

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP.HCM
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC



KHÓA LUẬN TỐT NGHIỆP

**BƯỚC ĐẦU HOÀN THIỆN PHƯƠNG PHÁP VÀ NGHIÊN
CỨU SỰ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CÂY CÓC TRẮNG
(*Lumnitzera racemosa* Willd) TẠI KHU DỰ TRỮ SINH
QUYÊN RỪNG NGẬP MẶN CẦN GIỜ
BẰNG KỸ THUẬT RAPD**

Ngành học: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Niên khóa: 2003 - 2007

Sinh viên thực hiện: LÊ NGUYỄN MAI KHOA

Thành phố Hồ Chí Minh
Tháng 9/2007

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP.HCM
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC



**BƯỚC ĐẦU HOÀN THIỆN PHƯƠNG PHÁP VÀ NGHIÊN
CỨU SỰ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CÂY CỐC TRẮNG
(*Lumnitzera racemosa* Willd) TẠI KHU DỰ TRỮ SINH
QUYỂN RỪNG NGẬP MẶN CẦN GIỜ
BẰNG KỸ THUẬT RAPD**

Giáo viên hướng dẫn:

TS. BÙI MINH TRÍ

Sinh viên thực hiện:

LÊ NGUYỄN MAI KHOA

Thành phố Hồ Chí Minh
Tháng 9/2007

LỜI CẢM ƠN



Quyển luận văn này là thành quả của con suốt 4 năm đại học. Con xin kính dâng lên Ba Mẹ với lòng tri ân sâu sắc. Con xin cảm ơn Ba Mẹ đã hy sinh tất cả nuôi lớn chúng con, cho chị em con ăn học thành tài. Chị cảm ơn các em Khuê, An, Thiện đã luôn yêu thương, chia sẻ vui buồn cùng chị, cáng đáng gia đình trong lúc chị đi học xa. Gia đình mình luôn là nguồn động viên khích lệ to lớn của con.

Em xin chân thành cảm ơn:

- Các Thầy – Cô trong trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh đã tận tình truyền đạt kiến thức cho em trong suốt 4 năm qua.
- Ban chủ nhiệm cùng các Thầy – Cô trong Bộ Môn Công Nghệ Sinh Học đã động viên, giúp đỡ em trong thời gian thực hiện khóa luận.
- Thầy Bùi Minh Trí đã tận tình động viên, chỉ dẫn, truyền đạt kiến thức cho em trong suốt quá trình thực hiện khóa luận, cho em những lời khuyên hữu ích giúp em hoàn thiện bản thân cả trong chuyên ngành và trong cuộc sống.
- Các anh chị trong Trung tâm Phân tích và Thí nghiệm Hóa sinh đã động viên, giúp đỡ em trong quá trình thực hiện khóa luận.
- Ban quản lý Rừng phòng hộ Cần Giờ đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình thu thập mẫu.

Xin cảm ơn các bạn bè thân quen, các bạn lớp Công Nghệ Sinh Học 29, đặc biệt tôi xin gửi lời cảm ơn đến các bạn phòng 23C, 17A cư xá B Ký túc xá Đại học Nông Lâm đã cùng tôi chia sẻ biết bao niềm vui, nỗi buồn trong suốt 4 năm xa nhà học đại học.

Khoa cảm ơn Doanh, vì tất cả...

Xin chân thành cảm ơn!

LÊ NGUYỄN MAI KHOA

TÓM TẮT

“BƯỚC ĐẦU HOÀN THIÊN PHƯƠNG PHÁP VÀ NGHIÊN CỨU SỰ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CÂY CỐC TRẮNG (*Lumnitzera racemosa* Willd) TẠI KHU DỰ TRỮ SINH QUYỀN RỪNG NGẬP MẶN CẦN GIỜ BẰNG KỸ THUẬT RAPD”.

Đề tài được tiến hành tại khu dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ và Trung tâm phân tích thí nghiệm hóa sinh trường đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh từ tháng 04/2007 đến 08/2007.

Cây Cóc trắng (*Lumnitzera racemosa* Willd) là một trong 34 loài cây ngập mặn thật sự (true mangrove) tại Việt Nam. Tại khu dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ, Cóc trắng là quần thể phổ biến và đa số là được tái sinh tự nhiên sau chiến tranh. Qua hơn 30 năm phát triển, cùng với sự phát triển của rừng, quần thể Cóc trắng tại đây đã có dấu hiệu suy tàn. Để bảo vệ và tái tạo rừng cần thiết lập sơ đồ trồng và bảo tồn rừng. Do đó, những nghiên cứu về di truyền quần thể là cần thiết, giúp cung cấp những thông tin làm cơ sở để thiết lập những chiến lược bảo tồn sự đa dạng di truyền của quần thể.

Những kết quả đạt được:

- Thu thập được 45 mẫu lá Cóc trắng.
- Tối ưu hóa quy trình ly trích DNA.
- Xây dựng quy trình phản ứng RAPD cho cây Cóc trắng. Primer OPAC10 thể hiện rõ sự đa dạng di truyền trên cây Cóc trắng so với các primer thử nghiệm. Chúng tôi thu được 4 band đa hình và 2 band đồng hình. Đây có thể là chỉ thị phân tử cho loài Cóc trắng.
- Cây phân loại di truyền của quần thể Cóc trắng với 11 mẫu phân tích được chia làm hai nhóm với hệ số đồng dạng là 0,5. Nhóm I gồm 2 mẫu được lấy dọc theo đường bộ, nhóm II gồm 9 mẫu được lấy dọc đường sông.
- Quần thể Cóc trắng tại rừng Cần Giờ có mức đa dạng di truyền thấp. Do đó cần làm tăng độ đa dạng di truyền của quần thể bằng cách trồng xen các cây có nguồn gốc giống từ nơi khác.

SUMMARY

“PRELIMINARY RESEARCH ON METHOD DEVELOPMENT AND GENETIC DIVERSITY EVALUATION OF *Lumnitzera racemosa* Willd IN CAN GIO MANGROVE BIOSPHERE RESERVE AREA USING RAPD”.

This thesis was carried out in Can Gio Mangrove Biosphere Reserve Area and Chemical and Biological Analysis and Experiment Center Nong Lam University from April to August 2007.

Lumnitzera racemosa Willd is one of 34 true mangrove species in Viet Nam. In Can Gio Mangrove Biosphere Reserve Area, it is a common population. Almost the population is naturally regenerated after the war. However, after 30 years, the population has degraded. In order to protect and preserve the Can Gio mangrove forest, scheme for afforestation and conservation should be established. Studies on population genetics are necessary to provide basic information for establishing strategies for conserving genetic diversity of Can Gio mangrove forest.

The obtained results are:

- Collected 45 leaf samples from *Lumnitzera racemosa*.
- Optimized DNA isolation protocol.
- Developed RAPD protocol using for *Lumnitzera racemosa*. Primer OPAC10 showed the genetic diversity clearer than other tested primers. We had 4 polymorphic fragments and 2 isomorphic fragments. It is possible to be DNA marker for *Lumnitzera racemosa* species.
- The phylogenetic tree of *Lumnitzera racemosa* divided 11 samples into 2 group. The first group had 2 samples which have been collected along road, the others have been collected along river.
- The *Lumnitzera racemosa* population in Can Gio Mangrove Biosphere Reserve had low level of genetic diversity. In order to increase the level of genetic diversity, we should plant *Lumnitzera racemosa* with different origin into the existing population.

