



Original Article

Comparative Analysis of Different DNA Extraction Methods and Preliminary Analysis of Genetic Diversity of *Hedera nepalensis* K. Koch. in Vietnam Based on *GBSSI* Marker

Dinh Doan Long^{1,*}, Nguyen Xuan Bach¹, Nguyen Thi Thu Thao¹,
Pham Thi Hong Nhung¹, Do Thi Le Hang¹, Vu Thi Thom¹, Pham Thanh Huyen²

¹VNU School of Medicine and Pharmacy, 144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

²National Institute of Medicinal Materials, 3B Quang Trung, Hoan Kiem, Hanoi, Vietnam

Received 03 May 2019

Revised 09 May 2019; Accepted 21 June 2019

Abstract: Though the ivy (*Hedera nepalensis* K. Koch.) has long been utilized in traditional medicine, its genome information is very limited. For plants, an effective method of DNA extraction is a very important step which greatly affects subsequent genetic analyses. In this study, four different methods of DNA extraction from dry leaves were used. A comparison of different protocols resulted in the yield of extracted DNA that ranged from 10.5 to 437.4 ng/ μ l and with a purity ranged from 1.8 to 2.2. Based on the PCR results of *GBSSI* gene, Gene JET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit is the most optimal extraction method for Vietnam ivy's dry leaves. A preliminary analysis of the phylogenetic tree based on the *GBSSI* marker showed that ivy growing in a number of northern mountainous provinces of Vietnam belonged to the *H. nepalensis* K. Koch species. The high - quality total DNA will allow us to amplify different DNA markers, providing valuable genetic information to preserve and develop medicinal resources in Vietnam.

Keywords: *GBSSI*, *Hedera nepalensis* K. Koch, DNA extraction.

* Corresponding author.

Email address: longdd.ksh@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4165>



Đánh giá hiệu quả tách chiết DNA tổng số từ một số quy trình phân tích khác nhau và bước đầu phân tích đa dạng di truyền nguồn gen Dây Thường Xuân (*Hedera nepalensis* K. Koch.) dựa vào chỉ thị *GBSSI*

Đinh Đoàn Long^{1,*}, Nguyễn Xuân Bách¹, Nguyễn Thị Thu Thảo¹,
Phạm Thị Hồng Nhung¹, Đỗ Thị Lệ Hằng¹, Vũ Thị Thom¹, Phạm Thanh Huyền²,

¹Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Dược liệu, 3B Quang Trung, Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 03 tháng 5 năm 2019

Chỉnh sửa ngày 09 tháng 5 năm 2019; Chấp nhận đăng ngày 21 tháng 6 năm 2019

Tóm tắt: Dây thường xuân (*Hedera nepalensis* K. Koch.) là cây thuốc từ lâu đã được sử dụng trong y học cổ truyền nhưng thông tin về hệ gen của chúng còn rất hạn chế. Ở thực vật, lựa chọn được phương pháp tách chiết DNA hiệu quả là bước rất quan trọng, có ảnh hưởng lớn đến các phân tích di truyền tiếp theo. Trong nghiên cứu này, bốn phương pháp tách chiết DNA khác nhau từ mẫu lá khô Dây thường xuân đã được sử dụng để tìm ra phương pháp hiệu quả nhất. Các phương pháp tách chiết khác nhau cho DNA tổng số có nồng độ dao động từ 10,5 đến 437,4 ng/ μ l; độ tinh sạch đánh giá thông qua chỉ số hấp thụ quang đo ở bước sóng 260 và 280 nm dao động từ 1,8 đến 2,2. Dựa trên kết quả khuếch đại gen mã hóa enzym tạo liên kết hạt *GBSSI* bằng kỹ thuật PCR, GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit được đánh giá có hiệu quả thu hồi DNA tổng số có chất lượng tốt nhất với mẫu lá khô Dây thường xuân. Bước đầu phân tích trên chỉ thị *GBSSI*, cây phát sinh chủng loại xây dựng từ các mẫu Dây thường xuân cho thấy các mẫu này thuộc loài *H. nepalensis* K. Koch. Nghiên cứu này cho thấy nguồn DNA tổng số chất lượng cao sẽ cho phép nhân dòng được các chỉ thị DNA khác với hiệu quả cao, qua đó cung cấp thông tin di truyền có giá trị cho phân loại, bảo tồn và phát triển nguồn dược liệu ở Việt Nam.

