

Định danh sả hương Tây Giang *Cymbopogon winterianus* Jowitt dựa trên phân tích phân tử và thành phần tinh dầu sả

Mã Thị Bích Thảo^{1*}, Nguyễn Phương¹, Trần Hà¹, Nguyễn Thị Thùy Trang¹, Nguyễn Thị Hồng¹, Hoàng Văn Tuấn²

¹Trung tâm Ươm tạo Công nghệ và Doanh nghiệp Khoa học Công nghệ, Viện Ứng dụng Công nghệ, C6, phường Thanh Xuân Bắc, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Phenikaa, phường Yên Nghĩa, quận Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 2/12/2022; ngày chuyển phản biện 5/12/2022; ngày nhận phản biện 23/12/2022; ngày chấp nhận đăng 2/1/2023

Tóm tắt:

Phân loại các loài chi sả chủ yếu được xác định bằng các dấu hiệu hình thái, mùi của tinh dầu và nồng độ các hợp chất hoạt tính sinh học có trong tinh dầu. Tuy nhiên, phương pháp trên chịu ảnh hưởng lớn của môi trường. Phân loại dựa trên chỉ thị phân tử sử dụng mã vạch DNA cho độ chính xác cao, định danh đến cấp độ loài. Trong nghiên cứu này, các tác giả đã tiến hành khuếch đại và so sánh các đoạn gen lục lạp (*rbcL* và *matK*) và vùng gen nhân *ITS* của 3 dòng sả hương Tây Giang. Kết quả cho thấy, trình tự các đoạn gen nghiên cứu giống nhau giữa 3 dòng sả hương Tây Giang, chứng tỏ 3 dòng sả này có chung nguồn gốc. Khi so sánh với các loài sả khác trên thế giới, gen *rbcL* thể hiện 1 vị trí sai khác, gen *matK* thể hiện 10 vị trí sai khác, trong khi đó có 40 vị trí đa hình được tìm thấy trên trình tự *ITS*. Tuy nhiên, kết quả phân tích các mã vạch DNA này chưa đủ để định danh chính xác sả hương Tây Giang. Kết hợp phân tích trình tự *ITS* và thành phần chính của tinh dầu bao gồm citronellal, citronellol và geraniol, sả hương Tây Giang được định danh chính xác thuộc loài *Cymbopogon winterianus* Jowitt.

Từ khóa: *Cymbopogon winterianus* Jowitt, định danh phân tử, *ITS*, *matK*, *rbcL*, sả hương Tây Giang, thành phần tinh dầu.

Chỉ số phân loại: 1.6

1. Đặt vấn đề

Chi sả *Cymbopogon* Spreng. (*Poaceae*) gồm khoảng 140 loài sống ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới ở châu Á, châu Phi và châu Mỹ [1]. Theo y học cổ truyền, sả được sử dụng để xua đuổi muỗi và sản xuất các chất đuổi muỗi tự nhiên được sử dụng nhiều nhất trên thế giới [2]. Một số loài sả *Cymbopogon* có mùi thơm mạnh và tinh dầu chiết xuất từ thân và lá của chúng được sử dụng trong công nghiệp. Các loài sả có tiềm năng thương mại để chiết xuất tinh dầu là *C. flexuosus*, *C. nardus*, *C. citratus*, *C. dictulus*, *C. khasianus*, *C. winterianus* và *C. martini* [3].

Ở Việt Nam hiện có một số loài trong chi sả mọc tự nhiên như sả trung bộ (*C. annamensis*), sả hôi, sả lam, cỏ thối (*C. caesius*), sả cambốt (*C. cambodgiensis*), hay nhập trồng như sả chanh (*C. citratus*), sả đỏ hay còn gọi sả xòe, sả Java (*C. winterianus*) dùng làm gia vị và cất lấy tinh dầu sử dụng trong công nghiệp, vì vậy các nghiên cứu chủ yếu tập trung vào 2 loài sả chanh và Java. Phân loại các loài chi sả chủ yếu được xác định bằng các dấu hiệu hình thái và hàm lượng các thành phần chính có trong tinh dầu sả là citronellal, citronellol và geraniol [3-5]. Hình thái bao gồm chiều cao cây, số nhánh trên một khóm, số lá trên một nhánh, hình dạng lá và gân lá, màu sắc của thân cây sả. Thành phần chính tinh dầu cũng là một chỉ thị phân biệt các nhóm sả [3-5]. Ví dụ, citral (bao gồm geraniol và neral, chiếm tỷ lệ 80-85%) là thành phần chính của sả chanh, sả dứa (*C. flexuosus*) và sả tía (*C. pendulus*); citronellal (11-36%), citronellol (10-30%) và geraniol (18-30%) là thành phần chính của sả Java và *C. georgii*; geraniol (80-85%)

là thành phần chính của sả hoa hồng (*C. martini*). Tuy nhiên, các yếu tố này chịu ảnh hưởng lớn của môi trường. Phân loại dựa trên chỉ thị phân tử sử dụng mã vạch DNA khắc phục được hạn chế của những phương pháp trên và cho độ chính xác cao, định danh đến cấp độ loài [4, 6].

A.K. Bishoyi và cs (2017) [6] đã sử dụng 4 vùng mã vạch DNA, bao gồm vùng nội phiên mã *ITS1* và *ITS2*, gen mã hóa cho *matK*, *psbA-trnH* và gen mã hóa cho *rbcL* để phân loại 6 loài sả có giá trị thương mại cao. Kết quả cho thấy, sự tương đồng 100% các vùng gen *psbA-trnH* và *rbcL* giữa 6 loài, bao gồm *C. martini*, *C. nardus*, *C. citratus*, *C. pendulus*, *C. flexuosus* và *C. winterianus*. Trong khi đó, vùng gen *matK* và *ITS* cho thấy sự sai khác giữa 6 loài sả lần lượt là 0,46 và 5,64%. Trong nghiên cứu của D.K. Muyembe và cs (2018) [7], *ITS2* đã được chọn để phân biệt loài sả *C. distans* với những mẫu sả thu từ 5 tỉnh ở Trung Quốc. Kết quả thu được đoạn trình tự *ITS2* với kích thước khoảng hơn 200 bp của mẫu sả thuộc loài *C. distans*, *C. flexuosus*, *C. citratus*, *C. georgii*, *C. martini* và *Imperata cylindrical*, trong đó có 20 vị trí chứa đa hình để phân biệt 5 loài sả.

Cây sả hương Tây Giang (tên gọi địa phương) mới được phát hiện trong những năm gần đây tại huyện Tây Giang, tỉnh Quảng Nam và là nguồn nguyên liệu tiềm năng cho sản xuất tinh dầu. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào phân loại các dòng sả hương Tây Giang bằng phương pháp phân tử. Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu định danh cây sả hương Tây Giang bằng chỉ thị phân tử và thành phần tinh dầu.

