

NGHIÊN CỨU MỐI QUAN HỆ DI TRUYỀN CỦA MỘT SỐ GIỐNG HOA HỒNG (*Rosa* spp.) CỔ Ở MIỀN BẮC VIỆT NAM DỰA TRÊN TRÌNH TỰ VÙNG *trnH-psbA*

Ngô Văn Đức, Hoàng Hải Đăng, Triệu Phương Mai, Phạm Quốc Toàn,
Nguyễn Thị Bích Hương, Lê Thị Kiều Trinh, Nguyễn Minh Phương

Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm giải và phân tích trình tự vùng *trnH-psbA*, từ đó đánh giá mối quan hệ di truyền của các giống/loài hoa hồng được trồng lâu đời ở miền Bắc Việt Nam. Mỗi khuếch đại DNA được thiết kế dựa trên trình tự DNA chi *Rosa* tham khảo từ NCBI Genbank. DNA tổng số được ly trích từ mẫu lá bằng phương pháp CTAB, từ đó vùng *trnH-psbA* được khuếch đại bằng phương pháp PCR và giải trình tự bằng phương pháp giải trình tự Sanger. Mười sáu mẫu hoa hồng đại diện cho các giống hoa hồng cổ đã được thu thập, ly trích DNA tổng số, khuếch đại gen và giải trình tự thành công. Các trình tự vùng *trnH-psbA* của các mẫu hoa hồng thu được trong nghiên cứu cùng với 10 trình tự tham khảo từ Genbank được phân tích mức độ tương đồng và xây dựng cây phát sinh loài. Kết quả cho thấy các trình tự vùng gene *trnH-psbA* của các mẫu hoa hồng được phân tích có mức độ tương đồng cao nhất (từ 99,6% đến 100%) với các loài *Rosa chinensis*, *Rosa henryi* và *Rosa maximowicziana*. Khoảng cách di truyền giữa các giống hoa hồng cổ miền Bắc Việt Nam ở mức thấp, nằm trong khoảng 0,000-0,145.

Từ khóa: Mã vạch DNA, quan hệ di truyền, hoa hồng, *Rosa*, *trnH-psbA*.

MỞ ĐẦU

Hoa hồng là nhóm cây cảnh thuộc chi *Rosa* (họ Rosaceae), một trong những chi cây cảnh lớn nhất và quan trọng nhất trong lịch sử kinh tế và văn hóa của loài người. Chi này bao gồm 150-200 loài với khoảng 18.000 giống hoa hồng thương mại, có nguồn gốc phân bố tự nhiên ở các vùng ôn đới của Bắc bán cầu, hiện được trồng rộng rãi ở khắp các châu lục (Fougère-Danezan *et al.*, 2015). Với nhu cầu ngày càng tăng về các giống hoa hồng mới trên thị trường hoa thế giới, một số lượng lớn các giống hoa hồng đã và đang liên tục được chọn, tạo giống nhằm cải tiến chất lượng của giống như đặc điểm ra hoa, khả năng thích nghi với các môi trường sống mới (Bendahmane *et al.*, 2013). Tại Việt Nam, hoa hồng bản địa và các giống hoa hồng du nhập được trồng lâu đời từ thế kỷ 19 và nửa đầu thế kỷ 20 thường được gọi là hồng cổ, được trồng rộng rãi để trang trí trong sân vườn do khả năng thích nghi tốt với khí hậu, chống chịu sâu bệnh và cho hoa đẹp. Đây là nguồn nguyên liệu quý để lai tạo giống và làm gốc ghép cho các giống hồng mới, cần được bảo tồn cũng như phân tích di truyền và các đặc điểm sinh thái, thực vật.