Từ khóa: *GBSSI*, Dây thường xuân, *Hedera nepalensis*, tách chiết DNA tổng số.

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: longdd.ksh@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4165>

1. Đặt vấn đề

Chi *Hedera* trong hệ thống phân loại thực vật thuộc họ Nhân sâm (Araliaceae), được ghi nhận tổng cộng có 15 loài với đặc điểm hình thái chung dạng dây leo [1]. Trong đó, hai loài được nghiên cứu và sử dụng làm thuốc phổ biến hơn cả là Thường xuân (*Hedera helix* L.) và Dây thường xuân (*Hedera nepalensis* K. Koch.). Thường xuân không phải cây bản địa ở Việt Nam trong khi Dây thường xuân có phân bố tương đối hẹp ở Châu Á và được ghi nhận xuất hiện ở một số tỉnh vùng núi cao Việt Nam [2]. Trong *H. nepalensis* có chứa các hợp chất n-hexan và ethyl acetate được chứng minh có tác dụng chống ung thư, ngoài ra còn chứa lupeol, triterpenoid có hoạt tính ức chế dipeptidyl peptidase-4 với tiềm năng chữa bệnh đái tháo đường [3-5]. Không chỉ vậy, nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng *H. nepalensis* K. Koch. có tác dụng bảo vệ thần kinh, chống viêm, giảm đau, chống đông máu và chống trầm cảm [5, 6]. Với tiềm năng như vậy, song đến nay trên Thế giới các nghiên cứu về *H. nepalensis* K. Koch. nhìn chung còn tương đối ít. Ở Việt Nam chưa có nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền nguồn gen Dây thường xuân trong khi nhu cầu phát triển thuốc dược liệu đang ngày một tăng cao.

Phân tích đa dạng di truyền và xây dựng tiêu chuẩn chất lượng về nguồn gen góp phần giải

quyết nhu cầu khai thác hiệu quả và quản lý bền vững nguồn tài nguyên dược liệu. Với Dây thường xuân, phân loại dựa vào đặc điểm hình thái có thể nhầm lẫn do mức độ phân hóa lớn của lá cây (phần hay được thu hái làm thuốc). Ngày nay, ứng dụng sinh học phân tử là phương pháp tiếp cận hiệu quả giúp phân loại thực vật dựa trên các chỉ thị DNA. Gen *GBSSI* (Granule-bound starch synthase) hay còn gọi là gen *waxy* là một gen nằm trong nhân có số lượng bản sao thấp, mã hóa cho enzym tạo liên kết hạt. Đây là chỉ thị DNA đã được sử dụng thành công để xây dựng cây phát sinh chủng loại của họ Araliaceae ở châu Á [7]. Nhưng chỉ thị *GBSSI* có phải là một chỉ thị tốt để đánh giá đa dạng di truyền loài Dây thường xuân Việt Nam là một câu hỏi chưa có lời giải. Để có thêm thông tin di truyền của Dây thường xuân, bước đầu tiên và cũng rất quan trọng là tách chiết được DNA tổng số từ tế bào thực vật một cách hiệu quả. Có nhiều phương pháp tách chiết và kit tách chiết DNA tổng số từ mẫu thực vật được lưu hành nhưng chưa có nghiên cứu đánh giá được phương pháp nào là hiệu quả nhất đối với mẫu lá khô Dây thường xuân. Chính vì vậy, chúng tôi thực hiện đề tài nghiên cứu này với hai mục tiêu là đánh giá hiệu quả tách chiết DNA tổng số sử dụng các quy trình khác nhau và bước đầu xây dựng cây phát sinh chủng loại Dây thường xuân dựa trên chỉ thị *GBSSI*.