MỤC LỤC

| CHƯƠNG | TRANG |
|--|----------|
| Trang tựa | |
| Lời cảm ơn----- | iii |
| Tóm tắt ----- | iv |
| Summary ----- | v |
| Mục lục----- | vi |
| Danh sách các chữ viết tắt----- | ix |
| Danh sách các hình ----- | x |
| Danh sách các bảng----- | xi |
| 1. MỞ ĐẦU ----- | 1 |
| 1.1. Đặt vấn đề----- | 1 |
| 1.2. Mục đích----- | 2 |
| 1.3. Yêu cầu ----- | 2 |
| 1.4. Giới hạn đề tài ----- | 2 |
| 2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU ----- | 3 |
| 2.1. Giới thiệu về khu dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ ----- | 3 |
| 2.1.1. Chức năng khu dự trữ sinh quyển----- | 3 |
| 2.1.2. Khu dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ ----- | 4 |
| 2.1.3. Cấu trúc Khu dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ ----- | 8 |
| 2.2. Cây Cóc trắng----- | 10 |
| 2.2.1 Phân loại----- | 10 |
| 2.2.2 Đặc điểm hình thái cây Cóc trắng----- | 11 |
| 2.3. Các phương pháp dùng trong nghiên cứu tính đa dạng di truyền----- | 12 |
| 2.3.1. Phương pháp tách chiết DNA ở thực vật ----- | 12 |
| 2.3.2. Định lượng và xác định độ tinh sạch của DNA ----- | 13 |
| 2.3.2.1. Phương pháp đo quang phổ ----- | 13 |
| 2.3.2.2. Phương pháp điện di ----- | 14 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.3.3. | PCR | 15 |
| 2.3.4. | Các marker phân tử trong nghiên cứu đa dạng di truyền | 19 |
| 2.3.4.1. | Microsatellite/ SSR | 19 |
| 2.3.4.2. | AFLP | 21 |
| 2.3.4.3. | RAPD | 25 |
| 3.1. | Thời gian và địa điểm thực hiện | 28 |
| 3.1.1. | Thời gian thực hiện | 28 |
| 3.1.2. | Địa điểm thực hiện | 28 |
| 3.2. | Vật liệu thí nghiệm | 28 |
| 3.2.1. | Mẫu lá Cóc trắng | 28 |
| 3.2.2. | Hóa chất thí nghiệm | 29 |
| 3.2.2.1. | Hóa chất ly trích DNA | 29 |
| 3.2.2.2. | Hóa chất kiểm tra định lượng DNA | 31 |
| 3.2.2.3. | Hóa chất thực hiện phản ứng RAPD | 31 |
| 3.2.2.4. | Hóa chất dùng trong điện di và đọc kết quả | 32 |
| 3.2.3. | Trang thiết bị thí nghiệm | 32 |
| 3.3. | Phương pháp nghiên cứu | 32 |
| 3.3.1. | Phương pháp ly trích DNA | 32 |
| 3.3.1.1. | Quy trình 1 | 32 |
| 3.3.1.2. | Quy trình 2 | 33 |
| 3.3.1.3. | Quy trình 3 | 34 |
| 3.3.2. | Kiểm tra kết quả ly trích DNA | 35 |
| 3.3.2.1. | Kiểm tra định lượng DNA bằng quang phổ kế | 35 |
| 3.3.2.2. | Kiểm tra định tính DNA bằng điện di trên gel | 35 |
| 3.3.3. | Phản ứng RAPD | 36 |
| 3.3.3.1. | Primer | 36 |
| 3.3.3.2. | Bố trí thí nghiệm | 36 |
| 4. | KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN | 41 |

| | | |
|---------------|--|-----------|
| 4.1. | Kết quả thu thập mẫu lá Cóc trắng tại Khu dự trữ sinh quyển | |
| | rừng ngập mặn Cần Giờ ----- | 41 |
| 4.2. | Bảo quản mẫu và hoàn thiện quy trình ly trích DNA ----- | 42 |
| 4.2.1. | Bảo quản mẫu----- | 42 |
| 4.2.2. | Hoàn thiện quy trình ly trích----- | 43 |
| 4.3. | Thực hiện phản ứng RAPD----- | 50 |
| 4.3.1. | Thí nghiệm 1 ----- | 50 |
| 4.3.2. | Thí nghiệm 2 ----- | 51 |
| 4.3.3. | Thí nghiệm 3 ----- | 54 |
| 4.3.4. | Thí nghiệm 4 ----- | 55 |
| 5. | KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ ----- | 59 |
| 5.1. | Kết luận----- | 59 |
| 5.2. | Đề nghị ----- | 60 |
| | TÀI LIỆU THAM KHẢO----- | 61 |
| | PHỤ LỤC----- | 63 |

DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT

μ l: microlite.

1E, 2E...: Ký hiệu mẫu lá ly trích theo quy trình 2.

1N, 2N...: Ký hiệu mẫu lá ly trích theo quy trình 3.

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphic.

bp: Base pair.

DNA: Deoxyribonucleic acid.

dNTP: Deoxynucleotide triphosphate.

EDTA: Ethylene diaminetetra acetic acid.

KDTSQ: Khu dự trữ sinh quyển.

ml: mililite.

ng: nanogram.

Nu: Nucleotide.

OD: Optical Density.

PCR: Polymerase Chain Reaction.

pmol: picromol.

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA.

SSR: Simple Sequence Repeat.

T_a : Annealing temperature.

TAE: Tris Glacial Acetic Acid EDTA.

Taq: *Taq* DNA polymerase.

TE: Tris EDTA.

T_m : Melting temperature.

UNESCO: United Nations Educational Scientific, and Cultural Organization.

UV: Ultra Violet.

DANH SÁCH CÁC HÌNH

| HÌNH | TRANG |
|---|-------|
| Hình 2.1. Bản đồ khu dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ ----- | 5 |
| Hình 2.2 Cây Cóc trắng ----- | 10 |
| Hình 2.3 Lá Cóc trắng ----- | 11 |
| Hình 2.4. Hoa Cóc trắng ----- | 12 |
| Hình 2.5. Trái Cóc trắng ----- | 12 |
| Hình 2.6. Các bước cơ bản của phản ứng PCR ----- | 17 |
| Hình 2.7. Cơ chế cắt của hai enzyme----- | 22 |
| Hình 2.8. Cơ chế gắn của 2 adapter <i>MseI</i> và <i>EcoRI</i> ----- | 22 |
| Hình 2.9. Cơ chế khuếch đại tiền chọn lọc ----- | 23 |
| Hình 4.1. Vị trí lấy mẫu trên bản đồ Cần Giờ ----- | 41 |
| Hình 4.2. Mẫu lá Cóc trắng sau 30 ngày bảo quản ----- | 42 |
| Hình 4.3. Quy trình 3 (quy trình ly trích nghiền trong N ₂ lỏng) ----- | 45 |
| Hình 4.4. Gel điện di kết quả ly trích DNA theo quy trình 2 và 3 ----- | 46 |
| Hình 4.5. Lá Cóc trắng bị đốm nâu và sâu ăn ----- | 47 |
| Hình 4.6. Kết quả điện di sản phẩm ly trích DNA từ mẫu lá tươi ban đầu theo quy trình 2 và mẫu lá bảo quản sau 30 ngày theo quy trình 3 ----- | 48 |
| Hình 4.7. Hình điện di sản phẩm PCR ở thí nghiệm 1 ----- | 50 |
| Hình 4.8. Hình điện di sản phẩm RAPD với primer 1 ----- | 52 |
| Hình 4.9. Hình điện di sản phẩm RAPD với primer 2 và 9 ----- | 52 |
| Hình 4.10. Hình điện di sản phẩm RAPD với primer OPAC10 ----- | 53 |
| Hình 4.11. Hình điện di sản phẩm RAPD với primer RAH8, OPA5, OPA10----- | 53 |
| Hình 4.12. Hình điện di sản phẩm RAPD của thí nghiệm 3----- | 54 |
| Hình 4.13. Hình điện di sản phẩm RAPD của thí nghiệm 4----- | 55 |
| Hình 4.14. Cây phân loại một số cây Cóc trắng tại Khu dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ ----- | 57 |