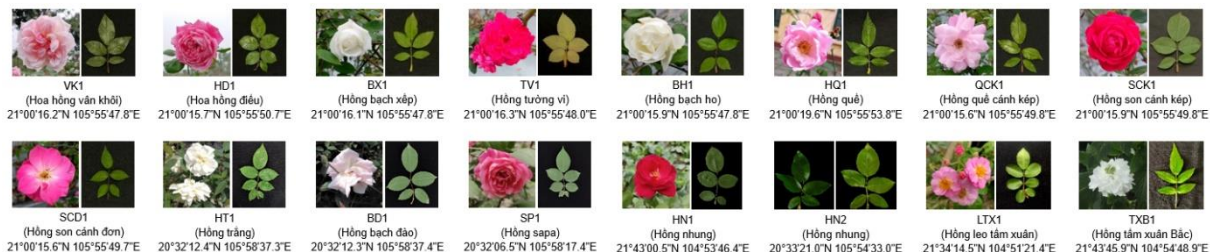
Nhận diện thực vật theo phương pháp truyền thống bằng các đặc điểm hình thái tuy có nhược điểm với một số nhóm thực vật nhưng khá hiệu quả đối với hoa hồng do sự đa dạng và đặc trưng của màu sắc, hình dạng hoa, hình thái lá và thân cây của từng giống. Tuy nhiên, chính sự đa dạng lớn khiến việc xác định mối quan hệ phát sinh bằng hình thái trở nên không chính xác. Với mục đích đánh giá đa dạng và xác định nguồn gốc, quan hệ phát sinh, chỉ thị phân tử được sử dụng rộng rãi do đây là phương pháp khách quan và chính xác. Các chỉ thị với độ đa hình cao như RAPD, AFLP, SSR, ISSR... từ lâu đã được sử dụng trong nghiên cứu đa dạng di truyền hoa hồng. Các chỉ thị này thường có mức độ tái lập thấp hoặc quy trình thực hiện phức tạp. Gần đây, với sự phát triển của kỹ thuật giải trình tự, mã vạch DNA trở thành chỉ thị phổ biến nhất trong nghiên cứu đa dạng và phân loại thực vật do nhiều ưu điểm như độ lặp lại, tính ổn định cao và chi phí ngày càng giảm. Trong các mã vạch DNA phổ biến ở thực vật, ITS được sử dụng nhiều nhất trong phân biệt loài, đánh giá đa dạng di truyền trên hoa hồng. Trong đó, vùng ITS2 có nhiều ưu điểm hơn so với vùng ITS1 (EL-Banhawy *et al.*, 2020). Tại Việt Nam, nghiên cứu của Tuong và đồng tác giả (2020) phân tích đa dạng di truyền trên các loài hoa hồng bản địa thông qua vùng trình tự ITS với 23 mẫu thu thập từ 5 tỉnh thành khác nhau. Nghiên cứu này cho thấy sự đa dạng trong chi *Rosa* và phân bố của chúng tùy thuộc vào vị trí sinh sống của các loài hoa hồng (Tuong *et al.*, 2020). Ngoài ITS, hai mã vạch khác được đề xuất thường xuyên trong các nghiên cứu đa dạng di truyền trên thực vật là *rbcl* (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase) và *matK* (maturase K) cũng được sử dụng (EL-Banhawy *et al.*, 2020). Tuy nhiên, hiệu quả của các mã vạch có thể khác nhau giữa các nhóm/loài thực vật với mức độ đa dạng cũng như khả năng nhận diện thực vật khác nhau. Vào năm 2012, Peng và đồng tác giả đã giới thiệu vùng đệm giữa 2 gene *trnH* và *psbA* trên hệ gene lục lạp như một mã vạch bổ sung để nhận dạng thực vật (Pang *et al.*, 2012). Ở một số loài, vùng này có độ phân hóa cao do sự biến đổi của các nucleotide, có thể đem lại hiệu quả cao trong các nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền và phân loại (Štorchová, Olson, 2007). Trên thế giới, vùng *trnH-psbA*

đã được sử dụng trong các nghiên cứu phân tích đa dạng di truyền hoa hồng (EL-Banhawy *et al.*, 2020; Maloupa *et al.*, 2021). Trong nghiên cứu này, mã vạch *trnH-psbA* được sử dụng để nghiên cứu mối quan hệ di truyền một số giống hoa hồng cổ ở miền Bắc Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Mẫu hoa hồng được thu thập từ vườn tại Học viện Nông nghiệp Việt Nam (Hà Nội), tại tỉnh Hà Nam và tỉnh Yên Bái (Việt Nam) trong thời gian từ tháng 10 năm 2023 đến tháng 02 năm 2024. Danh sách 16 mẫu hoa hồng sử dụng trong nghiên cứu được trình bày ở Hình 1.