Bảng 1. Danh sách mẫu thực vật sử dụng trong nghiên cứu

TT	Ký hiệu mẫu	Địa điểm lấy mẫu	Tọa độ địa lý
1	H1	Bản Khoang, Sa Pa, Lào Cai	22°22'37.53"N - 103°47'31.76"E
2	H2	Bản Khoang, Sa Pa, Lào Cai	22°22'37.53"N - 103°47'31.76"E
3	H3	Trạm cây thuốc Sapa, Lào Cai	22°21'10.29"N - 103°51'36.04"E
4	H4	Hồ Thầu, Hoàng Su Phì, Hà Giang	22°39'28.47"N - 104°35'57.14"E
5	H5	Thị trấn Sa Pa, Lào Cai	22°20'17.84"N - 103°49'52.89"E
6	H6	Thị trấn Sa Pa, Lào Cai	22°20'17.84"N - 103°49'52.89"E
7	H15	Bản Khoang, Sa Pa, Lào Cai	22°23'0.01"N - 103°47'9.97"E
8	H16	Phó Bảng, Đồng Văn, Hà Giang	23°14'46.36"N - 105°11'30.49"E
9	H21	Sùng Là, Đồng Văn, Hà Giang	23°14'39.08"N - 105°12'48.68"E
10	HH	Vườn Thực vật Hoa Nam, Trung Quốc	

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu: Mẫu nghiên cứu được cung cấp bởi Khoa Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu. Trong đó, 09 mẫu lá non đã được phân loại dựa vào đặc điểm hình thái thuộc *H. nepalensis* K. Koch. và 01 mẫu thuộc loài *H. helix* L. (kí hiệu HH) có thông tin chi tiết trong **Bảng 1**.

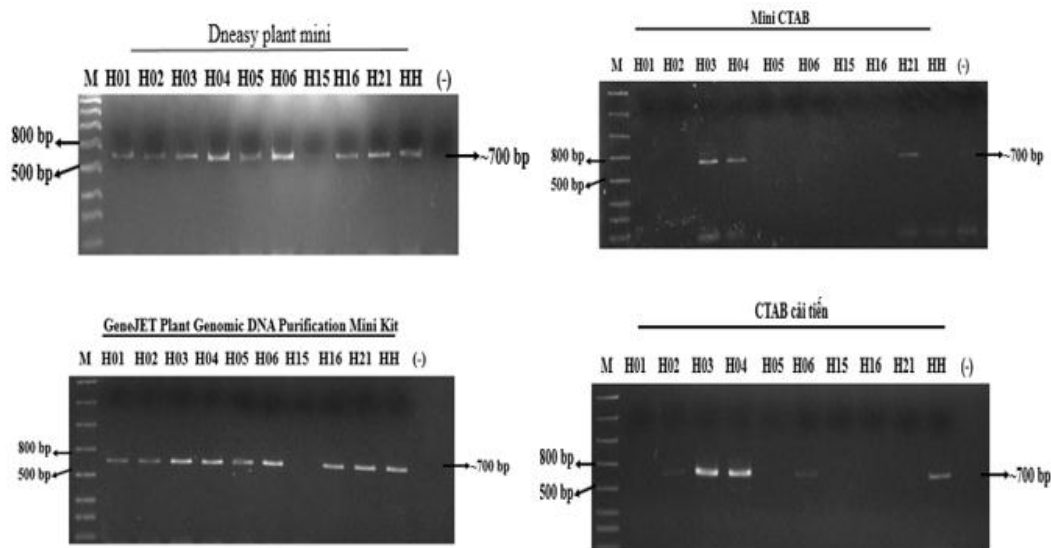
Tách chiết ADN tổng số: DNA được phân lập bằng phương pháp Mini-CTAB (Sanghai-Marouf và cộng sự, 1984) [8], phương pháp CTAB cải tiến (Elias và cộng sự, 2004) [9], DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Đức) và GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific, Mỹ). Chất lượng DNA tổng số được đánh giá dựa vào nồng độ DNA thu được, độ tinh sạch thể hiện qua chỉ số quang phổ hấp thụ đo ở bước sóng 260 nm và 280 nm và khả năng khuếch đại gen đích thành công thông qua PCR.

