R, Li S, et al. Curculigoside exerts significant anti-arthritic effects *in vivo* and *in vitro* via regulation of the JAK/STAT/NF-kappaB signaling pathway. Mol Med Rep. 2019;19(3):2057-64.
 11. Chopra R, Nayar S, Chopra I. Glossary of Indian Medicinal Plants. The Quarterly Review of Biology. 1956;33(2):330ps.
 12. Pandit P, Singh A, Bafna A, Kadam P, Patil M. Evaluation of Antiasthmatic Activity of *Curculigo orchioides* Gaertn. Rhizomes. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2008;70(4):440-4.
 13. Nagesh KS, Shanthamma C. Antibacterial Activity of *Curculigo orchioides* Rhizome Extract on Pathogenic Bacteria. African Journal of Microbiology Research. 2009;3(1):005-9.
 14. Asif M. A Review on Phytochemical and Ethnopharmacological Activities of *Curculigo orchioides*. Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences. 2012;39(3-4):1-10.
 15. Thakur M, Chauhan NS, Sharma V, Dixit VK, Bhargava S. Effect of *Curculigo orchioides* on Hyperglycemia-induced Oligospermia and Sexual Dysfunction in Male Rats. International journal of impotence research. 2012;24(1):31-7.
 16. Irshad S, Singh J, Jain SP, Khanuja SPS. *Curculigo orchioides* Gaertn. (Kali Musali) An endangered medical plant of commercial value. National Product Radiance. 2006;5(5):369-72.
 17. Brintha S, Rajesh S, Renuka R, Santhanakrishnan VP, Gnanam R. Phytochemical Analysis and Bioactivity Prediction of Compounds in Methanolic Extracts of *Curculigo orchioides* Gaertn. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 2017;6(4):192-7.
 18. Dutta S, Ghosh R. DNA Barcoding: The Conspicuous Scan. In: Saranraj P, editor. Compendium of "Research Insights of Life Science Students (Rilss)". India: JPS Scientific Publications; 2022. p.1309-13.
 19. Emerson BC, Cicconardi F, Fanciulli PP, Shaw PJ. Phylogeny, Phylogeography, Phylobetadiversity and the Molecular Analysis of Biological Communities. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2011;366(1576):2391-402.
 20. Guo M, Yuan C, Tao L, Cai Y, Zhang W. Life Barcoded by DNA Barcodes. Conservation Genetics Resources. 2022:1-15.
 21. Hebert PD, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W. Ten Species in One: DNA Barcoding Reveals Crypticspecies in the Neotropical Skipper Butterfly *Stratops fulgerator*. PNAS. 2004;101(41):14812-7.
 22. Group1 CPW, Hollingsworth PM, Forrest LL, Spouge JL, Hajibabaei M, Ratnasingham S, et al. A DNA barcode for land plants. PNAS. 2009;106(31):12794-7.
 23. 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):e13102.
 24. Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J. Universal Primers for Amplification of Three Non-coding Regions of Chloroplast DNA. Plant Mol Biol. 1991;17(5):1105-9.
 25. Yulita KS. Secondary Structures of Chloroplast trnL Intron in Dipterocarpaceae and its Implication for the Phylogenetic Reconstruction. HAYATI Journal of Biosciences. 2013;20(1):31-9.
 26. Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, et al. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. Molecular Biology and Evolution. 2017;34(12):3299-302.
 27. Nidhi Soni, V. K. Lal, Shikha Agrawal, Verma H. Golden eye grass - a magical remedy by nature. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2012;3(8).
 28. Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. Introduction to Conservation Genetics: Cambridge: Cambridge University Press; 2002.
 29. Hà TTT, Hương NT, Thảo NP, Hằng TNA. Mức độ đa dạng di truyền của một số quần đàn cá tra sử dụng chỉ thị phân tử cytochrome b. Tạp chí khoa học, Trường Đại học Vinh. 2017;46(4A):21-31.