Hình 1. Các mẫu hoa hồng sử dụng trong nghiên cứu

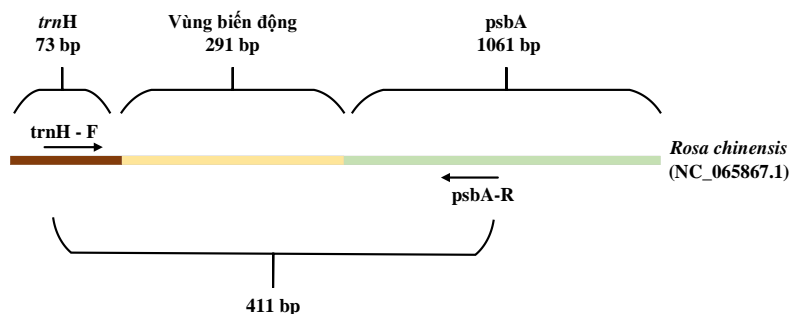
(Tọa độ bên dưới mỗi mẫu chỉ vị trí thu thập mẫu)

Phương pháp ly trích DNA tổng số

Mẫu lá hoa hồng được rửa sạch, bảo quản ở 4 - 8°C trong 1 tháng và ở -80°C trong thời gian dài. DNA tổng số được tách chiết dựa trên quy trình được công bố bởi Sahu và đồng tác giả (2012) có cải tiến (Sahu *et al.*, 2012). Cụ thể, 200 mg mẫu lá tươi được nghiền trong nitơ lỏng sau đó được rửa 2 lần bằng cách bổ sung 1500 μ L đệm rửa (100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0,35 M Glucose, PVP 2%, β -mercaptoethanol 4%), trộn đều và ủ trong đá ở 40 phút sau đó ly tâm ở 12.000 rpm trong 15 phút ở 4°C. Sinh khối lá sau khi rửa được bổ sung 1200 μ L đệm ly trích (100 mM Tris-HCl, 1,5 M NaCl, 50 mM EDTA, 3% CTAB, 4% β -mercaptoethanol), ủ ở 60°C trong 40 phút sau đó ly tâm 12.000 rpm trong 15 phút ở 4°C, thu dịch nổi. DNA được chiết 2 lần với cùng thể tích hỗn hợp phenol : chloroform : isoamylalcohol (25:24:1). DNA trong pha nước thu nhận được sau ly tâm được kết tủa bằng ethanol qua đêm ở -20°C. Cặn DNA được thu nhận bằng ly tâm 13.000 rpm trong 15 phút ở 4°C và được rửa 2 lần với ethanol 70%. Sau khi được hòa tan trong 100 μ L đệm TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, NaCl 0,5 M), DNA được chiết 1 lần nữa bằng cùng thể tích hỗn hợp chloroform : isoamylalcohol (24:1), ly tâm ở 13.000 rpm trong 15 phút ở 4°C và thu dịch nổi. DNA được kết tủa lần 2 bằng isopropanol với tỉ lệ 1:1, rửa 2 lần bằng ethanol 70% và làm khô ở nhiệt độ phòng. DNA được hòa tan trong 50 μ L đệm TE, định tính bằng phương pháp điện di ngang trên gel agarose 0,8% và bảo quản ở -20°C để sử dụng cho phản ứng PCR.

Khuếch đại và giải trình tự vùng *trnH-psbA*

Cặp mồi sử dụng để khuếch đại vùng *trnH-psbA* được thiết kế bằng công cụ PrimerBLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), dựa trên các vùng bảo thủ của gene *trnH* và gene *psbA* của chi *Rosa* L. tham khảo từ Genbank (NCBI, Mỹ). Mồi xuôi *trnH-F* có trình tự ACTGCCTTGATCCACTTGGC, mồi ngược *psbA-R* có trình tự GCGCTAACCTTGGTATGGAAG. Cặp mồi cho sản phẩm PCR dự kiến có kích thước 411 bp, với vị trí bắt cặp của 2 mồi được thể hiện trong Hình 2. Ngoài ra, cặp mồi ITS-F có trình tự GTTCTTTTCTCCGCT và ITS-R có trình tự AGGAGAAGTCGTAACAAG (Zuo *et al.*, 2011) cùng với cặp mồi *rbcL-F* có trình tự TGA AACGTGAATCCCAACCGTTATGCG và *rbcL-R* có trình tự GCAGCAGCTAGTTCGGGCTCCA (Hasebe *et al.*, 1994) được sử dụng để khuếch đại mẫu TXB1.



