

Đánh giá khả năng phân loại của vùng gen ITS-rDNA đối với loài Hoàng liên ô rô lá dày (*Mahonia bealei* (Fortune) Pynaert) của Việt Nam

Nguyễn Thị Phương Trang^{1*}, Vũ Thị Huệ², Nguyễn Hùng Mạnh¹, Bùi Văn Thanh¹

¹Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

²Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

Ngày nhận bài 28/8/2020; ngày chuyển phản biện 7/9/2020; ngày nhận phản biện 21/10/2020; ngày chấp nhận đăng 6/11/2020

Tóm tắt:

Hoàng liên ô rô lá dày (*Mahonia bealei* (Fortune) Pynaert) là loài dược liệu quý có nhiều giá trị sử dụng và phạm vi phân bố hẹp, là một trong những vị thuốc được dùng nhiều trong y học cổ truyền. Trong tự nhiên, loài này trước đây khá phong phú nhưng do bị khai thác và buôn bán quá mức nên đã bị suy giảm mạnh cả về số lượng và chất lượng. Hoàng liên ô rô lá dày được Sách đỏ Việt Nam xếp ở mức nguy cấp (EN). Hiện nay, mã vạch DNA được xem là kỹ thuật phổ biến có tính chính xác cao trong xác định, nhận dạng loài bằng cách giải mã các đoạn DNA đặc trưng cho loài. Trong nghiên cứu này, các tác giả đã phân tích đặc điểm phân tử vùng gen *ITS-rDNA* và đánh giá khả năng phân loại của vùng gen này đối với loài Hoàng liên ô rô lá dày của Việt Nam. Kết quả cho thấy, vùng gen ITS dài 700 bp có chứa 24,1% Thymine, 28,4% Guanine, 23,4% Adenine và 24,1% Cytosine, là vùng gen phù hợp, có thể sử dụng như một mã vạch DNA để xác định loài *Mahonia bealei* và nghiên cứu mối quan hệ di truyền cho các loài thuộc họ *Berberidaceae*. Sự khác biệt di truyền trung bình giữa chi *Mahonia* và *Berberis* dựa trên phân tích trình tự gen ITS là 2,36%, trong khi với các chi khác là 17-22%. Cặp mồi đặc hiệu khuếch đại vùng gen ITS dài 300 bp loài *M. bealei* cũng đã được phát triển và tổng hợp, góp phần hữu ích cho công tác giám định và bảo tồn loài. Trình tự vùng gen ITS-300 của Hoàng liên ô rô lá dày cũng đã được gửi vào Ngân hàng gen thế giới (Genbank) với mã số truy cập là MT 008067.

Từ khóa: bảo tồn nguồn gen, Hoàng liên ô rô lá dày, ITS, *Mahonia bealei*.

Chỉ số phân loại: 3.4

Mở đầu

Hoàng liên ô rô lá dày hay còn gọi là hoàng mộc, hoàng liên ô rô, hoàng bá gai, mật gấu... là loài cây bụi thường xanh, cao 2-3 m, thuộc chi Mã hồ (*Mahonia* Nutt., 1818), họ Hoàng liên gai (*Berberidaceae*) đã được Fortune Robert mô tả và công bố vào năm 1850 với tên khoa học là *Berberis bealei* Fortune, 1850. Đến năm 1875, Pynaert Edouard-Christophe đã xác định lại loài này thuộc chi *Mahonia* và đặt lại tên khoa học là *M. bealei* (Fortune) Pynaert. Đến nay, họ Hoàng liên gai được xác định có 17 chi và gần 650 loài [1]. Các nghiên cứu về phân bố cho thấy, các loài thuộc họ Hoàng liên gai chủ yếu phân bố ở khu vực ôn đới phía bắc và vùng núi á nhiệt đới. Theo Bùi Văn Hường và cs (2017) [2], Hoàng liên ô rô lá dày được ghi nhận ở Trung Quốc (An Huy, Phúc Kiến, Quảng Đông...) và ở Việt Nam (Lào Cai, Hà Giang, Lai Châu).