DANH SÁCH CÁC BẢNG

| BẢNG | TRANG |
|---|-------|
| Bảng 2.1. Nồng độ gel và kích thước đoạn cần phân tách ----- | 15 |
| Bảng 3.1. Thành phần hóa chất phản ứng RAPD của thí nghiệm 1 ----- | 37 |
| Bảng 3.2. Chu trình nhiệt 1 cho phản ứng RAPD của thí nghiệm 1 ----- | 37 |
| Bảng 3.3. Chu trình nhiệt 2 cho phản ứng RAPD của thí nghiệm 1 ----- | 37 |
| Bảng 3.4. Thành phần hóa chất trong phản ứng RAPD của thí nghiệm 2 ----- | 38 |
| Bảng 3.5. Chu trình nhiệt cho phản ứng RAPD của thí nghiệm 2 ----- | 38 |
| Bảng 3.6. Thành phần hóa chất trong thí nghiệm 3 ----- | 39 |
| Bảng 3.7. Chu trình nhiệt cho phản ứng RAPD của thí nghiệm 3 ----- | 40 |

Chương 1

MỞ ĐẦU

1.1. Đặt vấn đề

Rừng ngập mặn Cần Giờ là khu dự trữ sinh quyển đầu tiên của Việt Nam được thế giới công nhận. Đây được xem là hệ sinh thái quan trọng điển hình ở vùng ven biển nhiệt đới. Rừng ngập mặn Cần Giờ có giá trị cải thiện môi trường rõ rệt và có tính đa dạng sinh học cao. Theo đánh giá của các nhà khoa học, tính đa dạng sinh học của hệ sinh thái rừng ngập mặn có giá trị kinh tế to lớn giúp nâng cao đời sống dân địa phương, tạo khu du lịch sinh thái và học tập nghiên cứu [19].

Trong các loài cây ngập mặn thật sự thì Cóc trắng (*Lumnitzera racemosa* Willd) là quần thể phổ biến tại rừng Cần Giờ. Đối với người dân địa phương thì Cóc trắng là cây có giá trị kinh tế. Thân cây dùng làm củi đốt, gỗ xây dựng, nguyên liệu giấy, làm than. Vỏ cây chứa 19% tanin dùng nhuộm lưới và thuộc da [16]. Tuy nhiên giá trị lớn nhất của Cóc trắng là giá trị sinh thái. Cây có hệ rễ đâm sâu vào lớp mùn dày giúp giữ đất, tránh xói lở. Quần thể Cóc trắng góp phần vào việc tạo sinh cảnh và tăng sự đa dạng sinh học của hệ thực vật rừng Cần Giờ.

Hiện nay, quần thể Cóc trắng tại rừng Cần Giờ chủ yếu là quần thể tái sinh tự nhiên sau chiến tranh. Qua hơn 30 năm phát triển, cùng với sự phát triển của rừng, quần thể Cóc trắng tại đây đã có dấu hiệu suy tàn. Vì vậy, để có chiến lược phát triển rừng lâu dài đem lại hiệu quả kinh tế và sinh thái cao, vấn đề đánh giá tổng quát quỹ gene và mức độ đa dạng di truyền của quần thể Cóc trắng rừng Cần Giờ là một việc làm cần thiết. Đáp ứng yêu cầu đó, được sự phân công của Bộ môn Công nghệ Sinh học – Trường Đại học Nông Lâm TP. HCM, dưới sự hướng dẫn của TS. Bùi Minh Trí, chúng tôi đã tiến hành thực hiện đề tài: “BƯỚC ĐẦU HOÀN THIỆN PHƯƠNG PHÁP VÀ NGHIÊN CỨU SỰ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CÂY CÓC TRẮNG (*Lumnitzera racemosa* Willd) TẠI KHU DỰ TRỮ SINH QUYỂN RỪNG NGẬP MẶN CẦN GIỜ BẰNG KỸ THUẬT RAPD”

1.2. Mục tiêu

- Tối ưu hóa phương pháp ly trích DNA.
- Bước đầu xây dựng quy trình RAPD trên cây Cóc trắng.
- Thông qua kỹ thuật RAPD, bước đầu đánh giá về mặt di truyền quần thể Cóc trắng tại Khu dự trữ sinh quyển Rừng ngập mặn Cần Giờ thành phố Hồ Chí Minh.

1.3. Yêu cầu

- Thu thập mẫu lá từ những cây Cóc trắng ở các tiểu khu, chú ý các cây có đặc điểm khác biệt như: cây có bệnh, có màu sắc, hình dáng hoa và trái khác lạ.
- Ly trích được DNA từ mẫu lá Cóc trắng với độ tinh sạch đảm bảo đủ tiêu chuẩn để thực hiện các bước phân tích tiếp theo.
- Thực hiện thành công quy trình kỹ thuật RAPD, từ đó tiến hành đánh giá sơ bộ mức độ đa dạng di truyền trên cây Cóc trắng.
- Vẽ và phân tích cây phân nhóm đa dạng di truyền một số mẫu của quần thể Cóc trắng.

1.4. Giới hạn đề tài

- Khóa luận được thực hiện từ tháng 04/2007 đến tháng 08/2007, khoảng thời gian tương đối ngắn nên chưa phản ánh đầy đủ và chính xác mức độ đa dạng di truyền của *Lumnitzera racemosa* Willd hiện có.
- Đề tài chỉ tiến hành nghiên cứu đối với quần thể Cóc trắng tại một số tiểu khu trong Khu dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ, TP. Hồ Chí Minh.
- Việc lấy mẫu nghiên cứu chỉ dựa trên cơ sở quan sát các cá thể nổi bật, không thu thập nghiên cứu trên các dòng giống cụ thể đã được xác định.
- Chưa đủ điều kiện để thực hiện nhiều primer đối với kỹ thuật RAPD nhằm thu được kết quả chính xác hơn.

Chương 2

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. Giới thiệu về khu dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ

2.1.1. Chức năng khu dự trữ sinh quyển

Theo ủy ban Quốc gia con người và sinh quyển Việt Nam, khu dự trữ sinh quyển (KDTSQ) là đại diện mẫu của các hệ sinh thái trên trái đất, là thí nghiệm sống cho việc nghiên cứu và giám sát các hệ sinh thái đem lại lợi ích cho người dân địa phương và Quốc tế. Hiện nay trên thế giới có 459 KDTSQ thuộc 97 nước. Riêng Việt Nam đã có 4 KDTSQ bao gồm các hệ sinh thái trên đất liền và các vùng ven biển được UNESCO công nhận (2000 – 2005) [10].

KDTSQ có chức năng:

- Bảo tồn: Đóng góp vào việc bảo tồn đa dạng cảnh quan, hệ sinh thái loài và vốn gene di truyền.
- Phát triển: Thúc đẩy phát triển kinh tế dựa trên cơ sở bền vững môi trường và văn hóa.
- Trợ giúp: Nghiên cứu, giám sát, đào tạo và giáo dục về bảo tồn và phát triển bền vững địa phương, quốc gia, khu vực và quốc tế [10].

Do áp lực từ các hoạt động kinh tế để đáp ứng nhu cầu phát triển đất nước và vấn đề tăng dân số, các vấn đề về môi trường đang trở nên ngày càng nghiêm trọng, làm thay đổi cảnh quan và các hệ sinh thái, làm giảm đi rõ rệt sự đa dạng số loài động thực vật. Sự suy giảm đa dạng sinh học lại đang tác động trở lại đối với cuộc sống con người như ảnh hưởng đến nguồn lương thực thực phẩm, dược liệu, nguyên vật liệu... Vai trò của đa dạng sinh học trong cuộc sống con người là không thể thay thế được [9].