Hình 2. Vị trí bắt cặp của cặp mồi *trnH-F* và *psbA-R*

DNA mục tiêu được khuếch đại với thành phần phản ứng PCR bao gồm: 12 µL 2X My taq Mix (Bioline, Anh), 2 µL mỗi xuôi (2 pmol/µL), 2 µL mỗi ngược (2 pmol/µL), 2 µL DNA tổng số (100 ng/µL), 6 µL nước khử ion. Thiết bị luân nhiệt PCR Thermal Cycler Block (Thermo Fisher Scientific Oy, Mỹ) được sử dụng để điều nhiệt cho phản ứng theo chu kỳ nhiệt như sau: biến tính ban đầu 95°C trong 5 phút, sau đó là 30 chu kỳ với 30 giây ở 95°C, 30 giây ở 47,7°C, 40 giây ở 72°C, và cuối cùng 72°C trong 1 phút để hoàn thành các phản ứng. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 1,2%, sau đó được giải trình tự Sanger theo 2 chiều tại Công ty TNHH Dịch vụ và Thương mại Nam Khoa (TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam).

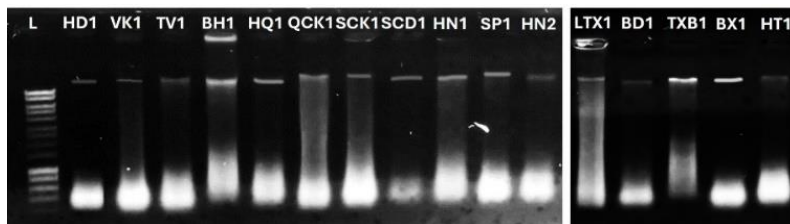
Phương pháp phân tích trình tự

Kết quả giải trình tự được kiểm tra tín hiệu peak, hiệu chỉnh và ghép kết quả giải 2 chiều để được trình tự hoàn chỉnh. Các trình tự được so sánh phân tích cùng với 10 trình tự tham khảo từ Genbank. Trong đó, 9 trình tự đại diện các loài hoa hồng phổ biến trong chi *Rosa* là FN687518.1 (*Rosa canina*), GU575153.1 (*Rosa chinensis*), AB043947.1 (*Rosa gallica*), LC769628.1 (*Rosa luciae*), LC662405.1 (*Rosa multiflora*), AB043945.1 (*Rosa phoenicia*), JX989204.1 (*Rosa roxburghii*), MK862354.1 (*Rosa rugosa*) với AB048211.1 (*Rosa stellata*) và 1 trình tự ngoài nhóm (outgroup) thuộc chi *Rubus*, họ Rosaceae là MZ128738.1 (*Rubus coreanus*). Khoảng cách di truyền giữa các trình tự được đánh giá bằng công cụ p-distance trên phần mềm MEGA-X. Các trình tự được đánh giá mức độ phù hợp của mô hình bằng công cụ Find best DNA/protein Models (ML) từ phần mềm MEGA-X, các thông số tỉ lệ đồng hoán và dị hoán được tính toán dựa trên mô hình phù hợp từ phần mềm trước khi xây dựng cây phát sinh loài. Cây phát sinh loài được xây dựng theo phương pháp Maximum Likelihood bằng phần mềm MEGA-X với giá trị bootstrap 500.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả giải trình tự vùng *trnH-psbA*

DNA tổng số ly trích từ các mẫu hoa hồng cho các băng vạch sáng và rõ nét khi điện di trên gel agarose (Hình 3). Một số mẫu còn nhiễm tạp chất, thể hiện ở vệt sáng tại miệng giếng, một số mẫu khác có hiện tượng đứt gãy nhẹ DNA, tạo ra vệt sáng mờ bên dưới băng chính. Tuy nhiên, với phản ứng PCR truyền thống nhằm khuếch đại DNA cho mục đích giải trình tự với yêu cầu độ nhạy không quá cao, DNA tổng số thu được đủ chất lượng để thực hiện các phân ứng nghiên cứu tiếp theo.