Nhân dòng gen đoạn gen GBSSI bằng PCR:

Cặp mồi GBSSI-10F (5' CAC AAC TGT AAG ATC CTT TCA AA 3'); GBSSI-11R (5' CAT ACG CAT AGC ATG TAA CTG 3') đặt tổng hợp ở công ty PHUSA Biochem (Việt Nam) được sử dụng để nhân bản đoạn trình tự gen *GBSSI* [7]. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR

như sau: biến tính 98 °C trong 30 giây; 35 chu kì phản ứng bao gồm 98 °C trong 10 giây, 55,1 °C trong 30 giây, 72 °C trong 30 giây; thời gian kéo dài cuối cùng 72 °C trong 10 phút. Sau đó, sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,5%. Các mẫu PCR nhân bản thành công gen *GBSSI* được tinh sạch và gửi đi giải trình tự ở Công ty First base (Malaysia).

Xử lý và phân tích số liệu: Các trình tự DNA được kiểm tra, tinh chỉnh và sắp xếp (alignment) bằng phần mềm BioEdit version 7.2.6.1. Các trình tự DNA trong nghiên cứu được so sánh phân tích với 13 trình tự thuộc chi *Hedera* đã được công bố trên NCBI bao gồm *H. algeriensis* (HQ234505.1), *H. caucasigena* (HQ234539.1), *H. azorica* (HQ234513.1), *H. canariensis* (HQ234518.1), *H. nepalensis* (AY204084.1), *H. colchica* (HQ234524.1), *H. pastuchovii* (HQ234576.1), *H. rhombea* (AY204072.1), *H. hibernica* (HQ234549.1), *H. cypria* (HQ234526.1), *H. helix* (HQ234541.1), *H. maroccana* (HQ234567.1), *H. sinensis* (HQ234572.1) và 2 loài thuộc chi *Merrillioanax* là *M. chinensis* (AY204086.1) và *M. listeri* (AY204085.1). Xây dựng cây phát sinh chủng loại phân tích sự đa dạng di truyền của nguồn gen bằng phần mềm Mega 7.0 theo phương pháp Maximum Likelihood.



Hình 1. Kết quả PCR nhân dòng gen *GBSSI* trên gel agarose 1,5%. Làn M: O Gene Ruler Ladder DNA marker, Làn (-): đối chứng âm, kí hiệu H01-H21 và HH là tên mẫu phân tích.

3. Kết quả nghiên cứu

Hiệu quả tách chiết DNA tổng số từ các quy trình khác nhau

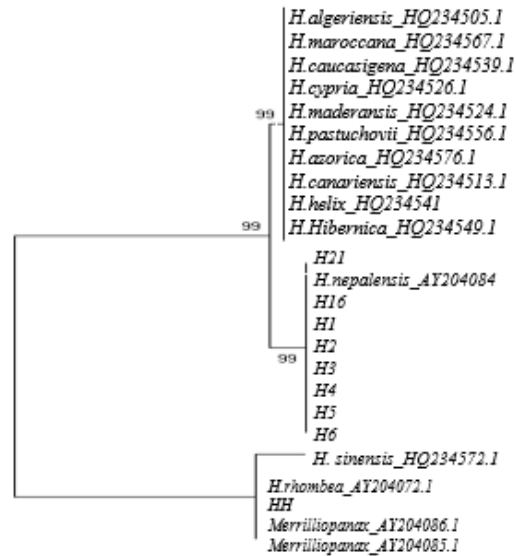
Đánh giá về độ tinh sạch và nồng độ DNA: Độ tinh sạch của DNA tổng số đánh giá thông qua chỉ số hấp thụ quang OD_{260/280} dao động từ 1,8 đến 2,2 (Bảng 2). Kết quả này cho thấy DNA thu được ở cả 4 phương pháp tách chiết ít nhiễm protein và RNA. Phương pháp Mini-CTAB thu hồi được lượng DNA nhiều nhất, trung bình là 437,4 ng/μL. Nồng độ DNA thu được từ các kit thấp hơn so với quy trình Mini-CTAB và CTAB cải tiến khoảng 10 lần.