Hoàng liên ô rô lá dày có tính thanh nhiệt, nên có tác

dụng thanh lọc và loại bỏ độc tố, được sử dụng làm thuốc điều trị các bệnh như tiêu chảy, kiết lỵ, vàng da, viêm loét dạ dày, áp xe, đau răng, viêm họng [3]. Trong tự nhiên, loài này phát triển ở những nơi có lượng mùn ít như dưới các tán rừng thưa, các trảng cây bụi hoặc sườn núi đá vôi, do vậy rất thích hợp để sử dụng trong công tác trồng rừng ở những khu vực nghèo dinh dưỡng hoặc địa hình hiểm trở (như ở các vách núi). Tuy nhiên hiện nay, loài này do bị khai thác và buôn bán quá mức nên đã bị suy giảm mạnh cả về số lượng và chất lượng. Sách đỏ Việt Nam 2007 xếp Hoàng liên ô rô lá dày ở mức nguy cấp (EN). Ở Việt Nam, chi *Mahonia* được biết đến với 3 loài gồm, *Mahonia japonica*, *Mahonia bealei* và *Mahonia nepalensis*, trong đó loài *Mahonia bealei* - Hoàng liên ô rô lá dày được coi là bị đe dọa ở mức độ cao nhất so với 2 loài còn lại do có số lượng cá thể của nó còn rất ít trong tự nhiên [4].

Đến nay, các nghiên cứu của Việt Nam về loài này chủ yếu chỉ tập trung vào mô tả hình thái, đặc điểm sinh học,

*Tác giả liên hệ: Email: nptrang@gmail.com

Assessment of classification ability of ITS-rDNA region on *Mahonia bealei* (Fortune) Pynaert in Vietnam

Thi Phuong Trang Nguyen^{1*}, Thi Hue Vu²,
Hung Manh Nguyen¹, Van Thanh Bui¹

¹Institute of Ecology and Biological Resources, VAST

²Hanoi National University of Education

Received 28 August 2020; accepted 6 November 2020

Abstract:

Mahonia bealei is a valuable medicinal plant with high economic value and a narrow range of distribution. It is one of the most widely used medicinal herbs in traditional medicine. In the past, this species was plentiful but due to over-exploitation and trading, it has sharply declined in both quantity and quality. At present, *M. bealei* is listed on Vietnam's Red List at the endangered level (EN). DNA barcoding is considered a popular technique with high accuracy for species identification by sequencing of specific DNA fragments. In this research, the authors studied molecular characteristics of the ITS-rDNA region and assessed of classification ability of this DNA marker on *M. bealei* in Vietnam. The result showed that the ITS with 700 bp in length contained 24.1% Thymine, 28.4% Guanine, 23.4% Adenine, and 24.1% Cytosine. The average genetic difference between the *Mahonia* genus and *Berberis* genus is 2.36% while other genera are from 17 to 22%. The result also demonstrated this ITS-rDNA region might be suitable for identification for *Mahonia bealei* as well as studying the phylogenetic of Berberidaceae. Specific primer to amplify the ITS genome in the length of 300 bp of *M. bealei* species has also been developed and synthesised, usefully contributing to *M. bealei* identification and conservation. The ITS-300 sequence of *M. bealei* was registered on the Genbank with accession number MT 008067.

Keywords: Berberidaceae, gene conservation, ITS, *Mahonia bealei*.

Classification number: 3.4

sinh thái, phân bố, giá trị tài nguyên và các phương pháp nhân giống... mà chưa hề có công trình nào nghiên cứu về đặc điểm phân tử, hệ thống học phân tử hay phát triển môi khuếch đại vùng gen đặc hiệu phục vụ cho công tác giám định và bảo tồn loài.

Mã vạch DNA (DNA barcoding) là kỹ thuật hiện đại, sử dụng đoạn DNA chứa thông tin đặc trưng cho loài để phân biệt [5, 6]. Chúng đã trở thành công cụ hiệu quả cho công tác phân loại loài, giám định mẫu vật, đánh giá mối quan hệ di truyền, phát hiện loài mới, quản lý nguồn gốc, xuất xứ, bản quyền của sản phẩm từ sinh vật [7].