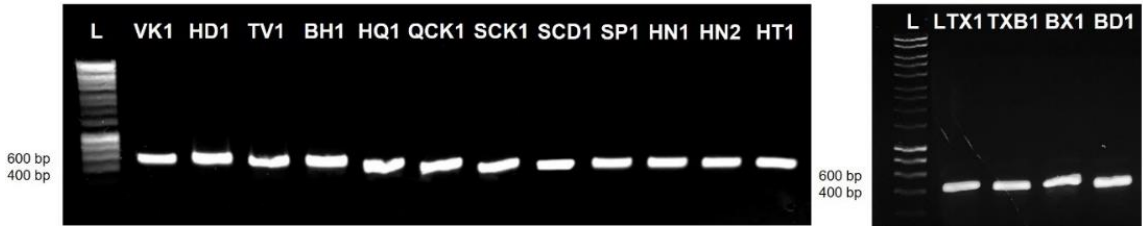
Hình 3. Kết quả điện di DNA tổng số các mẫu hoa hồng

(L: Thang DNA chuẩn, HD1: Hồng điều 1, VK1: Vân khô 1, TV1: Tường vi 1, BH1: Bạch ho 1, HQ1: Hồng quế 1, QCK1: Quế cánh kép 1, SCK1: Sơn cánh kép 1, SCD1: Quế sơn cánh đơn 1, HN1: Hồng nhung 1, HN2: Hồng nhung 2, SP1: Hồng Sapa 1, LTX1: Leo tâm xuân 1, BD1: Bạch đào 1, TXB1: Tuần xuân bắc 1, BX1: Bạch xếp 1, HT1: Hồng trắng 1)

DNA tổng số thu nhận được từ các mẫu hoa hồng được sử dụng làm khuôn để khuếch đại vùng *trnH-psbA* bằng cặp mồi tự thiết kế trên vùng bảo thủ của các gene *trnH* và *psbA*. Tất cả các mẫu đều cho sản phẩm PCR với băng vạch sáng và rõ, không có sản phẩm khuếch đại không đặc hiệu và primer-dimer (Hình 4). Kích thước sản phẩm PCR của các mẫu đều nằm trong khoảng 400-600 bp khi so với thang DNA chuẩn 1.000 bp (Bioline, Mỹ), phù hợp với kích thước sản phẩm dự kiến khi thiết kế mồi. Như vậy, trình tự vùng *trnH-psbA* của các mẫu hoa hồng đều được khuếch đại DNA thành công.

Trình tự vùng *trnH-psbA* của các mẫu sau khi cắt xem phần của gene *trnH* và gene *psbA* có độ dài khoảng 270 bp. Kết quả so sánh trình tự với dữ liệu Genbank bằng công cụ NCBI BLAST cho thấy đa số các mẫu tương đồng 100% với các loài *Rosa chinensis* và *Rosa henryi*. BH1, HN1 và HN2 có mức độ tương đồng cao nhất 99,6% với loài *Rosa canina*. Kết quả này khá thống nhất với nghiên cứu phân tích ITS của Tuong và đồng tác giả (2020), cho thấy đa phần các giống hồng Việt Nam thuộc loài *Rosa chinensis*. Riêng mẫu TXB1 (tâm xuân bắc) có độ tương đồng 100% với các loài trong chi *Rubus* của họ Rosaceae. Tâm xuân bắc (*Rosa tunquinensis*) là một loài hồng bản địa của Việt Nam, thường mọc hoang dại ở các vùng núi phía bắc hoặc đôi khi được trồng thành bụi để làm cảnh. Cây có hình thái tương đối khác biệt với các giống hoa hồng cảnh phổ biến khác. Việc trình tự của nhiều gene mã vạch khác nhau của cây tương đồng lớn với một chi khác gợi ý rằng cần xem xét lại vị trí phân loại của cây. Do đó, mẫu này được giải trình tự thêm 2 mã vạch khác là ITS và *rbcl*. So sánh trình tự 2 mã vạch này cho kết quả tương đồng 100% với *Rosa luciae*, *Rosa kwangtungensis*, *Rosa multiflora*, *Rosa odorata* và *Rosa soulieana*. Kết quả này khẳng định vị trí phân loại của nó trong chi *Rosa*. Như vậy, vùng *trnH-*

psbA có thể không phải là mã vạch đáng tin cậy và không nên sử dụng trong phân loại, định danh các loài của chi *Rosa* nói riêng và họ Rosaceae nói chung.