Bảng 2. So sánh kết quả tách chiết DNA tổng số từ các quy trình khác nhau

Phương pháp	OD _{260/280}	Nồng độ DNA (ng/μl)
Mini-CTAB (Sanghai-Marooof và cộng sự, 1984)	1,86 ± 0,24	437,4 ± 165,8
CTAB cải tiến (Elias và cộng sự, 2004)	1,84 ± 0,09	273,6 ± 100,8
DNeasy Plant Mini Kit	1,97 ± 0,23	10,6 ± 7,1
GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit	2,23 ± 0,15	13,7 ± 3,9

Đánh giá về khả năng nhân dòng gen đích bằng PCR: Kết quả điện di sản phẩm PCR đoạn gen đích *GBSSI* với 10 mẫu sử dụng DNA khuôn thu được từ 4 phương pháp tách chiết DNA khác nhau thể hiện ở Hình 1. Có 9/10 mẫu DNA tách từ mỗi bộ kit nhân dòng gen đích thành công, sản phẩm nhân dòng khá đồng đều với một băng hiện hình sáng rõ có kích thước khoảng 700 bp. Đối với phương pháp CTAB cải tiến, có 5/10 mẫu nhân dòng thành công và Mini-CTAB là 3/10 mẫu. Như vậy, hiệu quả nhân dòng gen từ các mẫu DNA thu được từ kit cao hơn 2-3 lần so với mẫu DNA thu được từ quy trình CTAB cải tiến và mini-CTAB. Bên cạnh đó, GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit hiện có giá

thành rẻ hơn DNeasy Plant Mini Kit 3 lần. Chính vì vậy, trong nghiên cứu này GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit là kit tách chiết hiệu quả và kinh tế nhất với mẫu lá khô Dây thường xuân.



Hình 2. Cây phát sinh chủng loại theo phương pháp Maximum Likelihood của đoạn gen *GBSSI*. Đầu các nút là chỉ số bootstrap thể hiện độ tin cậy của nhánh.

Xây dựng cây phát sinh chủng loại dựa trên chỉ thị *GBSSI*: 09 mẫu bao gồm H1, H2, H3, H4, H5, H6, H16, H21, HH được nhân dòng và giải trình tự gen *GBSSI* thành công. Phân tích gen cho thấy có 26 nucleotit sai khác giữa các mẫu trong đoạn gen dài 618 bp. Cây phát sinh chủng loại xây dựng bằng phương pháp Maximum Likelihood được thể hiện trong Hình 2. Phương pháp này sử dụng mô hình 3 tham số Tamura (T92) với phân phối Gamma (BIC = 7042,115; AICc = 6657,293; -lnL = 3277,457; R = 1,45), phân tích bootstrap với 1000 lần lấy lại mẫu.