Ở thực vật bậc cao, một số chỉ thị lục lạp (*matK*, *rbcL*, *psbA-trnH*, *atpF-atpH*...) và gen nhân (*ITS*, *18S*...) đã và đang được sử dụng rộng rãi trong việc phân loại loài, nghiên cứu về mối quan hệ di truyền và nhận dạng loài hay xác định/lựa chọn cây giống trên cơ sở phân tích các trình tự nucleotide.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện giải mã trình tự nucleotide vùng gen *ITS* của loài Hoàng liên ô rô lá dày phân bố ở Việt Nam, với mục tiêu là tìm hiểu về đặc điểm phân tử cũng như đánh giá khả năng phân loại của vùng gen này, góp phần bổ sung cơ sở dữ liệu về di truyền cho loài; tiếp theo là phát triển cặp mồi đặc hiệu phục vụ cho công tác giám định, bảo tồn nguồn gen loài Hoàng liên ô rô lá dày của Việt Nam.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Hai mẫu lá loài Hoàng liên ô rô lá dày được nhóm nghiên cứu của Phòng Dân tộc học thực vật, Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật thu tại Hà Giang năm 2018 (ký hiệu mẫu SM02) và thu tại Bát Xát (Lào Cai) năm 2011 (ký hiệu mẫu BLC03). Ngoài ra, 4 mẫu khác thuộc họ Berberidaceae gồm:

- *B. hypoxantha* thu tại Sa Pa, Lào Cai năm 2016 (ký hiệu mẫu B1).
- *B. julianae* thu tại Sa Pa, Lào Cai năm 2007 (SB01).
- *M. jingxiensis* thu tại Hàm Yên, Tuyên Quang năm 2018 (C307).
- *M. klossii* thu tại Đà Lạt, Lâm Đồng năm 2017 (DL02).

4 mẫu trên được sử dụng để làm mẫu đối chứng cũng như để xây dựng cây phát sinh chủng loại nhằm so sánh về khoảng cách di truyền với loài *M. bealei* thu tại Hà Giang và Lào Cai.

Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết DNA tổng số: DNA tổng số được tách chiết theo phương pháp của J.J. Doyle và J.L. Doyle (1990) [8]

(có hiệu chỉnh để phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm của Việt Nam).

Nhân bản gen ITS bằng kỹ thuật PCR: vùng gen ITS dài 700 bp của cả 6 mẫu nghiên cứu được nhân bản bằng PCR với cặp mồi ITS1/ITS2 (5'-CCCTATCAYTTAGAGGAAGGAG-3'/5'-CCGCTTAKTGATATGCTTAAA-3' [9]. Mỗi phản ứng PCR có thể tích 30 μ l với các thành phần: 15 μ l PCR Master mix kit (2X), 0,5 μ l mồi xuôi (10 pmol/ μ l), 0,5 μ l mồi ngược (10 pmol/ μ l), 1 μ l ADN (10-20 ng) và cuối cùng là 13 μ l H₂O deion. Phản ứng được thực hiện trên máy PCR model SimpliAmp của Hãng Applied Biosystems-Life Technologies-Thermo Fisher Scientific (Hoa Kỳ). Chu trình nhiệt của phản ứng PCR với 35 chu kỳ gồm: biến tính DNA ở 94°C trong 3 phút; 94°C trong 45 giây, bắt cặp mồi ở 55°C trong 30 giây, kéo dài sợi DNA ở 72°C trong 30 giây; kết thúc phản ứng nhân gen ở 72°C trong 5 phút và giữ sản phẩm ở 15°C. Kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agarose 1%.