Hình 4. Sản phẩm PCR khuếch đại vùng *trnH-psbA* của các mẫu hoa hồng

(L: Thang DNA chuẩn, VK1: Vân khô 1, HD1: Hồng điều 1, TV1: Tường vi 1, BH1: Bạch ho 1, HQ1: Hồng quế 1, QCK1: Quế cánh kép 1, SCK1: Sơn cánh kép 1, SCD1: Quế sơn cánh đơn 1, SP1: Hồng Sapa 1, HN1: Hồng nhung 1, HN2: Hồng nhung 2, HT1: Hồng trắng 1, LTX1: Leo tâm xuân 1, TXB1: Tuần xuân bắc 1, BX1: Bạch xếp 1, BD: Bạch đào 1)

Phân tích mối quan hệ di truyền của các giống hồng cổ nghiên cứu

Bảng 1. Khoảng cách di truyền giữa các mẫu hoa hồng cổ nghiên cứu

Mẫu	BD1	BH1	HD1	HN1	HN2	HT1	HQ1	QCK1	SCD1	SCK1	SP1	TV1	VK1	BX1	LTX1	TXB1
BD1																
BH1	0,004															
HD1	0,000	0,004														
HN1	0,004	0,000	0,004													
HN2	0,004	0,000	0,004	0,000												
HT1	0,000	0,004	0,000	0,004	0,004											
HQ1	0,000	0,004	0,000	0,004	0,004	0,000										
QCK1	0,000	0,004	0,000	0,004	0,004	0,000	0,000									
SCD1	0,000	0,004	0,000	0,004	0,004	0,000	0,000	0,000								
SCK1	0,000	0,004	0,000	0,004	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000							
SP1	0,000	0,004	0,000	0,004	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000						
TV1	0,000	0,004	0,000	0,004	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000					
VK1	0,000	0,004	0,000	0,004	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000				
BX1	0,000	0,004	0,000	0,004	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000			
LTX1	0,009	0,013	0,009	0,013	0,013	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009		
TXB1	0,136	0,145	0,136	0,145	0,145	0,136	0,136	0,136	0,136	0,136	0,136	0,136	0,136	0,136	0,136	0,141

Khoảng cách di truyền giữa 16 mẫu hoa hồng nghiên cứu ở mức thấp, dao động trong khoảng từ 0,000 đến 0,013 giữa 15/16 mẫu bao gồm BD1, BH1, HD1, HN1, HN2, HT1, HQ1, QCK1, SCD1, SCK1, SP1, TV1, BX1 và LTX. Chỉ riêng mẫu TXB có hệ số sai khác với các mẫu còn lại khá lớn, từ 0,136 đến 0,145 (Bảng 1). Các nghiên cứu đa dạng di truyền trên hoa hồng trước đây cũng đã khẳng định, chi *Rosa* có mức độ đa dạng phân tử thấp ở cả hệ gene nhân và hệ gene lục lạp. Điều này cho thấy mặc dù khá đa dạng về hình thái, nhưng hầu hết các giống hoa hồng ngày nay có chung nguồn gốc gần (Anne *et al.*, 2007).

Sự thay đổi nucleotide xảy ra khắp các vị trí codon được thể hiện ở Bảng 2. Về mặt lý thuyết cho biết có 4 loại đồng hoán (A ↔ G và C ↔ T) và 8 loại dị hoán (giữa purine và pyrimidine) (Stoltzfus, Norris, 2016). Tỷ lệ đồng hoán/dị hoán được dự kiến là 0,5. Trong mô hình này, tỷ lệ đồng hoán chỉ chiếm 39,6% thấp hơn đáng kể so với tỷ lệ dị hoán là 60,4%, cho thấy rằng các đột biến dị hoán đóng vai trò trong việc giúp cá thể thích nghi tốt hơn với môi trường sống. Tuy nhiên, các đột biến dị hoán có thể ảnh hưởng đến cấu trúc của DNA, làm thay đổi tính chất và chức năng của gene do sự thay thế giữa purine và pyrimidine. Vì vậy, thông thường các đột biến đồng hoán được phổ biến hơn do tính ổn định trong các vùng bảo tồn qua các thế hệ. Qua đó, mô hình cũng cung cấp thông tin quan trọng cho việc phân tích phân loại trong việc xây dựng cây phát sinh loài.