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

Identification of Tay Giang citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) based on molecular markers and essential oil compositions

Thi Bích Thao Ma^{1*}, Phuong Nguyen¹, Ha Tran¹,
Thi Thuy Trang Nguyen¹, Thi Hong Nguyen¹, Van Tuan Hoang²

¹Science and Technology Business and Technology Incubation Center,
National Center for Technological Progress,

C6, Thanh Xuan Bac Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

²Phenikaa University, Yen Nghia Ward, Ha Dong District, Hanoi, Vietnam

Received 2 December 2022; revised 23 December 2022; accepted 2 January 2023

Abstract:

Classification of the genus *Cymbopogon* is mainly determined by the morphological characteristics, the smell of the essential oil and the concentration of bioactive compounds present in the essential oil. However, this method is affected by the environment. Identification based on DNA barcoding results the high accuracy at the species level. In this study, the authors amplified and compared the two chloroplast DNA regions (*rbcL* and *matK*) and the nucleus region (*ITS*) of 3 lines of Tay Giang citronella. The obtained sequences of each gene were similar between the three lines of Tay Giang citronella, indicating the 3 lines of Tay Giang citronella had the same origin. Compared with other *Cymbopogon* species, *rbcL* showed 1 polymorphism, *matK* showed 10 polymorphisms, and 40 polymorphisms were found in the *ITS* sequence. However, these DNA barcodes were not enough to accurately identify Tay Giang citronella. In combination with *ITS* sequence analysis and essential oil components including citronellal, citronellol and geraniol, Tay Giang citronella was identified and authenticated into the species *Cymbopogon winterianus* Jowitt.

Keywords: *Cymbopogon winterianus* Jowitt, essential oil components, *ITS*, *matK*, molecular taxonomy, *rbcL*, Tay Giang citronella.

Classification number: 1.6

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Ba mẫu sả hương Tây Giang thu thập tại 3 vùng địa lý khác nhau ở huyện Tây Giang, tỉnh Quảng Nam, bao gồm 1 mẫu ở xã Axan (cao >1000 m so với mực nước biển), 1 mẫu ở xã Tr'hy (cao khoảng 800 m so với mực nước biển) và 1 mẫu ở xã Lăng (cao khoảng 600 m so với mực nước biển). Ngoài ra, các mẫu sả khác được lựa chọn làm đối chứng bao gồm 1 mẫu sả dụ Thái Nguyên và 2 mẫu sả chanh thu hoạch ở Hà Nội và Hưng Yên. Các cây được thu thập đều là những cây khỏe mạnh (quan sát bằng mắt thường)

không sâu bệnh, được trồng tại địa điểm lấy mẫu ít nhất 1 năm và chiều cao cây trên 1 m. Thời gian thu hoạch từ tháng 8 đến tháng 9 năm 2021.

2.2. Phương pháp phân tích hình thái

Các mẫu cây sả hương Tây Giang có hoa được chụp ảnh phân tích hình thái, xử lý và bảo quản theo phương pháp điều tra của N.T. Thín (2007) [8] và M.S. Taylor (1990) [9]. Điều tra theo tuyến, lựa chọn các tuyến vùng có phân bố của loài, đi theo các tuyến lối mòn có sẵn để thu thập các mẫu cây sả hương Tây giang. Xử lý mẫu tại thực địa: Mẫu vật được cắt bằng kéo chuyên dụng, thu thập mẫu tiêu bản bao gồm cơ quan sinh dưỡng, cơ quan sinh sản. Mẫu được ép trong tờ báo có số hiệu, bao gồm tên người thu, ngày thu thập, địa điểm thu thập, tọa độ và ảnh chụp dạng sống, nơi sống của mẫu vật. Mẫu sinh học phân tử: Lá của từng mẫu vật được thu thập, số hiệu trùng với mẫu vật, bảo quản trong Ciltagen làm khô.

2.3. Phương pháp tách chiết DNA từ cây sả

DNA tổng số từ mẫu sả hương Tây Giang được tách chiết theo phương pháp của M.G. Murray và cs (1980) [10] với một số cải tiến trong thành phần dung dịch đệm chiết (100 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM ethylene diamine tetra acetic acid, 1,4 M NaCl, 2,5% CTAB, 1,5% PVP và 0,11% β -mercaptoethanol).

DNA tổng số thu được điện di trên gel điện di agarose 1% chạy ở hiệu điện thế 60-80 V trong 45 phút bằng phương pháp nhuộm hiện hình với ethidium bromide.

2.4. Phương pháp khuếch đại PCR và giải trình tự

Để định danh các dòng sả hương Tây Giang, các đoạn gen *rbcL*, *matK* và vùng *ITS* được lựa chọn để nghiên cứu. Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu được trình bày ở bảng 1. Phản ứng PCR có tổng thể tích 20 μ l với thành phần như sau: 10 μ l DreamTaq PCR Master Mix 2X của Thermo Scientific (thành phần bao gồm DreamTaq DNA polymerase, 2X DreamTaq buffer, 0,4 mM dNTPs và 4 mM $MgCl_2$), 10 pmol mồi xuôi, 10 pmol mồi ngược, 100 ng DNA và nước khử ion vô trùng. Chu trình nhiệt phản ứng PCR của cặp mồi *rbcL*-F & *rbcL*-R và cặp mồi *matK*-F & *matK*-R như sau: 94°C trong 4 phút, 35 chu kỳ (94°C trong 30 giây, 54°C trong 30 giây, 72°C trong 60 giây), 72°C trong 4 phút. Chu trình nhiệt phản ứng PCR của cặp mồi CFITSF1 & CFITSR1 như sau: 94°C trong 5 phút; 35 chu kỳ (94°C trong 1 phút, 56°C trong 1 phút, 72°C trong 2 phút), 72°C trong 10 phút.

Bảng 1. Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu.

Tên mồi	Trình tự mồi	Gen	Sản phẩm PCR (bp)	Nhiệt độ bắt cặp (°C)	Nguồn tham khảo
<i>rbcL</i> -F	ATGTCACCAACAGAAAC	<i>rbcL</i>	750	54	[11]
<i>rbcL</i> -R	TCGCATGTACCTGCAGTAGC				
<i>matK</i> -F	CGATCTATTCAATATTTTC	<i>matK</i>	950	54	[12]
<i>matK</i> -R	TCTAGCACAGAAAGTCGAAGT				
CFITSF1	CAAAACAGACCGGAACG	<i>ITS</i>	555	54	[6]
CFITSR1	GGTGCTCGATGGGTCCTTAG				

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% để kiểm tra kích thước đoạn khuếch đại, sau đó được tinh sạch theo bộ kit QIAquick Gel Extraction (của Hãng QIAGEN). Sau khi tinh sạch, sản phẩm PCR được giải trình tự Sanger trên máy Sequencer ABI 3100 Bio System. Cặp mồi được sử dụng để giải trình tự các đoạn DNA chính là cặp mồi khuếch đại đoạn DNA trên.