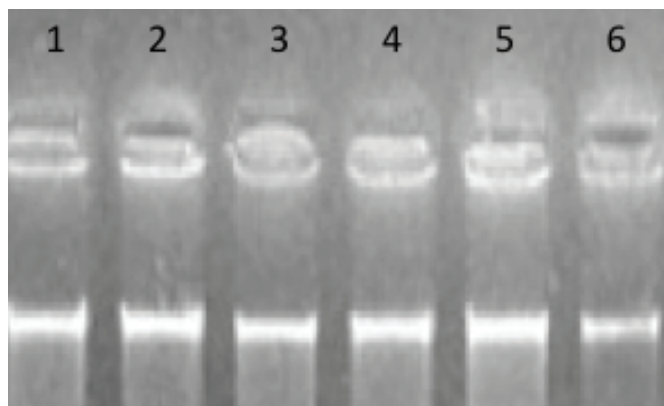
Giải trình tự và xử lý số liệu: quá trình xác định trình tự nucleotide được thực hiện tại Công ty Firstbase (Malaysia). Trình tự DNA thu được sau đó được kiểm tra và ghép nối bằng phần mềm Chromas-Pro2.1.6 (Technelysium Pty Ltd, Úc). Trình tự nucleotide vùng gen ITS của mẫu Hoàng liên ô rô lá dày (SM02 và BLC03) sau khi ghép nối và loại bỏ phần nhiễu được đưa vào BLAST (NCBI) để so sánh với các trình tự sẵn có trên Genbank nhằm kiểm tra tính chính xác của vùng gen được khuếch đại. Các trình tự phân tích được sắp xếp thẳng hàng bằng phần mềm Bioedit v7.0.5.2 [10]. Các vùng nucleotide bị nhiễu hoặc không tương ứng với nhau sẽ bị loại bỏ trước khi tiến hành phân tích.

Xây dựng cây phát sinh chủng loại: cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên phương pháp xác suất tối đa ML (Maximum Likelihood). Thực hiện với 1.000 lần lặp lại để xác định giá trị ủng hộ (bootstrap). Khoảng cách di truyền (*P*) giữa các loài trong chi được tính toán bằng phần mềm Mega 7.0 [11] theo mô hình Kimura hai tham số.

Kết quả và thảo luận

Kết quả tách chiết DNA tổng số

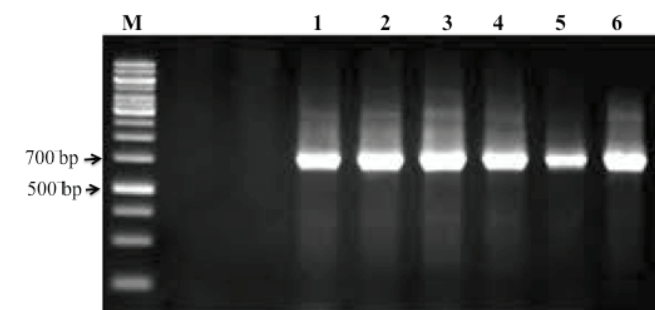
DNA tổng số của 6 mẫu nghiên cứu sau khi tách chiết được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% (hình 1). Kết quả điện di kiểm tra cho thấy, vạch DNA thu được rõ nét chứng tỏ DNA tổng số ít bị đứt gãy và tương đối sạch. Kết quả đo OD cũng cho thấy chỉ số OD₂₆₀/OD₂₈₀ của các mẫu đều từ 1,81 đến 1,83, chứng tỏ hàm lượng DNA thu được có độ tinh khiết cao.



Hình 1. Kết quả kiểm tra DNA tổng số 6 mẫu nghiên cứu trên gel agarose 1% (giếng số 1-6: thứ tự các mẫu lần lượt là SM02, BLC03, B1, SB01, C307, DL02).

Kết quả nhân bản trình tự gen ITS bằng PCR

Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy cả 6 mẫu đều xuất hiện 1 vạch rõ nét có kích thước khoảng 700 bp (hình 2), chứng tỏ cặp mồi ITS1/ITS2 đã nhân bản thành công ở nhiệt độ gắn mồi là 55°C cho cả 6 mẫu nghiên cứu. Sản phẩm PCR sáng đậm, rõ nét, đủ tiêu chuẩn để giải mã trình tự nucleotide trực tiếp.