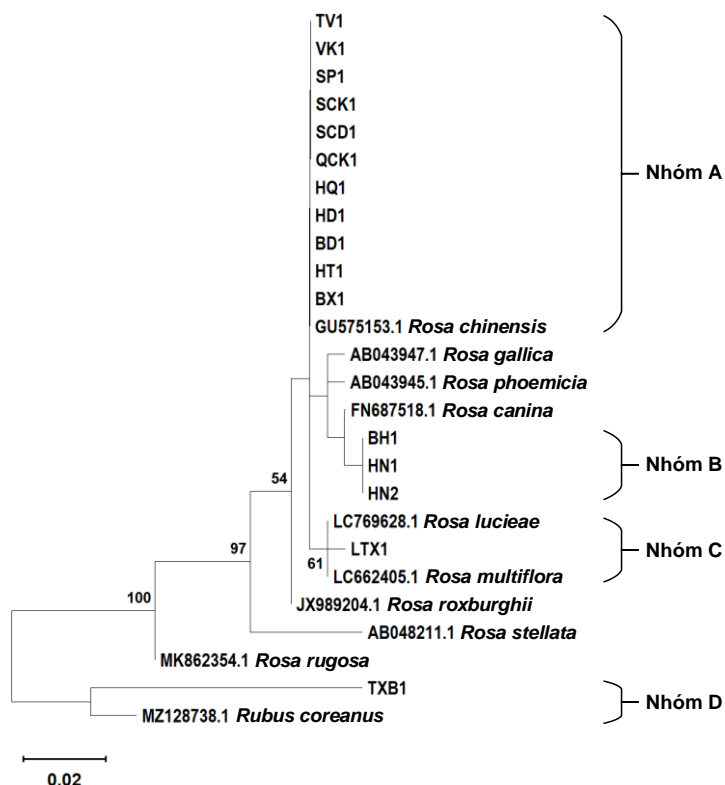
Bảng 2. Mô hình thay thế nucleotide giữa các trình tự vùng *trnH-psbA* của 16 mẫu hoa hồng (%)

Base nitơ	A	T	C	G
A	-	11,63	3,47	4,54
T	11,63	-	4,54	3,47
C	11,63	15,26	-	3,47
G	15,26	11,63	3,47	-

(Mô hình và tỉ lệ thay thế được ước tính theo mô hình Tamura 3-parameter với tỷ lệ thay thế chuyển tiếp khác nhau và tỷ lệ thay thế chuyển đổi được thể hiện bằng chữ in đậm)

Trên cây phát sinh loài, các mẫu hoa hồng nghiên cứu phân thành 4 nhóm (Hình 5). Nhóm A bao gồm 11 trình tự tương đồng hoàn toàn với nhau (TV1, VK1, SP1, SCK1, SCD1, QCK1, HQ1, HD1, BD1, HT1 và BX1) và với loài

Rosa chinensis (GU575153.1). Trong nhóm B, ba mẫu HN1, HN2 và BH1 cho thấy mức độ tương đồng cao nhất với loài *Rosa canina* (FN687518.1). LTX1 nằm ở nhóm C cùng với hai loài *Rosa multiflora* (LC662405.1) và *Rosa luciae* (LC769628.1). Riêng TXB1, với trình tự khác biệt các mẫu hoa hồng còn lại và nằm ở nhóm D, cùng với loài *Rubus coreanus* (MZ128738.1).



Hình 5. Cây phát sinh loài của các giống hoa hồng cổ nghiên cứu được xây dựng dựa trên các trình tự vùng *trnH-psbA* bằng phương pháp Maximum Likelihood