Mỗi khu dự trữ sinh quyển là địa điểm lý tưởng cho việc nghiên cứu các hệ sinh thái tự nhiên. Các vùng lõi và vùng đệm của các KDTSQ đang được xem như các phòng thí nghiệm sống về đa dạng sinh học cho các vùng địa lý sinh học chính trong nước và quốc tế, là môi trường quan trọng để bảo tồn các loài sinh vật bản địa tạo kho lưu trữ quỹ gene phong phú phục vụ nghiên cứu khoa học và đời sống, giúp cho việc hợp tác giải quyết các vấn đề về quản lý tài nguyên thiên nhiên. Việc khai thác bền vững KDTSQ còn giúp tạo việc làm và tăng thêm thu nhập cho người dân địa phương [9].

Ngoài ra, các KDTSQ cũng đang góp phần quan trọng trong sự cân bằng sinh thái như hạn chế xói lở, làm cho đất đai màu mỡ, điều hoà khí hậu, hoàn thiện các chu trình dinh dưỡng, hạn chế ô nhiễm nước và không khí và còn nhiều chức năng khác nữa.

Do đó, các KDTSQ là mô hình tốt cần được nhân lên ở nhiều nơi.

2.1.2. Khu dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ

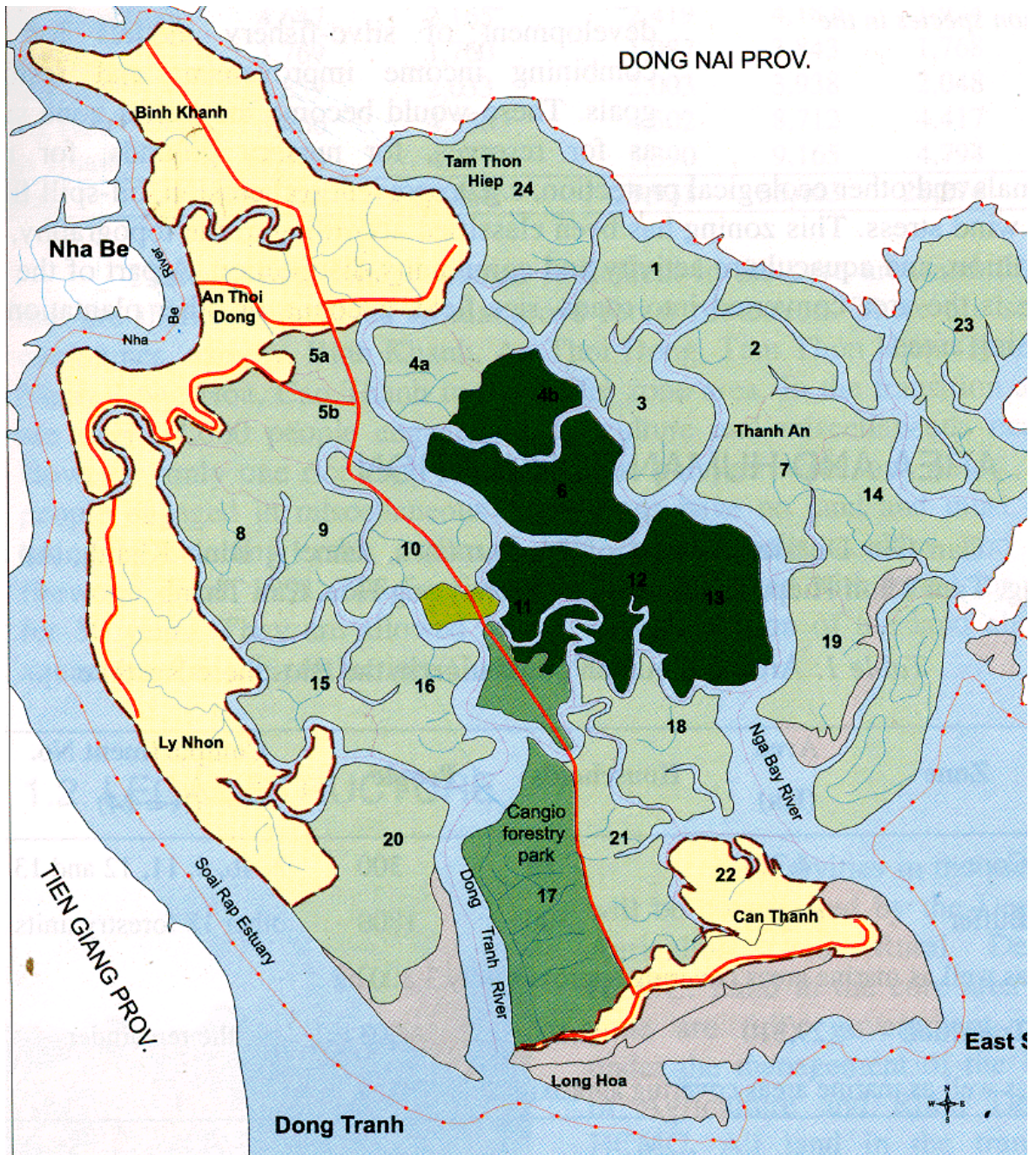
- Tên chính thức: Khu dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ TP. Hồ Chí Minh.
- Tên ngắn gọn: Khu dự trữ sinh quyển Cần Giờ.
- Tọa độ địa lý: Khu bảo tồn nằm hoàn toàn trong địa giới hành chính huyện với tọa độ địa lý:

Vĩ độ Bắc: $10^{\circ}22'14'' - 10^{\circ}37'39''$




Kinh độ Đông: $106^{\circ}46'12'' - 107^{\circ}00'59''$

Phía Bắc giáp tỉnh Đồng Nai, phía Nam giáp biển Đông, phía Tây giáp tỉnh Tiền Giang và Long An, phía Đông giáp Bà Rịa – Vũng Tàu [20].

- Ngày được UNESCO công nhận: 21/01/2000 [10].
- Tổng diện tích: 71.370 ha, trong đó diện tích rừng và đất liền là 3.8664 ha (chiếm khoảng 54,2%) [6].
- Dân số: 57.403 người, chủ yếu làm nghề đánh bắt và nuôi trồng thủy sản [6].



Ghi chú:

| | |
|---|------------------|
|  | Vùng lõi |
|  | Vùng đệm |
|  | Vùng chuyển tiếp |

Hình 2.1. Bản đồ khu dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ [9]

Cách trung tâm thành phố 30 km theo hướng Đông Nam, rừng ngập mặn Cần Giờ (còn gọi là rừng Sác) có giá trị trong việc cải thiện môi trường sinh thái cảnh quan cho thành phố Hồ Chí Minh và các vùng lân cận. Rừng ngập mặn cần Giờ vừa là “lá phổi xanh” vừa là “quả thận” quý giá của thành phố. Nó giúp hấp thụ lượng khí CO₂ khổng lồ từ các khu công nghiệp trọng điểm, là khu lọc nước thải từ các thành phố công nghiệp trong thượng nguồn hệ thống sông Đồng Nai – Sài Gòn đổ ra biển Đông [6]. Rừng còn có tác dụng trữ nước trong mùa mưa, đến mùa hạn, nước từ rừng ngập mặn ở cửa sông chảy ra, ngăn sự xâm nhập mặn vào hồ Dầu Tiếng gây ảnh hưởng đến nguồn nước sinh hoạt của thành phố [21]. Ngoài ra, Rừng ngập mặn Cần Giờ nằm trong một thành phố công nghiệp, đông dân nên thuận lợi để phát triển du lịch sinh thái, giáo dục, hợp tác Quốc tế, góp phần tạo việc làm, nâng cao đời sống nhân dân địa phương.

Theo Ủy ban Quốc gia Con người và Sinh quyển Việt Nam (MAB), Rừng ngập mặn Cần Giờ được xem là khu rừng phục hồi đẹp nhất và duy nhất ở Đông Nam Á sau khi bị chất độc hóa học hủy diệt gần như toàn bộ trong thời gian chiến tranh (UNESCO/ MAB, 2000) [10].