Hình 2. Sản phẩm PCR 6 mẫu nghiên cứu khi kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% (M: marker phân tử DNA 1 kb ladder; giếng 1-6: thứ tự các mẫu nghiên cứu lần lượt là SM02, BLC03, B1, SB01, C307, DL02).

Kết quả phân tích trình tự gen ITS

Kết quả kiểm tra tính tương đồng trình tự vùng gen ITS của mẫu Hoàng liên ô rô lá dày với các trình tự sẵn có trên Genbank cho thấy, trình tự vùng gen ITS của cả 2 mẫu *M. bealei* SM02 và BLC03 giống hệt nhau và đều cho kết quả tương đồng 100% với loài *B. bealei* mã số MG730545 (loài của Trung Quốc). Điều này chứng tỏ mẫu nghiên cứu là loài *B. bealei* và kết quả PCR đã nhân bản chính xác vùng gen ITS.

Thông thường, kết quả BLAST không cho kết luận chính xác về loài, nhưng với những trường hợp BLAST có độ bao phủ và tương đồng cao (trên 98%) thì có thể đưa ra

gợi ý về những loài gần gũi với mẫu nghiên cứu. Kết quả so sánh vùng gen ITS của 4 mẫu nghiên cứu còn lại trên Genbank cũng đều cho thấy sự gần gũi với các loài trong chi *Berberis*, cụ thể mẫu DL02 (*M. klossii*) gần gũi 93% với loài *B. bealei* (mã số MG730545); C307 (*M. jingxiensis*) gần gũi 97% với loài *B. dictyophylla* (mã số X83829.1); SB01 (*B. julianae*) gần gũi 97,27% với loài *B. hemsleyana* (mã số KY 624390); và B1 (*B. hypoxantha*) gần gũi 97,89% với loài *B. bealei* (mã số MG730545). Điều đó cho thấy chúng tôi đã khuếch đại thành công vùng gen ITS cho tất cả 6 mẫu nghiên cứu.

Kết quả kiểm tra trình tự nucleotide vùng gen ITS dài 700 bp của loài *M. bealei* cho thấy tỷ lệ phần trăm các nucleotide T, G, A và C lần lượt là 24,1, 28,4, 23,4 và 24,1%. Trong đó, có 59 vị trí biến đổi (variable) và 27 vị trí nucleotide có giá trị mang thông tin di truyền (Parsimony).

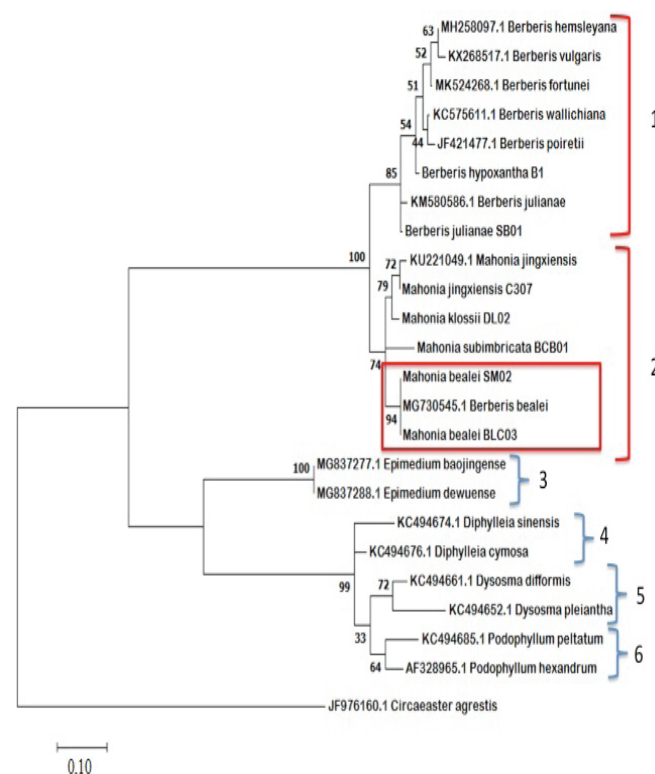
Khoảng cách di truyền và vị trí phân loại của loài Hoàng liên ô rô lá dày