2.5. Phương pháp so sánh trình tự

Các trình tự DNA từ mỗi xuôi và mỗi ngược được kiểm tra và lắp ráp lại với nhau sử dụng công cụ Seqman trong DNASTar để có một trình tự đồng nhất. Trình tự các đoạn gen thu được của các mẫu cần định danh được so sánh với các trình tự tương ứng của các loài trong chi sả trên GenBank sử dụng công cụ trực tuyến Nucleotide BLAST [13].

Xác định độ tương đồng và điểm sai khác giữa các trình tự. Dữ liệu các trình tự tham khảo được tải về và lưu dưới định dạng FASTA để phục vụ cho việc tính toán khoảng cách di truyền và xây dựng cây phát sinh chủng loại. Khoảng cách di truyền được tính toán sử dụng phần mềm MEGA X [14].

2.6. Phương pháp xây dựng cây phả hệ

Các đoạn trình tự của các mẫu và trình tự tham khảo được thu thập từ GenBank được so sánh với nhau qua phần mềm ClustalX version 2.0. Lựa chọn mô hình thay thế nucleotide phù hợp nhất được tính toán bằng chức năng Model trong phần mềm MEGA X. Mô hình có giá trị Bayesian information criterion nhỏ nhất được lựa chọn để xây dựng cây phát sinh loài. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng trên phương pháp Maximum likelihood trên MEGA X. Cây phả hệ Maximum likelihood cho *rbcl* được xây dựng theo mô hình tính toán Jukes-Cantor [15]. Cây phả hệ Maximum likelihood cho *matK* và *ITS* được xây dựng theo mô hình tính toán Tamura 3-parameter [16] Phân tích Bootstrap với 1.000 lần lặp lại.

2.7. Phương pháp xác định hàm lượng thành phần tinh dầu sả

Hàm lượng và thành phần tinh dầu sả được xác định bằng phương pháp sắc ký khí nối ghép khối phổ (GC/MS) [17]. Sử dụng cột mao quản HP5-MS (60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), khí mang: He. Inlet: 250°C, chương trình nhiệt độ (60-240°C, tăng 4°C/phút), năng lượng ion hóa 70 eV, quét mảnh 35-450 m/z. Điều kiện sắc ký khí nối ghép detector ion hóa ngọn lửa (GC-FID): Cột mao quản HP5-MS (60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), khí mang: He. Inlet: 250°C, chương trình nhiệt độ (60-240°C, tăng 40°C/phút), khí make up N_2 , khí đốt O_2 và H_2 . Thư viện phổ HPCH1607, W09N08, NIST chemistry WebBook. Thành phần và hàm lượng cấu tử (%) trong tinh dầu sả là phần trăm diện tích pic của các cấu tử so với tổng diện tích các chất bay hơi của tinh dầu sả.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả phân tích hình thái sả hương Tây Giang

Cây sả hương Tây Giang có hoa được tiến hành phân tích nghiên cứu hình thái (hình 1). Các mẫu được quan sát bằng kính lúp độ phóng gấp 50 lần, đồng thời so sánh với mẫu tiêu bản chuẩn (mẫu Type) hiện đang lưu giữ tại Bảo tàng Kew, Vương quốc Anh. Kết quả ở hình 1 cho thấy, hoa của mẫu sả hương Tây Giang có hình thái giống với loài *C. winterianus* Jowitt.

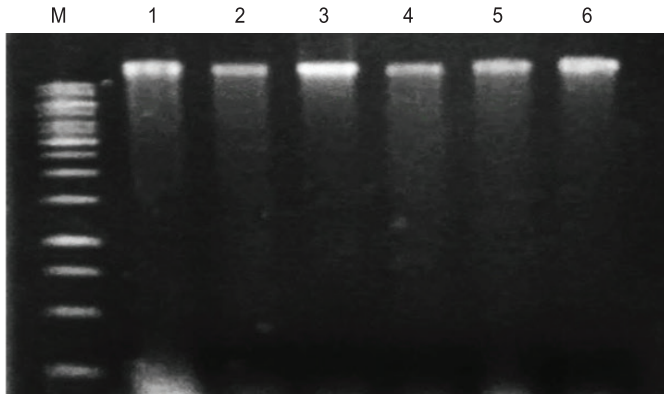


Hình 1. Cây sả hương Tây Giang có hoa. (A, B) Dạng chung; (C) Thân và rễ; (D, E, F, G, H) Một đoạn bẹ lá; (I, J) Mo và bông; (K) Bông; (L) Mây; (M, N) Mây nhỏ, nhị và nhụy; (O) Mây nhỏ.

Các bẹ lá, bẹ có vân, sáng bóng, nhẵn, màu hơi vàng hoặc chuyển sang màu đỏ tía, phần thân bó chặt và ngắn hơn các lông, phần gốc rất ngắn, lông lều, tuột khỏi thân, dài khoảng 1 mm, có lông tơ; phiến thẳng với đầu dạng sợi dài, lên đến 1 m x 1,5 (-5) cm, rủ xuống bằng 2/3 chiều dài của chúng, nhẵn và sáng, màu xanh lục nhạt ở mặt trên, phía dưới có nếp gấp, mép thường có hình răng cưa. Cụm hoa dạng chùy lớn, phân nhánh nhiều lần, dài 60-100 cm, trục ngoằn ngoèo, các nhánh có bậc cao nhất kết thúc bằng một nhánh phụ kéo dài một cặp nhánh, hình mũi mác thẳng, dài 1-2,5 cm, nhiều gân, màu đỏ nhạt; gai dài 1-2 cm, có lông nhung, một phụ không cuống, một còn lại có cuống, gồm 4-7 cặp gai, mỗi cặp không cuống, còn lại có cuống, kết thúc bằng 1 không cuống và 2 gai có cuống. Hình bầu dục thuôn dài có gai nhọn không cuống, dài 4-5 mm, có 2 bông hoa; hình mũi mác thuôn dài ở dưới, hình dạng và kích thước của gai, thường phẳng, có cánh hẹp, có 2 sừng, 0-3 gân; trên hình thuyền, nửa trên có 3 gân; hoa lưỡng tính phía trên, dài 3 mm, hình “quả trám”, 2 thùy, có bầu dài đến 5 mm nếu có, không có bầu, nhị 2-3, vòi nhụy 2 với các đầu nhụy hình lông tơ. Gai nhọn hình bầu dục thuôn dài tới 5 mm, đực hoặc cái bất thụ; hình dạng và kích thước lớp lông dưới của gai, 7-9 gân; mép trên có kích thước bằng nhau, có 3 gân; các bông hoa được biểu thị bằng một vảy đơn dài 3 mm, bao quanh 3 nhị hoa và 2 thùy. Quả hình trụ đến gần tròn.