4. Bàn luận

Không có phương pháp tách chiết nào được cho là tối ưu với tất cả các loài thực vật. Các loài thực vật khác nhau cho kết quả thu hồi DNA khác nhau với cùng một phương pháp tách chiết. Tế bào thực vật khó thu hồi DNA hơn so với các

tế bào động vật bởi có lớp thành cellulose bao quanh. Các polysaccharit rất khó để tách khỏi DNA trong quá trình tách chiết, gây trở ngại cho hoạt động của các polymerase trong quá trình PCR tiếp theo [10]. Chính vì vậy, phân lập DNA từ các mô thực vật đòi hỏi sự tham gia của các carbohydrat và enzym giúp cho sự ly giải thành tế bào. Bên cạnh đó, sự hiện diện của các polysaccharit, polyphenol và khác các hợp chất thứ cấp khác nhau trong tế bào đặc biệt là các tế bào trưởng thành gây ra trở ngại lớn cho quá trình khuếch đại gen bằng PCR [11]. Chính vì vậy, mẫu lá non và còn tươi thường được khuyến cáo sử dụng để thu hồi DNA từ tế bào [12]. Nhiều nghiên cứu chỉ ra thành phần hóa học chủ yếu trong lá và thân của *H. nepalensis* là saponin. Trong đó, hai hợp chất chính có tác dụng chống ung thư hederagenin 3-O- α -L-arabinopyranoside và pulsatilla saponin A đã được phân lập bằng phương pháp sắc ký hóa học và phương pháp quang phổ vào năm 2015 [13]. Ngoài ra, các phân tích hóa sinh đã chứng minh trong Dây thường xuân còn có chứa các nhóm chất khác như: carbohydrat, protein, alkaloid, tanin, flavonoid, terpenoid, các hợp chất phenolic và phytosterol [14, 15]. Trong đó, nhiều hợp chất polysaccharit và polyphenol là những chất ức chế phản ứng PCR hoặc cắt bằng enzym giới hạn. Do đó, bước đầu tiên trong quy trình phân tích di truyền là chọn phương pháp tách chiết thích hợp nhất với từng loài nghiên cứu. Trong phân tích thực vật, nồng độ DNA cao không phải tiêu chí được ưu tiên hàng đầu mà là độ tinh sạch của DNA. Trong khi đó, chỉ số OD_{260/280} không phản ánh đầy đủ sự nhiễm các hợp chất thứ cấp trong các mẫu DNA thu được. Mẫu DNA phục vụ cho phản ứng PCR yêu cầu độ tinh sạch cao, ít tạp nhiễm protein, polyphenol ... Các kit thương mại có ưu điểm tuy nồng độ DNA thu hồi không cao nhưng có khả năng loại bỏ hiệu quả các tạp chất như các polysaccharit, protein... Điều này cũng giải thích tại sao hiệu quả nhân dòng gen bằng PCR của DNA thu từ kit cao hơn hẳn quy trình Mini-CTAB và CTAB cải tiến.

Với cây quan hệ phát sinh theo phương pháp Maximum Likelihood, mức độ tin cậy được đánh