Trước chiến tranh, Rừng ngập mặn Cần Giờ có diện tích khoảng 40.000 ha; tán rừng dày với các quần thể cây rừng chịu mặn, lợ có chiều cao trung bình trên 20m, đường kính 25 – 40 cm. Đước đôi (*Rhizophora apiculata*) là loài chiếm ưu thế, cùng với các quần thể khác như Mắm trắng (*Avicennia alba*), Đàng (*Rhizophora mucronata*), Vẹt (*Bruguiera* spp), Xu (*Xylocarpus* spp), Cóc (*Lumnitzera* spp), Chà là (*Phoenix paludosa*), Giá (*Excoecaria agallocha*)...[6]

Trong các thời kì chiến tranh chống Pháp, Mỹ, Rừng Sác là cửa ngõ đường thủy yết hầu của thủ đô Sài Gòn (chính quyền cũ). Nhân dân và bộ đội đặc công Rừng Sác anh hùng là nỗi kinh hoàng của bọn xâm lược. Bọn xâm lược rút ra kết luận: còn Rừng Sác thì Sài Gòn không ổn định, tồn tại. Cho nên, với các phương tiện chiến tranh hiện đại, Mỹ quyết tâm “lột da” Rừng Sác. Từ năm 1964 đến 1970, Mỹ đã rải liên tục xuống khu rừng này hàng chục ngàn tấn bom đạn, hàng triệu lít

hóa chất khai hoang. Rừng Cần Giờ bị hủy diệt hoàn toàn, bị biến thành “sa mạc mặn” bình địa. Các loài cây như đước, đưng gần như biến mất, chỉ còn các loài Sam biển (*Sesuvium portulacastrum* L.), Cóc kèn (*Derris trifoliata* Lour), Muồng biển (*Impomea pescaprae* (L.), R.BS. Roth), Chà là dại (*Phoenix paludosa* Roxb) và các loài cây bụi thưa thớt, kém giá trị sinh sống [6].

Sau ngày giải phóng 30/4/1975, năm 1978, Thành ủy và Ủy ban nhân dân thành phố Hồ Chí Minh đã thành lập lâm trường Duyên Hải (đóng tại Cần Giờ, thuộc ty Lâm nghiệp) với nhiệm vụ khôi phục lại hệ sinh thái ngập mặn Cần Giờ. Sau 22 năm, Rừng sinh thái ngập mặn Cần Giờ đã bắt đầu hình thành và phát triển theo hướng đa dạng sinh học với cây trồng chủ yếu là cây đước. Diện tích rừng đã phủ xanh hơn 31.000 ha, trong đó có gần 20.000 ha rừng trồng, hơn 11.000 ha được khoanh nuôi tái sinh và các loại rừng khác [6].

Khu dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ có tính đa dạng sinh học cao.

- Hệ thực vật: có trên 158 loài thực vật thuộc 76 họ, thành phần loài chủ yếu là thực vật ngập mặn thật sự: Đước đôi (*Rhizophora apiculata*), Dà quánh (*Ceriops decandra*), Giá (*Excoecaria agallocha*)...; và thực vật gia nhập rừng ngập mặn: Tâm mộc nam (*Cordia cochinchinensis*), Tra lâm vồ (*Thespesia populnea*)... [20]. Hiện nay, các quần xã thực vật rừng thứ sinh điển hình ở rừng ngập mặn Cần Giờ thường thấy gồm [6]:

- Quần xã Mắm trắng (*Avicennia alba*), Bần trắng (*Sonneratia alba*) phân bố ở cửa sông ven biển, trên đất bùn nhão ngập triều hàng ngày.
- Quần xã Đước đôi (*Rhizophora apiculata*), Mắm đen (*Avicennia officinalis*) phân bố trên đất bùn chặt mới ổn định, ít ngập triều, nước lợ.
- Quần xã Đước thuần loại – cây bụi, cây Đước chiếm ưu thế: là rừng trồng mới, phân bố trên nền đất ẩm chặt, ổn định, ngập triều 1 – 2 lần/ tháng, nước lợ.

- Quần xã Đước đôi, Dà vôi (*Ceriops tagal*), Vẹt dù (*Bruguiera gymnorrhiza*) phân bố trên đất chặt, ngập triều 1 – 2 lần/ năm.
- Quần xã Dà vôi, Giá (*Excoecaria agallocha*), Cóc trắng (*Lumnitzera racemosa*), Chà là (*Phoenix paludosa*), Bần chua (*Sonneratia caselaris*) phân bố trên đất cứng chặt, ít ngập triều.
- Quần xã Chà là, Ráng (*Acrostichum aureum*), Lức (*Pluchea indicas*), Dừa lá (*Nypa fruticosa*) phân bố trên đất cứng khô, ít ảnh hưởng bởi thủy triều.

- Hệ động vật: gồm [20]:

- Khu hệ động vật không xương sống: có trên 70 loài thuộc 44 họ, 19 bộ, 6 lớp, 5 ngành như: Tôm sú (*Penaeus monodon*), Cua biển (*Scylla serrata*)...
- Khu hệ cá: có trên 137 loài thuộc 39 họ, 13 bộ như: cá Dứa (*Pangasius polyuranodon*), cá Thòi lòi (*Periophthalmus schlosseri*)...
- Khu hệ lưỡng thê và bò sát: có 9 loài lưỡng thê, 31 loài bò sát như: cá sấu Hoa Cà (*Crocodylus porosus*), Kỳ đà nước (*Varanus salvator*)...
- Khu hệ thú: có 19 loài thuộc 13 họ, 7 bộ, trong đó có một số loài quý hiếm nằm trong sách đỏ Việt Nam và thế giới như: Mèo rừng (*Felis bengalensis*), Rái cá vuốt bé (*Aonyx cinerea*), Dơi nghệ (*Scotophilus heathii*)...
- Khu hệ chim: có khoảng 150 loài thuộc 47 họ, 13 bộ, trong đó số lượng loài chim nước chiếm trên 50% như: cò Lạ Ấn Độ (*Mycteria leucocephala*), Choắt lớn mỏ vàng (*Tringa stagnatilis*)...

2.1.3. Cấu trúc Khu dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ

Khu dự trữ sinh quyển Rừng ngập mặn Cần Giờ có tổng diện tích 75.740 ha, gồm 24 tiểu khu và được bao bọc bởi hệ thống sông rạch như: sông Lòng Tàu, sông Soài Rạp, sông Thị Vải. Cấu trúc rừng ngập mặn Cần Giờ được chia làm 3 vùng chính: vùng lõi, vùng đệm, vùng chuyển tiếp với cấu trúc và chức năng chính như sau:

Vùng lõi (4.721 ha):

- Mục tiêu quản lý vùng lõi là bảo tồn đa dạng sinh học, hạn chế các hoạt động của con người.

- Vùng lõi bao gồm các tiểu khu rừng số 3, 4b, 6, 11, 12, 13.

- Các chức năng chính:

- Bảo tồn hệ sinh thái rừng ngập mặn bao gồm rừng trồng và rừng tự nhiên.
- Bảo tồn cảnh quan rừng ngập mặn với các môi trường sống của động vật hoang dã, đặc biệt là chim nước.
- Bảo tồn hệ thống thủy vực, các bãi bồi dọc bờ sông và ven biển nơi kiếm ăn và sinh đẻ của các loài động vật vùng triều.
- Nghiên cứu khoa học về sinh thái và du lịch sinh thái có giới hạn [6].

Vùng đệm (37.339 ha):

- Là vùng có thể tiến hành các hoạt động kinh tế, nghiên cứu, giáo dục và giải trí nhưng không ảnh hưởng đến việc bảo tồn sinh học trong vùng lõi.

- Vùng đệm bao gồm các tiểu khu rừng số 1, 2, 4a, 5, 7, 8, 9, 10, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24.