3.2. Kết quả tách chiết DNA từ cây sả hương Tây Giang

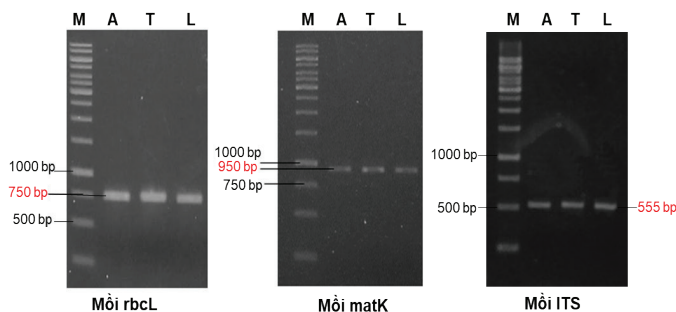
Kết quả điện di kiểm tra DNA tổng số trên gel agarose 1% cho thấy, các mẫu DNA thu được không bị đứt gãy và có độ đồng đều cao (hình 2). Các mẫu DNA thu được có chỉ số A260/A280 dao động trong khoảng 1,8-2,2, đảm bảo chất lượng cho thí nghiệm tiếp theo.



Hình 2. Hình ảnh điện di DNA tổng số của mẫu sả hương Tây Giang. Giếng M: DNA marker; giếng 1, 2: mẫu sả hương Tây Giang thu thập tại xã Axan, huyện Tây Giang, Quảng Nam; giếng 3, 4: mẫu sả hương Tây Giang thu thập tại xã Lăng, huyện Tây Giang, Quảng Nam; giếng 5, 6: mẫu sả hương Tây Giang thu thập tại xã Tr'hy, huyện Tây Giang, Quảng Nam.

3.3. Kết quả khuếch đại và giải trình tự các mã vạch DNA của các dòng sả hương Tây Giang

Chúng tôi đã khuếch đại thành công trình tự 2 gen lục lạp là *rbcL*, *matK* và trình tự vùng *ITS* ở gen nhân của 3 dòng sả hương Tây Giang, bao gồm dòng ở xã Axan, Tr'hy và Lăng. Kết quả cho thấy, sản phẩm khuếch đại vùng gen *rbcL* có kích thước 750 bp, *matK* có kích thước 950 bp và đoạn *ITS* có kích thước 555 bp (hình 3). Kích thước các sản phẩm PCR phù hợp với kích thước sản phẩm theo lý thuyết.



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR của 3 mã vạch DNA của 3 dòng sả hương Tây Giang. (A) Xã Axan; (T) Xã Tr'hy; (L) Xã Lăng. M: DNA marker.

Sau khi ghép nối trình tự xuôi ngược, loại bỏ trình tự mỗi và trình tự kém chất lượng, trình tự vùng gen *rbcL*, *matK* và *ITS* của các dòng sả hương Tây Giang giống hệt nhau và có kích thước tương ứng là 722, 888 và 499 bp. Các trình tự trên được gửi lên GenBank với các số hiệu được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả giải trình tự và so sánh các vùng gen *rbcL*, *matK* và *ITS* của các mẫu sả trong nghiên cứu với các loài trên GenBank thế giới.

TT	Gen	Mẫu	Số hiệu GenBank	Kích thước (bp)	Loài gần nhất	Độ tương đồng
1	<i>rbcL</i>	SHTG Axan	OQ116709	722		100%
2		SHTG Tr'hy	OQ116710	722		100%
3		SHTG Lăng	OQ116711	722	<i>C. goeringii</i> , <i>C. citratus</i> , <i>C. distans</i> , <i>C. giganteus</i> , <i>C. martini</i> , <i>C. jwarancusa</i> , <i>C. commutatus</i> và <i>C. flexuosus</i>	100%
4		Sả diu Thái Nguyên	OQ116712	722		100%
5		Sả chanh Hà Nội	OQ116713	722		100%
6		Sả chanh Hưng Yên	OQ116714	722		100%
7	<i>matK</i>	SHTG Axan	OQ116703	888		100%
8		SHTG Tr'hy	OQ116704	888	<i>C. citratus</i> , <i>C. winterianus</i> , <i>C. pendulus</i> , <i>C. nardus</i> , <i>C. flexuosus</i> và <i>C. commutatus</i>	100%
9		SHTG Lăng	OQ116705	888		100%
10		Sả diu Thái Nguyên	OQ116706	888		100%
11		Sả chanh Hà Nội	OQ116707	888	<i>C. citratus</i> , <i>C. flexuosus</i> , <i>C. distans</i> , <i>C. schoenanthus</i> và <i>C. oblectus</i>	100%
12		Sả chanh Hưng Yên	OQ116708	888		100%
13	<i>ITS</i>	SHTG Axan	OQ096490	499	<i>C. winterianus</i> và <i>C. flexuosus</i>	100%
14		SHTG Tr'hy	OQ096491	499	<i>C. winterianus</i> và <i>C. flexuosus</i>	100%
15		SHTG Lăng	OQ096492	499	<i>C. winterianus</i> và <i>C. flexuosus</i>	100%
16		Sả diu Thái Nguyên	OQ096493	498	<i>C. flexuosus</i>	100%
17		Sả chanh Hà Nội	OQ096494	494	<i>C. citratus</i>	100%
18		Sả chanh Hưng Yên	OQ096495	494	<i>C. citratus</i>	100%

SHTG: sả hương Tây Giang.

3.4. Kết quả phân tích trình tự gen *rbcL* và xây dựng cây phả hệ

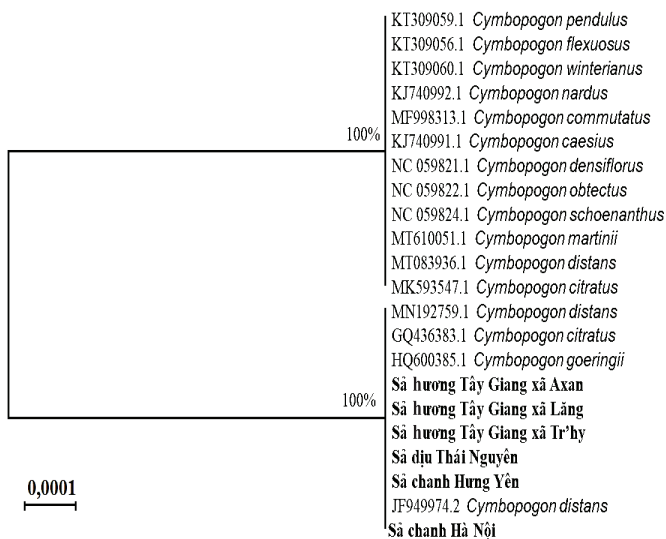
Kết quả so sánh trình tự vùng gen *rbcL* của 3 dòng sả hương Tây Giang với các loài sả trên GenBank cho thấy, các dòng sả hương Tây Giang giống 100% với các loài *C. goeringii*, *C. citratus*, *C. distans*, *C. giganteus*, *C. martini*, *C. jwarancusa*, *C. commutatus* và *C. flexuosus* (bảng 2). Kết quả đối chiếu trình tự