giá theo giá trị bootstrap như sau: mức độ tin cậy cao: >85%; mức độ tin cậy trung bình: 65-85%; mức độ tin cậy thấp: <65%. Kết quả cho thấy, trong 09 mẫu phân tích, chỉ số bootstrap ở các nhánh ở cây thu được có mức độ tin cậy cao (99%). Ngoài HH, các mẫu còn lại đều cùng tách nhánh với mẫu *H. nepalensis*, phù hợp với phân loại bước đầu dựa vào hình thái do nhóm nghiên cứu của Viện dược liệu, Bộ Y tế thực hiện. Tuy nhiên, việc định danh Dây thường xuân dựa vào chỉ thị hình thái còn khá nhiều tranh cãi. Loài Dây thường xuân được mô tả và đặt tên theo hệ thống phân loại lưỡng phân lần đầu tiên bởi tác giả K. Koch với tên khoa học là *H. nepalensis* K. Koch vào năm 1853 [16]. Đến năm 1929, tác giả A. Rehder đã mô tả về *H. sinensis* (hay có tên khác là *H. chinensis*) và cho rằng loài *H. nepalensis* K. Koch là một tên đồng danh của *H. sinensis* [17]. Tuy nhiên, đến năm 2002 hai tác giả J. Ackerfried và J. Wen khi nghiên cứu phân loại dựa trên đặc điểm hình thái của chi *Hedera* trên thế giới đã cho rằng loài *H. nepalensis* có 2 thứ *H. nepalensis* var. *sinensis* và *H. nepalensis* var. *Nepalensis* [1]. Theo hình thái, *H. nepalensis* var. *nepalensis* và var. *sinensis* được phân biệt dựa trên hai đặc điểm, số lượng thùy (5 trong var. *nepalensis* và 3 trong var. *sinensis*) và số lượng thùy bên (nhiều thùy ở var. *nepalensis* và hầu như không có ở var. *sinensis*). Tuy nhiên, một số mẫu ở nghiên cứu này cho thấy có sự thay đổi về số lượng thùy lá trên cùng một cây. Có sự nhầm lẫn trong phân loại hai thứ loài *H. nepalensis* var. *nepalensis* và var. *sinensis* do các đặc điểm hình thái được sử dụng để phân biệt giữa chúng không nhất quán. Để giải quyết khó khăn trong phân loại hình thái, phân tích dựa trên các chỉ thị di truyền là công cụ hữu ích và có độ chính xác cao. Dựa vào cây phát sinh chủng loại theo chỉ thị *GBSSI*, *H. nepalensis* và *H. sinensis* được phân biệt thành 2 nhánh với độ tin cậy cao (99%). Qua đó, có thể kết luận sơ bộ rằng chỉ thị phân tử *GBSSI* có khả năng phân biệt 2 loài này thay cho chỉ thị hình thái. Tuy nhiên, để cung cấp thêm thông tin về đa dạng di truyền nguồn gen Dây thường xuân, chúng tôi khuyến cáo sử dụng thêm các chỉ thị phân tử khác ở gen nhân hoặc gen lục lạp và mở rộng địa điểm thu mẫu

Dây thường xuân tại các vùng địa lý khác nhau ở Việt Nam.

Ngoài ứng dụng trong phân loại sinh học, kết hợp phân tích các chỉ thị di truyền với phân tích thành phần hóa học giúp chúng ta có thể lựa chọn được nguồn gen dược liệu tạo ra hoạt chất theo định hướng tác dụng sinh học cao nhất. Những nghiên cứu như vậy có giá trị ứng dụng lớn trong chọn giống, bảo tồn, phát triển và chuẩn hoá nguồn nguyên liệu làm thuốc. Chính vì vậy, chúng tôi cũng đề xuất kết hợp phân tích di truyền với phân tích thành phần hóa học và hình thái học trong các nghiên cứu tiếp theo.

5. Kết luận

Với kết quả thu được, chúng tôi khuyến cáo sử dụng GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit cho tách chiết DNA tổng số thu từ lá khô Dây thường xuân.

Gen *GBSSI* đã được nhân dòng thành công và cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên chỉ thị này bước đầu cho thấy các mẫu Dây thường xuân thu thập tại một số tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam thuộc loài *Hedera nepalensis* K. Koch. Mặc dù vậy, phân tích với các chỉ thị phân tử khác (gen nhân và gen ty thể) vẫn rất cần thiết nhằm cung cấp thêm thông tin về quan hệ di truyền và tiến hóa của nguồn gen.

Lời cảm ơn

Chúng tôi trân trọng cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tài trợ của nghiên cứu này (đề tài KHCN cấp nhà nước mã số NVQG-2018/02).

Các tác giả chân thành cảm ơn ThS. Phan Văn Trường (Khoa Tài nguyên Dược liệu, Viện Dược liệu) đã giúp thu thập mẫu phục vụ cho nghiên cứu.