KẾT LUẬN

Kết quả giải trình tự các vùng *trnH-psbA* cho thấy 16 mẫu hoa hồng cổ phân thành 4 nhóm trên cây phát sinh loài. Các giống hồng cổ trồng lâu đời ở miền Bắc Việt Nam có quan hệ di truyền gần nhất với loài *Rosa chinensis* (GU575153.1) và *Rosa canina* (FN687518.1). Các giống hoa hồng cổ này có độ tương đồng di truyền cao và có khoảng cách di truyền khá lớn với loài hoang dại bản địa *Rosa tunkuensis*. Tuy nhiên, kết quả cũng cho thấy *trnH-psbA* không phải là mã vạch DNA thích hợp để sử dụng trong định danh, phân loại hoa hồng.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được cấp kinh phí bởi Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh theo hợp đồng số 156/HĐ-DCT ngày 31 tháng 8 năm 2024.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anne B, Julian RS, Simon J (2007). Phylogenetic Relationships in the Genus *Rosa*: New Evidence from Chloroplast DNA Sequences and an Appraisal of Current Knowledge. *Systematic Botany*, 32(2): 366-378.
- Bendahmane M, Dubois A, Raymond O, & Bris M Le. (2013). Genetics and genomics of flower initiation and development in roses. *J Exper Bot*, 64(4): 847-857.
- EL-Banhawy A, Acedo C, Qari S, Elkordy A (2020). Molecular Identification and Phylogenetic Placement of *Rosa arabica* Crép. (Rosaceae), a Critically Endangered Plant Species. *Life*, 10(12): 335.
- Fougère-Danezan M, Joly S, Bruneau A, Gao XF, Zhang LB. (2015). Phylogeny and biogeography of wild roses with specific attention to polyploids. *Ann Bot*, 115(2): 275-291.
- Hasebe M, Omori T, Nakazawa M, Sano T, Kato M, Iwatsuki K. (1994). *rbcL* gene sequences provide evidence for the evolutionary lineages of leptosporangiate ferns. *PNAS*, 91(12): 5730-5734.
- Maloupa E, Karapatzak E, Ganopoulos I, Karydas A, Papanastasi K, Kyrkas D, Yfanti P, Nikisianis N, Zahariadis A, Kosma I S, Badeka A V, Patakioutas G, Fotakis D, Krigas N. (2021). Molecular Authentication, Phytochemical Evaluation and Asexual Propagation of Wild-Growing *Rosa canina* L. (Rosaceae) Genotypes of Northern Greece for Sustainable Exploitation. *Plants*, 10(12): 2634.

- Pang X, Liu C, Shi L, Liu R, Liang D, Li H, Cherny SS, Chen S. (2012). Utility of the *trnH-psbA* Intergenic Spacer Region and ITS Combinations as Plant DNA Barcodes: A Meta-Analysis. *PLoS ONE*, 7(11): e48833.
- Sahu S K, Thangaraj M, & Kathiresan K. (2012). DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol. *ISRN Mol Biol*, 2012, 1-6.
- Stoltzfus A, Norris R W. (2016). On the Causes of Evolutionary Transition: Transversion Bias. *Mol Biol Evol*, 33(3): 595-602.
- Štorchová H, Olson MS (2007). The architecture of the chloroplast *psbA-trnH* non-coding region in angiosperms. *Plant Sys Evol*, 268(1-4): 235-256.
- Tuong LQ, Tam TV, Dong DV, Duong TD, Cuc DTK, Thu PTL, Luong DT, Tuyen VTM, Giang N, Tuan NT, Trung NT, Khanh TD, Trung KH (2020). Identification of Vietnamese native rose species by using internal transcribed spacers (ITS) sequencing. *Plant Cell Biotechnol Mol Biol*, 21(11 & 12): 1-10.
- Zuo Y, Chen Z, Kondo K, Funamoto T, Wen J, Zhou . (2011). DNA Barcoding of *Panax* Species. *Plant Med*, 77(02): 182–187.

STUDY ON GENETIC RELATIONSHIP OF SOME OLD-FASHIONED ROSES (*Rosa* spp.) FROM NORTHERN VIETNAM BASED ON *trnH-psbA* SEQUENCE

Ngo Van Duc, Hoang Hai Dang, Trieu Phuong Mai, Pham Quoc Toan, Nguyen Thi Bich Huong, Le Thi Kieu Trinh, Nguyen Minh Phuong*

Ho Chi Minh City University of Industry and Trade

Summary

This study aims to determine and analyze the *trnH-psbA* region sequence to assess the genetic relationship of old-fashioned roses cultivated in Northern Vietnam. Primers for DNA amplification were designed based on referenced *Rosa* sequences obtained from the NCBI Genbank database. Total DNA was extracted from leaf samples using the CTAB method, and the *trnH-psbA* region was subsequently amplified through polymerase chain reaction and sequenced using the Sanger sequencing technique. Sixteen representative samples of old-fashioned roses were collected, and their DNA was successfully extracted, amplified, and sequenced. The sequences of the rose samples, and 10 reference sequences from Genbank were analyzed for similarity and used to construct a phylogenetic tree. The results showed that the examined rose samples exhibited the highest similarity to *Rosa chinensis*, *Rosa henryi*, and *Rosa maximowicziana* species. The genetic distance among the rose samples in Northern Vietnam was low, ranging from 0.000 to 0.145.

Keywords: DNA barcode, genetic relationship, *Rosa*, rose, *trnH-psbA*.

* Author for correspondence: Tel: 0963372277; Email: phuonnguyen@huit.edu.vn