Trình tự nucleotide vùng gen ITS của mẫu SM02 và BLC03 sau khi loại bỏ tất cả các vị trí trống thì được so sánh với 20 loài khác của họ *Berberidaceae*, trong đó có 17 loài lấy dữ liệu trên Genbank, gồm 16 loài họ *Berberidaceae* (7 loài thuộc chi *Berberis*, 1 loài thuộc *Mahonia*, 2 loài thuộc *Epimedium*, 2 loài thuộc *Diphylleia*, 2 loài thuộc *Dysosma*, 2 loài thuộc *Podophyllum*) và 1 loài Tinh diệp thảo (*Circaeaster agrestis*) được sử dụng là loài ngoài nhóm (bảng 1); 4 loài khác là các mẫu B1 (*B. hypoxantha*), SB01 (*B. julianae*), C307 (*M. jingxiensis*) và DL02 (*M. klossii*).

Bảng 1. Danh sách 17 loài lấy dữ liệu từ Genbank dùng để so sánh với 6 mẫu nghiên cứu.

TT	Tên loài	Mã số Genbank
1	<i>B. hemsleyana</i>	MH258097.1
2	<i>B. vulgaris</i>	KX268517.1
3	<i>B. fortunei</i>	MK524268
4	<i>B. wallichiana</i>	KC575611.1
5	<i>B. poiretii</i>	JF421477.1
6	<i>B. julianae</i>	KM580586.1
7	<i>M. jingxiensis</i>	KU221049.1
8	<i>B. bealei</i>	MG730545.1
9	<i>Epimedium baojingense</i>	MG837277.1
10	<i>Epimedium dewuense</i>	MG837288.1
11	<i>Diphylleia sinensis</i>	KC494674.1
12	<i>Diphylleia cymosa</i>	KC494676.1
13	<i>Dysosma difformis</i>	KC494661.1
14	<i>Dysosma pleiantha</i>	KC494652.1
15	<i>Podophyllum peltatum</i>	KC494685.1
16	<i>Podophyllum hexandrum</i>	AF328965.1
17	<i>Circaeaster agrestis</i>	AF328965.1

Sơ đồ mối quan hệ di truyền của 23 loài họ *Berberidaceae* đã được xây dựng theo phương pháp ML. Theo đó, 23 loài nghiên cứu chia thành 2 nhánh chính lớn: nhánh chính lớn 1 gồm các loài của chi *Berberis* và *Mahonia*; nhánh chính lớn 2 gồm các loài của chi *Epimedium*, *Diphylleia*, *Dysosma* và *Podophyllum*. Trong đó, nhánh chính lớn 1 lại chia thành 2 nhánh phụ, gồm nhánh phụ số 1 (các loài thuộc chi *Berberis*) và 2 (các loài thuộc chi *Mahonia*). Nhánh chính lớn 2 cũng chia thành 4 nhánh phụ nhỏ hơn tương ứng với các chi khác nhau (nhánh phụ số 3, 4, 5, 6) (hình 3). Điều đó cho thấy, *Berberis* và *Mahonia* là 2 chi có quan hệ rất gần gũi với nhau, cụ thể khoảng cách di truyền trung bình của 2 chi này là 0,0236 ($\approx 2,3\%$) (tính trung bình trên 7 mẫu *Mahonia* và 8 mẫu *Berberis* nghiên cứu), trong khi đó khoảng cách di truyền trung bình giữa chi *Mahonia* với *Dysosma* lên đến 0,223 ($\approx 22,3\%$), với chi *Epimedium* là 0,198 ($\approx 19,8\%$) và *Podophyllum* là 0,214 ($\approx 21,4\%$). Ở nhánh chính lớn số 2 kết quả phân tích bằng khoảng cách di truyền cho thấy, chi *Podophyllum* có quan hệ gần gũi với *Dysosma* với khoảng cách di truyền (P) là 0,041 ($\approx 4,1\%$) (tính trung bình trên 4 mẫu nghiên cứu) (hình 4).