Tài liệu tham khảo

- [1] J. Ackerfield, J. Wen, A morphometric analysis of *Hedera* L. (the ivy genus, Araliaceae) and its taxonomic implications, *Adansonia Sér.* 24 (2002) 187-212.
- [2] U.S. National Plant Germplasm System, Taxon: *Hedera nepalensis* K. Koch, <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?id=18567>, 2019 (accessed 21 March 2019).
- [3] L. Jafri, S. Saleem, T.P. Kondrytuk, I.Q. Haq, N. Ullah, J.M. Pezzuto, B. Mirza, *Hedera nepalensis* K. Koch: A Novel Source of Natural Cancer Chemopreventive and Anticancerous Compounds, *Phytotherapy Reserch.* 30 (2016) 447-453.
- [4] S. Saleem, L. Jafri, I. Haq, L.C. Chang, D. Calderwood, B.D. Green, B. Mirza, Plants *Fagonia cretica* L. and *Hedera nepalensis* K. Koch contain natural compounds with potent dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitory activity, *Journal of Ethnopharmacology.* 156 (2014) 26-32.
- [5] W.J. Hashmi, H. Ismail, F. Mehmood, B. Mirza, Neuroprotective, antidiabetic and antioxidant effect of *Hedera nepalensis* and lupeol against STZ+ AlCl₃ induced rats model, DARU: Journal of faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences. 26 (2018) 179-190.
- [6] H. Ismail, A. Rasheed, I.U. Haq, L. Jafri, N. Ullah, E. Dilshad, M. Sajd, B. Mirza, Five indigenous plants of Pakistan with Antinociceptive, anti-inflammatory, antidepressant, and anticoagulant properties in Sprague Dawley rats, *Evidence-based Complementary and alternative medicine* 2017 (2017) 1-10.
- [7] A. Mitchell, J. Wen. Phylogenetic utility and evidence for multiple copies of granule-bound starch synthase I (GBSSI) in Araliaceae, *Taxon* 53 (2004) 29-44.
- [8] M.A. Saghai-Marooof, K.M. Soliman, R.A. Jorgensen, R.W.L. Allard, Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA.* 81 (1984) 8014-8018.
- [9] M. Elias, G.S. Mühlen, D. McKey, A.C. Roa, J. Tohme, Genetic diversity of traditional South American landraces of cassava (*Manihot esculenta* Crantz): an analysis using microsatellites, *Economic Botany.* 58 (2004) 242-256.
- [10] B.D. Lade, A.S. Patil, H.M. Paikrao, Efficient genomic DNA extraction protocol from medicinal rich *Passiflora foetida* containing high level of polysaccharide and polyphenol, *Springerplus.* 3 (2014) 1-7.
- [11] J.H. Cota-Sánchez, K. Remarchuk, K. Ubayasena, Ready-to-use DNA extracted with a CTAB method adapted for herbarium specimens and

- mucilaginous plant tissue, *Plant Molecular Biology Reporter*. 24 (2006) 161.
- [12] J. Zhang, J.M. Stewart, Economical and rapid method for extracting cotton genomic DNA, *Journal of Cotton Science*. 4 (2000) 193-201.
- [13] T. Li, H. Pan, Y. Feng, H. Li, Y. Zhao, Bioactivity-guided isolation of anticancer constituents from *Hedera nepalensis* K. Koch, *South African Journal of Botany*. 100 (2015) 87-93.
- [14] L. Jafri, S. Saleem, N. Ullah, B. Mirza, *In vitro* assessment of antioxidant potential and determination of polyphenolic compounds of *Hedera nepalensis* K. Koch, *Arabian Journal of Chemistry*. 10 (2017) S3699-S3706.
- [15] B. Ahmad, N. Munir, S. Bashir, S. Azam, I. Khan, M. Ayub, Biological screening of *Hedera nepalensis*, *Journal of Medicinal Plants Research*. 6 (2012) 5250-5257.
- [16] K.H.E. Koch, *Hortus Dendrologicus*, F. Schneider & Co., Berlin, 1985, pp 250.
- [17] A. Rehder, New species, varieties and combinations from the herbarium and the collections of the Arnold arboretum, *Journal of the Arnold Arboretum*. 4 (1923) 250.