- Các chức năng chính:

- Góp phần bảo vệ chung vùng lõi của khu dự trữ sinh quyển.
- Tạo thêm không gian cho thú hoang dã như khỉ, rái cá, kỳ đà,... kiếm ăn. Khi các khu vực này trở nên ổn định thì có thể tiến hành bổ sung vào vùng lõi nếu cần thiết.
- Tạo cảnh quan tự nhiên và văn hóa phục vụ cho du lịch sinh thái.
- Các mô hình lâm ngư kết hợp thân thiện với môi trường cũng được ứng dụng trong vùng này cho cư dân địa phương [6].

Vùng chuyển tiếp (29.310 ha):

- Vùng chuyển tiếp còn được gọi là vùng phát triển bền vững, với nhiều điều kiện thuận lợi để phát triển kinh tế, du lịch, kết hợp với giáo dục nâng cao hiểu biết trong cộng đồng.

- Vùng chuyển tiếp bao gồm các khu vực còn lại của huyện Cần Giờ gồm các bãi bồi, khu vực sản xuất nông lâm ngư và khu dân cư dọc theo ven biển Cần Giờ.

- Chức năng chính:

- Đệm xã hội: Các hoạt động sản xuất xảy ra ở đây cung cấp các sản phẩm và dịch vụ cần thiết cho dân địa phương, nhưng vẫn phải đảm bảo sự hài hòa trong mối quan hệ giữa con người và thiên nhiên.
- Đệm mở rộng: Việc quản lý và phát triển vùng này nhằm mục tiêu mở rộng không gian làm môi trường sống cho các loài thú hoang dã từ vùng đệm [6].

2.2. Cây Cóc trắng

- Tên khoa học: *Lumnitzera racemosa* Willd.

- Tên Việt Nam: Cóc trắng.

2.2.1. Phân loại [22]

- Giới: *Plantae* (Thực vật)
- Giới phụ: *Viridaplantae* (Thực vật xanh)
- Ngành: *Tracheophyta*
- Ngành phụ: *Spermatophytina* (Thực vật có hạt)
- Ngành dưới: *Angiospermae*
- Lớp: *Magnoliopsida* (Hai lá mầm)
- Lớp phụ: *Rosidae*
- Bộ chung: *Myrtales*
- Bộ: *Myrtales*
- Họ: *Combretaceae*
- Chi: *Lumnitzera*
- Loài: *racemosa* Willd



Hình 2.2 Cây Cóc trắng

2.2.2. Đặc điểm hình thái cây Cóc trắng

- Nơi sống: Rừng sác Cà Mau, rừng Cần Giờ, Đông Phi Châu, Madagasca, Ấn Độ, Andaman, Srilanka, Myanma, Thái Lan, Malaysia, Philippines, Indonesia, Đài Loan, Nam Bắc Úc Châu, Tân Ghine, Nouvelle Caledonie [18].

- Đặc tính: Cây ngập mặn thật sự (true mangrove), cây thường xanh, ưa sáng, kém chịu nước mặn [16].

- Cơ quan sinh dưỡng:

Rễ: Có khả năng đâm sâu vào lớp mùn dày [18]. Rễ khí thường không phát triển thành hệ rễ trên mặt đất như các cây khác [17]. Tuy nhiên trong môi trường ẩm thấp, rễ khí có thể phát triển thành hệ rễ vòng trên mặt đất dạng mấu rễ nhỏ [16].

Thân: Cây gỗ nhỏ, có thể cao đến 10 m với đường kính 0,3 m, không lông. Thân có nhiều mấu, mọc tua nhiều cành. Cành thẳng đứng và phân nhánh, nhánh thấp. Vỏ ngoài màu nâu với nhiều vết nứt nhỏ, lớp vỏ trong gồm nhiều phiến mỏng và chứa chất nhớt trong [16].

Lá: Lá đơn, màu xanh sáng, mọc cách, lá nhỏ và mỏng nước. Phiến lá hình muống, dài 3 – 7 cm, rộng 2 cm. Chân lá hình nêm, chóp lá tròn hoặc có khía hình chữ v ở đầu lá, bờ lá trơn hoặc gợn sóng nhưng khó thấy. Gân lá khó nhận thấy, có 1 gân sườn và hệ gân hình mắt lưới. Khó phân biệt mặt trên và mặt dưới lá [16].



Hình 2.3 Lá Cóc trắng

- Cơ quan sinh sản:

Hoa: Hoa lưỡng tính, nhỏ, màu trắng, có cuống ngắn, tạo thành gié ngắn 6 – 12 hoa ở nách và ngọn [18]. Hoa mẫu năm, đính trên bầu [16].

- Lá bắc hình trứng, có bờ trơn, sắc, màu xanh, dai như da, rụng sớm.
- 5 đài hoa, lá đài hợp.

- 5 cánh hoa, hình thuôn, dạng mác, sắc, màu trắng, dai như da, dính trên. Cánh xếp đè lên nhau xen kẽ với đài hoa.
- 10 nhị hoa rời, xếp thành hai vòng: 5 nhị phát triển trên đế của cánh hoa, 5 nhị phát triển trên đế của răng lá đài. Chỉ nhị dài 0,5 cm, dính gốc, tròn, mềm, màu trắng, bao phấn có 2 thùy hướng ra ngoài.
- Một lá noãn, bầu nhụy hạ dài 1 cm, một buồng chứa noãn, 3 noãn, không có đầu nhụy [16].



Hình 2.4. Hoa Cóc trắng

Trái: Trái nạc có 1 hạt hình trứng thuôn, dài 1 – 2 cm, màu xanh hơi vàng, mặt bóng, vỏ trái cứng như Bần trắng (*Sonneratia alba*). Hạt phát tán bởi nước, gió. Hạt nảy mầm dưới đất hay trên mặt đất [16].



Hình 2.5. Trái Cóc trắng

- Giá trị kinh tế: Thân cây dùng làm củi đốt, gỗ xây dựng, nguyên liệu giấy, làm than. Vỏ cây chứa 19% tanin dùng nhuộm lưới và thuộc da. Dịch từ thân cây được cho là có tác dụng trị mụn giộp (herpes) và ngứa (itches) [16].

2.3. Các phương pháp dùng trong nghiên cứu tính đa dạng di truyền

2.3.1. Phương pháp tách chiết DNA ở thực vật

Trong các thao tác tiến hành để nghiên cứu tính đa dạng di truyền thì phương pháp tách chiết DNA là một trong những khâu quan trọng, giúp đảm bảo có đủ lượng DNA có chất lượng cao để tiến hành các bước nghiên cứu tiếp theo. Ở tế bào thực vật, ngoài màng tế bào còn có lớp thành cellulose vững chắc bao bọc. Do đó, việc tách DNA từ tế bào thực vật có những khó khăn, phức tạp nhất định và thường gồm ba bước cơ bản sau [4]:

- Bước 1: Phá màng tế bào và màng nhân

Nghiền các mô, tế bào bằng biện pháp cơ học: nghiền trong đá khô, nitơ lỏng bằng cối, chày sứ để phá vỡ thành cellulose, giải phóng các thành phần trong tế bào [4].

Sử dụng đệm có chất tẩy (CTAB) để phá vỡ màng bào, giải phóng DNA.

Sử dụng các loại hóa chất (phổ biến là EDTA) để bảo vệ DNA khỏi sự phân hủy của các enzyme nuclease nội bào [3].

- Bước 2: Loại tạp.

Mẫu được lắc thật mạnh trong dung dịch có các hóa chất như: chloroform, isoamyl alcohol, phenol... giúp biến tính protein để loại protein mà không hòa tan acid nucleic. Protein bị biến tính sau khi ly tâm tủa thành 1 lớp nằm giữa pha nước và pha hóa chất. Pha nước chứa acid nucleic được thu nhận lại [4].

- Bước 3: Tủa acid nucleic.

Mục đích của việc tủa là nhằm thu nhận acid nucleic dưới dạng cô đặc để bảo vệ chúng khỏi sự phân hủy của các enzyme và có thể hòa tan chúng lại theo nồng độ mong muốn [4].