	716
1. Axan	A T G C T A C T G C A
2. Tr'hy	A T G C T A C T G C A
3. Lăng	A T G C T A C T G C A
4. Sả diu Thái Nguyên	A T G C T A C T G C A
5. Sả chanh Hưng Yên	A T G C T A C T G C A
6. Sả chanh Hà Nội	A T G C T A C T G C A
7. HQ600385.1_C.goeringii	A T G C T A C T G C A
8. JF949974.2_C.distans	A T G C T A C T G C A
9. MN192759.1_C.distans	A T G C T A C T G C A
10. MT083936.1_C.distans	A T G C T A C T G C A
11. MK593547.1_C.citratus	A T G C G A C T G C A
12. KT309059.1_C.pendulus	A T G C G A C T G C A
13. KT309056.1_C.flexuosus	A T G C G A C T G C A
14. KT309060.1_C.winterianus	A T G C G A C T G C A
15. NC_059822.1_C.nardus	A T G C G A C T G C A
16. MF998313.1_C.commutatus	A T G C G A C T G C A
17. KJ740991.1_C.caesius	A T G C G A C T G C A
18. NC_059822.1_C.oblectus	A T G C G A C T G C A
19. NC_059821.1_C.densiflorus	A T G C G A C T G C A
20. NC_059824.1_schoenanthus	A T G C G A C T G C A
21. MT610051.1_C.martini	A T G C G A C T G C A

Hình 4. Minh họa sự đa hình ở vị trí 716 trên gen *rbcL* của các dòng sả hương Tây Giang và các loài sả khác trên thế giới.

gen *rbcl* của các dòng sả hương Tây Giang với các loài có trình tự gen *rbcl* lớn hơn 700 nucleotide trên GenBank cho thấy sự đa hình ở vị trí nucleotide thứ 716 của 3 dòng sả hương Tây Giang so với các loài trên GenBank. Ở vị trí này của 3 dòng sả hương Tây Giang cũng như 3 mẫu đối chứng (1 mẫu sả dụ Thái Nguyên và 2 mẫu sả chanh ở Hà Nội và Hưng Yên) là nucleotide T (hình 4). Nucleotide T cũng xuất hiện ở các loài *C. goeringii* YDK2008538 (HQ600385), *C. distans* OuXK11163 (MN192759), *C. distans* P6875 (JK949974.2) và *C. citratus* PS0422MT01 (GQ436383).

Mô hình tối ưu cho *rbcl* là Jukes-Cantor, vì vậy cây phát sinh chủng loại được xây dựng trên phương pháp Maximum likelihood trên MEGA X theo mô hình này. Cây phân loại cho thấy, các dòng sả trong phân tích của chúng tôi nằm cùng nhánh với các loài *C. citratus*, *C. goeringii* và *C. distans* (hình 5).



Hình 5. Hình ảnh cây phả hệ dựa trên phân tích vùng gen *rbcl*.

Như vậy, với kết quả giải trình tự vùng gen *rbcl* thì chỉ mới phân loại các dòng sả hương Tây Giang vào chi sả *Cymbopogon*, chứ chưa phân định rõ thuộc loài nào.

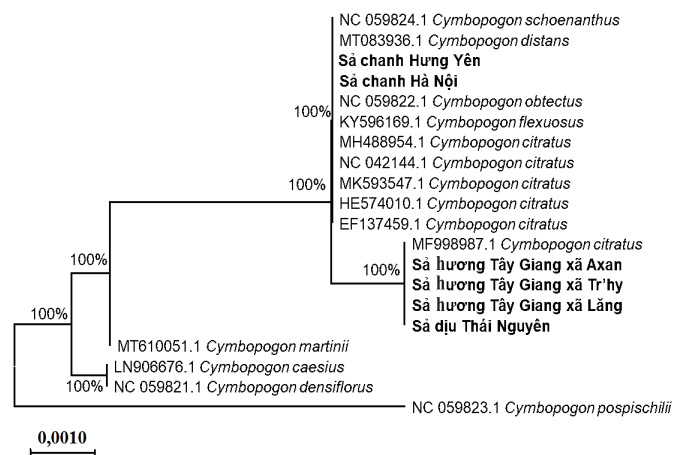
3.5. Kết quả phân tích trình tự gen *matK* và xây dựng cây phả hệ

Kết quả so sánh trình tự vùng gen *matK* của 3 dòng sả hương Tây Giang với các loài sả trên GenBank cho thấy, các dòng sả hương Tây Giang giống 100% với các loài *C. citratus*, *C. winterianus*, *C. pendulus*, *C. nardus*, *C. flexuosus* và *C. commutatus* (bảng 2). Đối chiếu trình tự gen *matK* của các dòng sả hương Tây Giang với các loài có trình tự gen *matK* có độ dài tương tự trên GenBank thì thấy sự đa hình ở vị trí nucleotide thứ 134, 181, 389, 520, 620, 678, 691, 849, 853 và 861. Tuy nhiên, đoạn trình tự *matK* của các mẫu sả hương Tây Giang và sả dụ Thái Nguyên giống hệt với loài sả chanh *C. citratus* MF998987. Nhóm sả trên chỉ thể hiện một sự sai khác ở vị trí nucleotide thứ 861 khi so sánh với 2 mẫu sả chanh Hà Nội, Hưng Yên và các loài sả khác (hình 6).

	134	181	389	520	620	678	691	849	853	861
1. Axan	C	T	G	A	T	T	T	G	T	G
2. Tr'hy	C	T	G	A	T	T	T	G	T	G
3. Lãng	C	T	G	A	T	T	T	G	T	G
4. MF998987.1_C. citratus	C	T	G	A	T	T	T	G	T	G
5. Sả dụ Thái Nguyên	C	T	G	A	T	T	T	G	T	G
6. Sả chanh Hưng Yên	C	T	G	A	T	T	T	G	T	A
7. Sả chanh Hà Nội	C	T	G	A	T	T	T	G	T	A
8. HE574010.1_C. citratus	C	T	G	A	T	T	T	G	T	A
9. MK593547.1_C. citratus	C	T	G	A	T	T	T	G	T	A
10. NC_042144.1_C. citratus	C	T	G	A	T	T	T	G	T	A
11. MH488954.1_C. citratus	C	T	G	A	T	T	T	G	T	A
12. EF137459.1_C. citratus	C	T	G	A	T	T	T	G	T	A
13. KY596169.1_C. flexuosus	C	T	G	A	T	T	T	G	T	A
14. NC_059822.1_C. oblectus	C	T	G	A	T	T	T	G	T	A
15. NC_059824.1_C. schoenanthus	C	T	G	A	T	T	T	G	T	A
16. MT083936.1_C. distans	C	T	G	A	T	T	T	G	T	A
17. NC_059821.1_C. densiflorus	C	C	A	A	T	T	T	C	C	A
18. LN906676.1_C. caesius	C	C	A	A	T	T	T	C	C	A
19. MT610051.1_C. martinii	C	C	A	A	T	T	T	C	C	A
20. NC_059823.1_C. pospischilii	A	C	A	C	G	C	C	G	A	

Hình 6. Minh họa sự đa hình trên vùng gen *matK* của các dòng sả hương Tây Giang và các loài sả khác trên thế giới.