Hình 3. Sơ đồ mối quan hệ di truyền của 6 mẫu nghiên cứu với 17 loài khác trên cơ sở phân tích trình tự nucleotide vùng gen ITS-rDNA bằng phương pháp ML [loài Tinh diệp thảo (*Circaeaster agrestis*) được sử dụng làm loài ngoài nhóm].

Việc phát triển cặp mồi khuếch đại được vùng gen ITS đặc hiệu sẽ giúp cho công tác giám định loài Hoàng liên ô rô lá dày ở Việt Nam trở nên nhanh chóng, bởi xác định loài với thông tin chính xác là một trong những chìa khóa để cải thiện công tác quản lý và bảo tồn loài [14].

Kết luận

Kết quả phân tích trình tự gen ITS loài *M. bealei* cho thấy vùng gen này không chỉ được sử dụng hiệu quả như một mã vạch để xác định các loài thuộc chi *Mahonia*, mà còn là vùng gen rất hữu ích cho phân tích phát sinh chủng loại các loài thuộc họ *Berberidaceae* nói chung, chi *Mahonia* nói riêng.

Việc phát triển cặp mồi khuếch đại vùng gen ITS dài 300 bp đặc hiệu của loài *M. bealei* góp phần đưa ra phương pháp nhanh chóng và chính xác để xác định loài này, đây là vấn đề rất hữu ích, góp phần quan trọng cho công tác bảo tồn nguồn gen một loài dược liệu quý.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí từ đề tài của Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (mã số 106-NN.03-2016.49) và của Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật (mã số IEBR ĐT.13-20). Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] J.M. He, Q. Mu (2015), "The medicinal uses of the genus *Mahonia* in traditional Chinese medicine: an ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review", *Journal of Ethnopharmacol.*, **175**, pp.668-683.

[2] Bui Van Huong, Ngo Duc Phuong, Nguyen Trung Thanh, Tran Van Tu, Nguyen Thai Son, Nguyen Thi Van Anh, Bui Van Thanh (2017), "Biological and ecological characteristics of *Mahonia bealei* (Fortune) Pynaert in Vietnam", *Journal of Science and Technology*, **33**, pp.51-57.

[3] Do Tat Loi (2004), *Vietnamese medicinal plants and herbs*, Medicine Publishing House.

[4] Bui Van Huong, Bui Van Thanh, Nguyen Thi Van Anh, Pham Huyen (2017), "Research on cutting propagation of *Mahonia bealei* (Fortune) Pynaert", *National conference on ecology and biological resources*.

[5] W.J. Kress (2005), "Use of DNA barcodes to identify flowering plants", *PNAS*, **102**, pp.8369-8374.

[6] R. Lahaye (2008), "DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots", *PNAS*, **105**, pp.2923-2928.

[7] S. Chen (2010), "Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species", *PLOS ONE*, **5**, p.e8613.

[8] J.J. Doyle, J.L. Doyle (1990), "Isolation of plant DNA from fresh tissue", *Focus*, **12**, pp.13-15.

[9] T. Cheng (2016), "Barcoding the kingdom plantae: new PCR primer for ITS region of plants with improved universality and specificity", *Molecular Ecology Resources*, **16**, pp.138-149.

[10] T.A. Hall (1999), "BioEdit v7.0.5.2: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT", *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, pp.95-98.

[11] S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura (2016), "MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets", *Molecular Biology and Evolution*, **33**, pp.1870-1874.

[12] Y.D. Kim, K.J. Robert (1996), "Phylogenetic implications of rbcL and ITS sequence variation in the *Berberidaceae*", *Systematic Botany*, **21**, pp.381-396.

[13] Y.D. Kim (2004), "Phylogeny of *Berberidaceae* based on sequences of the chloroplast gene *ndhF*", *Biochemistry Systematics and Ecology*, **32**, pp.291-301.

[14] A.T. Blasi, M. Vorontsova (2015), "Plant identification is key to conservation", *Nature*, **521**, p.161.