Có thể tủa bằng ethanol hoặc isopropanol nhưng isopropanol phổ biến hơn. Acid nucleic sẽ được thu nhận lại bằng ly tâm. Sau đó, cặn tủa được rửa trong ethanol 70% để loại muối hoặc isopropanol còn dính lại trên mẫu [3].

2.3.2. Định lượng và xác định độ tinh sạch của DNA

Để xác định mức độ tinh sạch và hàm lượng DNA thu được sau khi tách chiết, người ta dùng phương pháp đo quang phổ và phương pháp điện di.

2.3.2.1. Phương pháp đo quang phổ

Phương pháp đo quang phổ cho phép ước lượng tương đối nồng độ acid nucleic có trong mẫu [3].

Nguyên tắc: Phương pháp dựa vào sự hấp thụ mạnh ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 260 nm của các base purine và pyrimidine. Giá trị mật độ quang ở bước sóng 260 nm (Optical Density – OD_{260nm}) cho phép xác định nồng độ DNA trong mẫu dựa vào tương quan sau:

- $A_{260nm} = 1 = 50 \mu\text{g/ml}$ DNA mạch kép.
- $A_{260nm} = 1 = 33 \mu\text{g/ml}$ DNA mạch đơn.
- $A_{260nm} = 1 = 40 \mu\text{g/ml}$ RNA [4].

Khi tính nồng độ DNA cần lưu ý hệ số pha loãng của dịch chiết. Công thức tính chung là:

$$C_{\text{DNA}} = 0,6 \times 50 \times \text{độ pha loãng} [3]$$

Tuy nhiên cách tính này chỉ đúng với các dung dịch acid nucleic sạch. Để kiểm tra độ sạch của dung dịch ly trích, người ta đo thêm giá trị OD ở 280 nm là phổ hấp phụ cực đại của protein.

- Tỷ lệ $A_{260nm}/A_{280nm} = 1,8 - 2$: dịch chiết DNA được coi là tinh sạch.
- Tỷ lệ $A_{260nm}/A_{280nm} \geq 2$: dịch chiết RNA được coi là tinh sạch [4].

2.3.2.2. Phương pháp điện di

Phương pháp được sử dụng cả trong phân tích định tính và trong thu nhận mẫu acid nucleic [3].

Nguyên tắc: Phương pháp dựa vào đặc tính cấu trúc của acid nucleic là phân tử tích điện âm đồng đều trên khắp bề mặt, do đó chúng sẽ di chuyển về cực dương khi chịu tác động của điện trường [4].

Để điện di, ta sử dụng gel agarose hoặc gel polyacrylamide. Việc chọn loại gel và nồng độ gel tùy thuộc vào kích thước đoạn cần phân tách (xem Bảng 2.1).

Bảng 2.1. Nồng độ gel và kích thước đoạn cần phân tách [3]

| % acrylamide | <u>Kích thước đoạn cần phân tách</u> |
|--------------|--------------------------------------|
| | (cặp nucleotide) |
| 4 | 200 – 800 |
| 5 | 80 – 200 |
| 8 | 40 – 100 |
| 11 | 10 – 50 |

| % agarose | <u>Kích thước đoạn cần phân tách</u> |
|-----------|--------------------------------------|
| | (kb) |
| 0,6 – 0,8 | 1 – 20 |
| 0,9 – 1,2 | 0,5 – 7 |
| 1,2 – 1,5 | 0,2 – 5 |

Sau khi điện di, tiến hành nhuộm bản gel với Ethidium Bromide và đọc kết quả dưới tia UV (Ultra Violet).

- Phổ điện di acid nucleic đã tách chiết là dải rộng hoặc nhiều vạch là do acid nucleic bị gãy đoạn nhiều hoặc có lẫn tạp [4].

- Phổ điện di là băng gọn, rõ chứng tỏ mẫu ly trích không bị lẫn tạp [4].

2.3.3. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Khái niệm:

Kỹ thuật PCR (phản ứng chuỗi trùng hợp – Polymerase Chain Reaction), được Karry Mullis và cộng sự phát minh năm 1985, là kỹ thuật tổng hợp nhân tạo các đoạn DNA với tốc độ nhanh, độ chính xác cao và được thực hiện trong máy chu trình nhiệt (máy PCR). Nhờ kỹ thuật PCR mà với lượng nhỏ DNA mẫu ban đầu ta có thể thu được đủ lượng DNA cần thiết để tiến hành các thí nghiệm về DNA. Cho đến nay, kỹ thuật PCR được coi là phương pháp nền tảng quan trọng của công nghệ di truyền [4].

Nguyên tắc:

Kỹ thuật tổng hợp DNA ngoài cơ thể cũng tuân thủ những nguyên tắc cơ bản của sao chép DNA trong cơ thể. Tuy nhiên, PCR dùng nhiệt độ cao (94°C) để tháo xoắn DNA, kết hợp với enzyme DNA polymerase chịu nhiệt và hệ thống điều nhiệt thích hợp cho từng giai đoạn của phản ứng tổng hợp cùng với các đoạn primer được thiết kế chủ động [4].

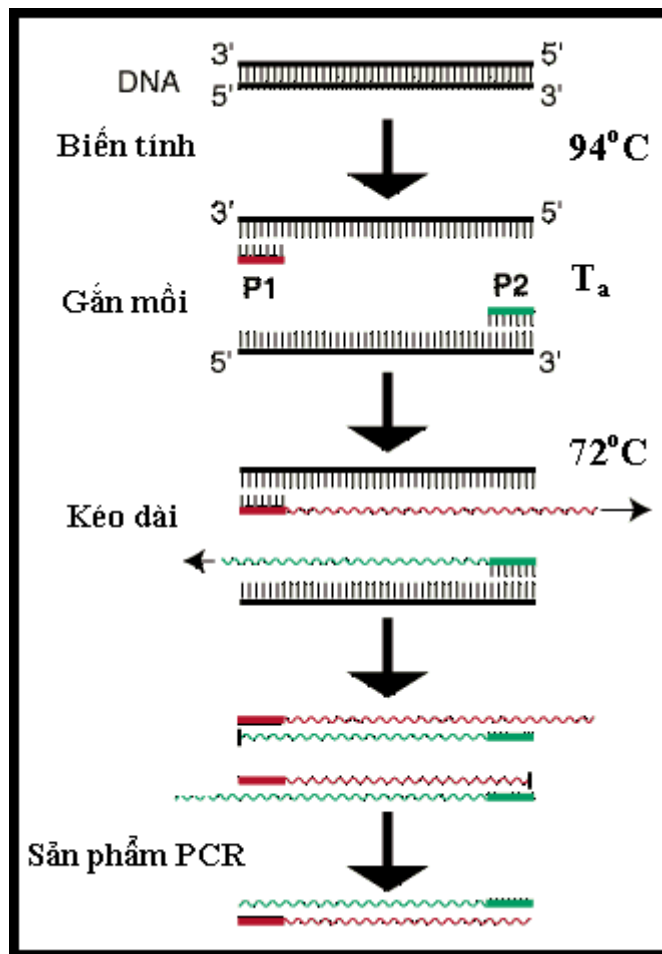
PCR là một chuỗi nhiều chu kỳ (cycle) nối tiếp nhau, mỗi chu kỳ gồm 3 bước:

- Bước 1: Biến tính (denaturing). Nhiệt độ 94 – 95°C, DNA mẫu bị biến tính từ sợi kép thành sợi đơn.

- Bước 2: Gắn primer (annealing). Nhiệt độ 50 – 60°C, cặp primer gắn chuyên biệt vào sợi DNA đích (sợi đơn).

- Bước 3: Kéo dài (extending). Nhiệt độ 72°C, là nhiệt độ thích hợp cho Taq polymerase hoạt động giúp tổng hợp sợi DNA mới từ primer [8].