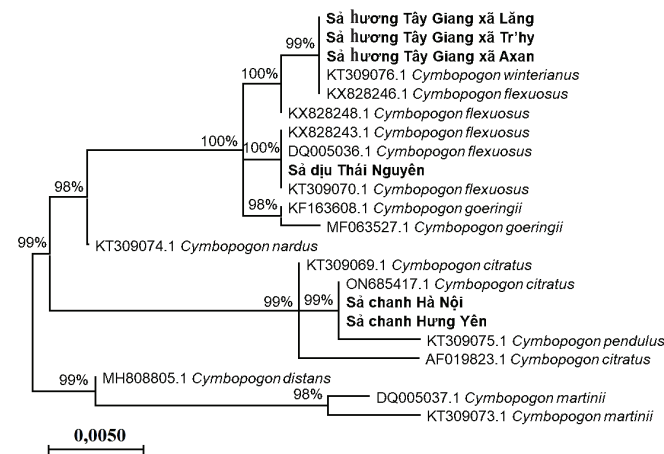
Mô hình tối ưu cho *matK* là T92 (Tamura 3-parameter model). Cây phát sinh chủng loại được xây dựng trên phương pháp Maximum likelihood trên MEGA X theo mô hình T92 với Bootstrap 1.000 lần lặp lại. Cây phân loại dựa trên trình tự *matK* cho thấy, 3 mẫu sả hương Tây Giang và sả dụ Thái Nguyên nằm trên cùng một nhánh với các loài *C. citratus* MF998987 (hình 7). Hai mẫu sả chanh Hà Nội và Hưng Yên nằm trên nhánh khác. Tuy nhiên, dựa vào cây phát sinh chủng loại ở hình 6 và kết quả giống hệt ở hình 5, chúng tôi nhận thấy trình tự gen của chủng *C. citratus* MF998987 khác với các chủng cùng thuộc loài *C. citratus* khác ở vị trí nucleotide thứ 861. Do đó, việc phân loại 3 mẫu sả hương Tây Giang vào loài *C. citratus* chưa đủ cơ sở.



Hình 7. Hình ảnh cây phả hệ dựa trên phân tích vùng gen *matK* giữa các mẫu.

3.6. Kết quả so sánh trình tự ITS và xây dựng cây phả hệ

Trình tự vùng gen ITS của 3 dòng sả hương Tây Giang giống 100% với các loài *C. flexuosus* KX828246 và *C. winterianus* KT309076 (bảng 2). Kết quả này cũng thể hiện ở cây phả hệ, trong đó 3 dòng sả hương Tây Giang cùng nhánh với *C. flexuosus* KX828246 và *C. winterianus* KT309076 (hình 8).



Hình 8. Hình ảnh cây phả hệ dựa trên phân tích vùng ITS giữa các mẫu.

Chúng tôi đã tiến hành so sánh trình tự vùng ITS của các dòng sả hương Tây Giang với một số loài sả trên GenBank thì thấy sự đa hình ở 33 vị trí (hình 9). Mẫu sả hương Tây Giang không có sự sai khác với *C. flexuosus* KX828246 và *C. winterianus* KT309076. Mẫu sả hương Tây Giang có lần lượt 4, 4, 21, 17, 6, 13 và 19 vị trí sai khác khi so sánh với các mẫu thuộc loài *C. flexuosus*, *C. goeringii*, *C. citratus*, *C. pendulus*, *C. nardus*, *C. distans* và *C. martinii* (hình 9). Mẫu sả diu Thái Nguyên trong nghiên cứu có 4 vị trí khác với mẫu sả hương Tây Giang. Dựa trên trình tự ITS, thì mẫu sả diu Thái Nguyên này cùng nhóm với loài sả diu *C. flexuosus* (hình 7 và 8). Tuy nhiên, trình tự ITS của loài sả diu *C. flexuosus* có tính đa hình cao. Trình tự ITS của 2 mẫu sả chanh Hà Nội và Hưng Yên có 18 vị trí sai khác so với mẫu sả hương Tây Giang (hình 9). Cây phân loại dựa trên trình tự ITS cũng cho thấy, mẫu sả chanh Hà Nội và Hưng Yên nằm trên nhánh cách xa với nhánh của các mẫu sả hương Tây Giang (hình 8). Như vậy, dựa trên kết quả phân tích trình tự ITS, chúng tôi mới phân loại các dòng sả hương Tây Giang vào 2 loài *C. winterianus* và *C. flexuosus*.

1. Axan-ITS	A T T - A A C C T T C A T T T C A G T A G T C T C G G C A C G C A
2. Trhy-ITS	A T T - A A C C T T C A T T T C A G T A G T C T C G G C A C G C A
3. Lang-ITS	A T T - A A C C T T C A T T T C A G T A G T C T C G G C A C G C A
4. KT309076.1 C. winterianus	A T T - A A C C T T C A T T T C A G T A G T C T C G G C A C G C A
5. KX828246.1 C. flexuosus	A T T - A A C C T T C A T T T C A G T A G T C T C G G C A C G C A
6. KX828248.1 C. flexuosus	A T T - T A C C T T C A T T T C A G T A G T C T C G G C A C G C A
7. KT309070.1 C. flexuosus	A T T - T A C C T T C A T T T A G C A G T C T C G G C A C G C A
8. Sả diu Thái Nguyên	A T T - T A C C T T C A T T T A G C A G T C T C G G C A C G C A
9. DQ005036.1 C. flexuosus	A T T - T A C C T T C A T T T A G C A G T C T C G G C A C G C A
10. KX828243.1 C. flexuosus	A T T - T A C C T T C A T T T A G C A G T C T C G G C A C G C A
11. KF163608.1 C. goeringii	A T T - T A C C T T T C A T T T A G T A G T C T C G G C A C G C A
12. MF063527.1 C. goeringii	A T T - T A C C T T T C A T T T A G T A G T C T C G G C A T C C A
13. ON685417.1 C. citratus	A T C - T A G C C T T G G C T A - - - - G T C C G G C G C G C A
14. Sả chanh Hà Nội	A T C - T A G C C T T G G C T A - - - - G T C C G G C G C G C A
15. Sả chanh Hưng Yên	A T C - T A G C C T T G G C T A - - - - G T C C G G C G C G C A
16. KT309069.1 C. citratus	A T C - T A C C C T T G G C T A A - - - - G T C C G G C G C G C A
17. AF019823.1 C. citratus	A T C - T A C C T T T G G C T A - - - - G T C C G G C G C A T A
18. KT309075.1 C. pendulus	A T C - T A G C C T T G G C T A A - - - - G T C C T T C G C G C A
19. KT309074.1 C. nardus	A T C - T A C C C T C A T T T A G A A G T T C G G C A C G C A
20. MH808805.1 C. distans	A C C - T A C C C T T A T T C A - - - - T T T C G G C A C G C A
21. DQ005037.1 C. martinii	G C C A T A C C T C T A T T T C A A - - - - G T C C G G Y A C G C T
22. KT309073.1 C. martinii	G C C - T C C C T C T A T T C A A - - - - G T C T G G T A C G C A

Hình 9. Minh họa sự đa hình trên vùng ITS của các dòng sả hương Tây Giang và các loài sả khác trên thế giới.

Các gen *rbcL* và *matK* được khuyến nghị làm mã vạch định danh thực vật bởi Liên minh Nghiên cứu Mã vạch sự sống. Trên GenBank có khoảng hơn 300.000 trình tự *rbcL* và hơn 200.000 trình tự *matK* của thực vật để so sánh. Ngoài ra, tỷ lệ khuếch đại và giải trình tự thành công *rbcL* và *matK* là rất cao. Tuy nhiên, gen *rbcL* có tính bảo thủ cao và tính đa hình thấp nên phù hợp để phân loại cấp chi và họ [18]. Gen *matK* đã được sử dụng làm mã vạch DNA cho nhiều loài thực vật khác nhau và đạt tỷ lệ phân loài thành công là 80% ở cây họ đậu [19], 98,1% với chi trọng đũa [20] đã cho biết không có sự khác nhau về trình tự gen *rbcL* giữa 6 loài sả *C. martini*, *C. nardus*, *C. citratus*, *C. pendulus*, *C. flexuosus* và *C. winterianus* được trồng thương mại ở Ấn Độ. Trong nghiên cứu của chúng tôi, trình tự đoạn gen *rbcL* của sả hương Tây Giang giống 100% với 2 loài *C. goeringii* và *C. distans*. Do đó, gen *rbcL* có thể không hiệu quả trong phân loại cấp loài ở chi sả. Điều này cũng được quan sát ở chi địa hoàng [21] Tuy nhiên, trong nghiên cứu của chúng tôi đã tìm ra được một sự sai khác nucleotide với các loài trong nghiên cứu của A.K. Bishoyi và cs (2017) [6] cũng như một số loài sả trồng ở khu vực khác như *C. comutatus*, *C. caesius*, *C. obteclus*, *C. densiflorus* và *C. schoenanthus* có nguồn gốc từ châu Phi, châu Mỹ, châu Âu và châu Đại Dương. Do vậy, chúng tôi giả thiết rằng, sự sai khác này là do đột biến gen để thích nghi với khí hậu trồng ở Việt Nam cũng như một số nước ở Đông Á. A.K. Bishoyi và cs (2017) [6] cũng tìm ra 4 sự sai khác trong trình tự *matK* khi so sánh 6 loài sả *C. martini*, *C. nardus*, *C. citratus*, *C. pendulus*, *C. flexuosus* và *C. winterianus*. Tuy nhiên, trong đó có 1 sự sai khác là của *C. winterianus* và 3 sự sai khác là của *C. martinii*, 4 loài sả còn lại giống nhau. Trong nghiên cứu của chúng tôi, sau khi so sánh trình tự *matK* của các mẫu sả hương Tây Giang với các loài sả trên GenBank, chúng tôi cũng nhận thấy rằng, sự đa hình chủ yếu là do sự sai khác của các loài sả *C. pospischilii*, *C. densiflorus*, *C. caesius* và *C. martinii* (hình 6). Trình tự *matK* của các mẫu sả hương Tây Giang chỉ có 1 vị trí sai khác nucleotide với nhiều loài sả khác như *C. citratus*, *C. flexuosus*, *C. obteclus*, *C. schoenanthus* và *C. distans*.

Như vậy, việc phân loại các loài thuộc chi sả dựa trên trình tự *rbcL* và *matK* là rất hạn chế bởi tính bảo thủ cao và đa hình thấp của các gen này trong chi sả. Trình tự ITS được đánh giá là có nhiều sự thay đổi hơn so với các vùng gen lục lạp như *rbcL* và *matK* [16, 22], ITS có trình tự ngắn hơn, nhưng lại có nhiều vị trí đa hình hơn nên là một mã vạch DNA tiềm năng cho phân loại loài trong chi sả. Kết quả phân tích trình tự ITS cho thấy, sả hương Tây Giang giống 100% với *C. flexuosus* CF-4 (KX828246) và *C. winterianus* BIO 13 (KT309076). Trong đó *C. winterianus* BIO 13 (KT309076) đã được phân loại chính xác [6] còn *C. flexuosus* CF-4 (KX828246) mới chỉ là trình tự được đưa lên GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KX828246.1>). Trình tự ITS của *C. flexuosus* CF-4 (KX828246) không có sự sai khác với *C. winterianus* BIO 13 (KT309076), nhưng sai khác 1-6 vị trí so với các mẫu *C. flexuosus* khác (hình 9). Tuy nhiên, để phân loại chính xác các dòng sả hương Tây Giang thuộc loài cụ thể nào, chúng tôi cần tiến hành phân tích thêm hàm lượng thành phần tinh dầu.

3.7. Định danh chính xác tên khoa học dòng sả hương Tây Giang

Để phân loại chính xác tên khoa học của sả hương Tây Giang, ngoài căn cứ kết quả phân tích chỉ thị phân tử chúng tôi tiến hành phân tích hàm lượng thành phần tinh dầu của các mẫu tinh dầu sả hương Tây Giang bằng phương pháp GC/MS. Kết quả cho thấy, thành phần của tinh dầu sả hương Tây Giang gồm 3 thành phần chính: citronellal (40-42%), citronellol (10-13%) và geraniol (17-21%). Tập hợp kết quả phân tích phân tử, hình thái và thành phần chính tinh dầu, chúng tôi lựa chọn 3 loài sả gần nhất bao gồm: *C. winterianus*, *C. goeringii* và *C. flexuosus* để so sánh định danh khoa học chính xác cho sả hương Tây Giang được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả so sánh hình thái, phân tử và thành phần tinh dầu của sả hương Tây Giang với một số loài sả gần nhất.

	<i>C. winterianus</i>	<i>C. goeringii</i>	<i>C. flexuosus</i>
Hình thái	Tương đồng	-	-
Thành phần tinh dầu chính	Citronellal, citronellol, geraniol [23]	citronellal, citronellol, geraniol [5]	Geraniol & Neral [24]
Chỉ thị phân tử	<i>rbcl</i> Sai khác 1 nucleotide <i>matK</i> Không sai khác <i>ITS</i> Không sai khác	Không sai khác Không sai khác Sai khác 3-4 nucleotide	Sai khác 1 nucleotide Không sai khác Không sai khác đến sai khác 1-4 nucleotide

Kết quả bảng 3 cho thấy, thành phần tinh dầu chính của sả hương Tây Giang (bao gồm citronellal, citronellol và geraniol) khác so với loài *C. flexuosus* (bao gồm geraniol và neral), vì vậy sả hương Tây Giang không thuộc loài *C. flexuosus*. Khi so sánh sả hương Tây Giang với loài *C. goeringii* cho thấy, khác về hình thái, tương đồng về thành phần tinh dầu chính, không sai khác về trình tự đoạn gen *matK* và *rbcl*, nhưng sai khác 3-4 nucleotide trong trình tự ITS (bảng 3). So sánh với loài *C. winterianus* thì sả hương Tây Giang tương đồng về hình thái và thành phần tinh dầu chính, không sai khác về trình tự gen *matK* và *ITS*, chỉ sai khác một nucleotide trong trình tự gen *rbcl* (bảng 3). Do đó, sả hương Tây Giang được phân loại vào loài *C. winterianus* Jowitt.

4. Kết luận

Sự kết hợp giữa phân tích hình thái, chỉ thị phân tử và thành phần tinh dầu, chúng tôi đã phân loại các mẫu sả hương Tây Giang thuộc loài *C. winterianus* Jowitt. Trong đó, trình tự ITS và thành phần tinh dầu là hai chỉ thị chính trong phân biệt các loài thuộc chi sả. Kết quả nghiên cứu này cung cấp cơ sở khoa học về các thông tin phân loại cây sả hương Tây Giang. Việc phân loại sả hương Tây Giang vào loài sả Java tạo tiền đề cho việc thương mại hóa sản phẩm tinh dầu sả, giúp doanh nghiệp có thêm dữ liệu trong việc truy xuất nguồn gốc, khai thác và sản xuất tinh dầu từ sả hương Tây Giang phục vụ cho xuất khẩu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] O. Avoseh, O. Oyediji, P. Rungqu, et al. (2015), "Cymbopogon species; ethnopharmacology, phytochemistry and the pharmacological importance", *Molecules*, **20**(5), pp.7438-7453, DOI: 10.3390/molecules20057438.

[2] A. Akhila (2009), *Essential Oil-Bearing Grasses: The Genus Cymbopogon*, CRC Press, 269pp.

[3] R.S. Verma, S. Singh, R.C. Padalia, et al. (2019), "Essential oil composition of the sub-aerial parts of eight species of Cymbopogon (Poaceae)", *Industrial Crops and Products*, **142**, DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.111839.

[4] J. Kumar, V. Verma, A. Goyal, et al. (2009), "Genetic diversity analysis in Cymbopogon species using DNA markers", *Plant Omics Journal*, **2**(1), pp.20-29.

[5] Q. Huang, Z. Duan, J. Yang, et al. (2014), "SNP typing for germplasm identification of Amomum villosum Lour. based on DNA barcoding markers", *PLOS ONE*, **9**(12), DOI: 10.1371/journal.pone.0114940.

[6] A.K. Bishoyi, A. Kavane, A. Sharma, et al. (2017), "A report on identification of sequence polymorphism in barcode region of six commercially important Cymbopogon species", *Molecular Biology Reports*, **44**(1), pp.19-24, DOI: 10.1007/s11033-017-4097-0.

[7] D.K. Muyembe, D.R. Kunet, S. Zhilei (2018), "Molecular, chemical and microscopic analysis of medicinal plant (Cymbopogon distans) from its adulterants", *Journal of Diseases and Medicinal Plants*, **4**(2), pp.35-47, DOI: 10.11648/j.jdmp.20180402.11.

[8] N.V. Thin (2007), *Plant Research Methods*, Hanoi National University Press, 166pp (in Vietnamese).

[9] M.S. Taylor (1990), "Techniques for collecting aquatic and marsh plants", *Annals of The Missouri Botanical Garden*, **71**(1), pp.1-27, DOI: 10.2307/2399065.

[10] M.G. Murray, W.F. Thompson (1980), "Rapid isolation of high molecular weight plant DNA", *Nucleic Acids Research*, **8**(19), pp.4321-4326, DOI: 10.1093/nar/8.19.4321.

[11] M.F. Fay, C. Bayer, W.S. Alversonet, et al. (1998), "Plastid *rbcl* sequence data indicate a close affinity between Diegodendron and Bixa", *Taxon*, **47**(1), pp.43-50, DOI: 10.2307/1224017.

[12] C.S. Ford, K.L. Ayres, N. Tomey, et al. (2009), "Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on land plants", *Botanical Journal of The Linnean Society*, **159**(1), pp.1-11, DOI: 10.1111/j.1095-8339.2008.00938.x.

[13] https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome, accessed 5 October 2022.

[14] S. Kumar, G. Stecher, M. Li, et al. (2018), "MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms", *Molecular Biology and Evolution*, **35**(6), pp.1547-1549, DOI: 10.1093/molbev/msy096.

[15] T.H. Jukes, C.R. Cantor (1969), "Evolution of protein molecules", *Mammalian Protein Metabolism*, Academic Press, pp.21-132.

[16] K. Tamura (1992), "Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases", *Molecular Biology and Evolution*, **9**(4), pp.678-687, DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040752.

[17] R.P. Adams (2007), *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, Baylor University, 804pp.

[18] CBOL Plant Working Group (2009), "A DNA barcode for land plants", *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, **106**(31), pp.12794-12797, DOI: 10.1073/pnas.0905845106.

[19] R. Lahaye, M.V.D. Bank, D. Bogarin, et al. (2008), "DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots", *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, **105**(8), pp.2923-2928, DOI: 10.1073/pnas.0709936105.

[20] T. Gao, H. Sun, J. Yao, et al. (2011), "Identification of Fabaceae plants using the DNA barcode *matK*", *Planta Medica*, **77**(1), pp.92-94, DOI: 10.1055/s-0030-1250050.

[21] Y. Liu, K. Wang, Z. Liu, et al. (2013), "Identification of medical plants of 24 Ardisia species from China using the *matK* genetic marker", *Pharmacognosy Magazine*, **9**(36), pp.331-337, DOI: 10.4103/0973-1296.117829.

[22] A.F. Blank, A.G. Costa, M.F.A. Blank (2007), "Influence of season, harvest time and drying on Java citronella (Cymbopogon winterianus Jowitt) volatile oil", *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **17**(4), pp.557-564, DOI: 10.1590/S0102-695X2007000400014.

[23] X. Huang, Yun-chao Feng, Y.C. Feng, et al. (2013), "Chemical composition, antioxidant and the possible use as skin-care ingredient of clove oil (Syzygium aromaticum (L.) Merr. & Perry) and citronella oil (Cymbopogon goeringii) from China", *Journal of Essential Oil Research*, **25**(4), pp.315-323, DOI: 10.1080/10412905.2013.775082.

[24] A.K. Gupta, D. Ganjewala (2015), "A study on development changes in essential oil content and composition in Cymbopogon flexuosus cultivar Suvarna", *Acta Biologica Szegediensis*, **59**(2), pp.119-125.