Kết quả cuối cùng là đoạn DNA khuôn mẫu được khuếch đại lên gấp nhiều lần (xem hình 2.6) với tổng số DNA khuếch đại là $m \times 2^n$ (với m là số DNA đích ban đầu và n là số chu kỳ) [3].



Hình 2.6. Các bước cơ bản của phản ứng PCR

Các chỉ tiêu ảnh hưởng đến phản ứng PCR [3]:

- DNA mẫu: Phản ứng khuếch đại tối ưu xảy ra trên DNA thật tinh sạch, nhưng nhiều kỹ thuật chẩn đoán bằng PCR vẫn đạt kết quả tốt với DNA lấy trực tiếp từ dịch chiết tế bào. PCR còn cho phép khuếch đại những mẫu DNA không được bảo quản tốt, đã bị phân hủy từng phần như: vết máu để lâu, tinh dịch đã khô, hóa thạch...

- Enzyme: Sử dụng enzyme không bị phá hủy ở nhiệt độ biến tính và xúc tác sự tổng hợp từ đầu đến cuối quá trình phản ứng để giảm bớt sự phức tạp trong thao tác và cho hiệu quả khuếch đại cao hơn.

- Primer và nhiệt độ lai: Primer là chỉ tiêu quan trọng nhất để đạt sự khuếch đại đặc trưng và hiệu quả cao. Việc chọn primer phải tuân thủ một số nguyên tắc sau:

- Trình tự primer được chọn sao cho không có sự bắt cặp giữa primer “xuôi” và “ngược”, không xuất hiện cấu trúc “kẹp tóc” (các phần khác nhau của một primer bắt cặp với nhau).
- Tm của primer xuôi và ngược không cách biệt quá xa, tránh các cặp GC lặp lại nhiều lần.
- Primer đặc trưng cho trình tự DNA cần khuếch đại, không trùng các trình tự lặp lại trên gene.
- Trình tự khuếch đại không quá lớn (≤ 1 kb).

- Các thành phần khác: Nồng độ bốn loại dNTP không quá 20 – 200 μ M/ mỗi loại Nu. Nồng độ cao hơn dễ dẫn đến hiện tượng “kí sinh”. Sự mất cân bằng thành phần các Nu làm tăng lỗi sao chép của polymerase. Nồng độ Mg^{++} cũng ảnh hưởng mạnh đến quá trình PCR

- Số lượng chu kỳ của phản ứng PCR: Số chu kỳ cho 1 phản ứng tùy thuộc lượng mẫu ban đầu. Số chu kỳ không quá 40 chu kỳ. Nếu vượt quá, hiệu quả khuếch đại giảm hẳn do:

- Sự phân hủy và cạn kiệt các thành phần của phản ứng.
- Xuất hiện sản phẩm phụ ức chế phản ứng.
- Các bản sao vừa được tổng hợp bắt cặp với nhau

Ứng dụng: PCR được sử dụng rất phổ biến trong các lĩnh vực sinh học với các ứng dụng như:

- Sản xuất mẫu dò [7].
- Tách nhanh chóng, chính xác từng gene, từng đoạn DNA riêng biệt [7].

- Là kỹ thuật nền cho các nghiên cứu di truyền phân tử như: xác định trình tự gene, đa hình DNA, xác định marker phân tử cho chọn giống, phát hiện đột biến gene [7]
- Xác định giới tính động vật ở giai đoạn phôi thai [4].
- Chẩn đoán nhanh, nhạy các bệnh di truyền, bệnh nhiễm trùng (virus, vi khuẩn, nấm...) [7].
- Khôi phục gene của các sinh vật cổ cách đây hàng triệu năm [4].
- Xác định nguồn gốc hài cốt, quan hệ họ hàng, xác định cá thể dùng trong việc xác định huyết thống, trong khoa học hình sự [4].

2.3.4. Các marker phân tử trong nghiên cứu đa dạng di truyền

DNA marker là những chỉ thị được tạo ra nhờ các phương pháp cắt DNA bằng enzyme giới hạn (restriction enzyme) hoặc qua PCR. Các chỉ thị phân tử này có thể liên kết với một gene nào đó trên nhiễm sắc thể.

Dựa vào kỹ thuật thực hiện, DNA marker được chia làm hai nhóm:

- Marker dựa vào phương pháp lai DNA: RFLP.
- Marker dựa vào phương pháp PCR: RAPD, SSR, AFLP...[5]

2.3.4.1. Microsatellite/ SSR (Simple Sequence Repeat)

Nguyên lý:

Kỹ thuật này dựa vào nguyên lý là giữa các giống khác nhau có một đoạn DNA ổn định và chuyên biệt có trình tự đơn giản gồm khoảng 2 – 6 Nus được lặp lại nhiều lần (simple sequence repeat). Thực hiện phản ứng PCR dùng các primer chuyên biệt để nhân bản đoạn DNA này lên. Điều quan trọng là phải biết được những trình tự lặp lại chuyên biệt này để thiết kế primer cho từng giống. Kỹ thuật SSR có độ tin cậy cao, chủ yếu được dùng để định danh những giống hay những loài rất gần nhau về mặt di truyền [1].

Các bước thực hiện: Gồm bốn bước:

- Bước 1: Tách chiết và tinh sạch DNA của các mẫu nghiên cứu.
- Bước 2: Thực hiện phản ứng PCR với các primer đặc trưng cho các đoạn lặp đơn giản.
- Bước 3: Điện di và đọc kết quả trên gel polyacrylamide. Tính toán số liệu, xác định mức độ giống và khác nhau giữa các đoạn lặp DNA.
- Bước 4: Xử lý số liệu bằng các phần mềm Map Marker Program, SYSTAT, NTSYSpc v.v... lập bản đồ di truyền và dựng cây phát sinh chủng loại [4].

Ưu nhược điểm của kỹ thuật SSR:

- Ưu điểm:

- Là loại marker chính xác và hữu hiệu trong nghiên cứu đa dạng di truyền, phân loại giống.
- Dùng để xây dựng bản đồ liên kết, phân lập gene, xác định quan hệ di truyền, chẩn đoán cặp cho ưu thế lai.
- Đơn giản, không tốn kém, dễ thực hiện [2].

- Nhược điểm:

- Phải qua nhiều bước tiến hành.
- Cần thiết kế cặp primer chính xác [2].

Ứng dụng:

- Thiết kế bản đồ gene trong di truyền.
- Chọn lọc giống bằng SSR.
- Đa dạng hóa các vật liệu di truyền [4].

2.3.4.2. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

(Đa hình về độ dài của các đoạn nhân chọn lọc).

Khái niệm:

AFLP là kỹ thuật dấu vân tay DNA tương đối mới (Vos và cộng sự, 1995) kết hợp độ tin cậy của RFLP với sức mạnh của PCR. RFLP (Southern, 1975; Botstein và cộng sự, 1980) phát hiện sự biến đổi vị trí cắt của enzyme cắt giới hạn trong bộ gene. PCR khuếch đại trình tự DNA mẫu. Những dấu vân tay AFLP là nguồn đa hình (polymorphism) phong phú, thuật ngữ gọi là chỉ thị AFLP. Đây là phương pháp có độ nhạy cao và có thể tiến hành với DNA tổng số hoặc cDNA [11].

Nguyên lý:

Kỹ thuật AFLP dựa trên nguyên tắc là sử dụng kỹ thuật PCR để nhân bản các đoạn DNA đã bị cắt bởi enzyme giới hạn. Khâu quan trọng của kỹ thuật này là thiết kế các primer đặc trưng, được thực hiện bằng cách cắt DNA mẫu bằng hai enzyme cắt giới hạn. DNA bị cắt thành nhiều đoạn có kích thước khác nhau nhưng trình tự Nu ở hai đầu đoạn cắt giống nhau và đã xác định. Dựa vào trình tự đã biết ở hai đầu cắt, ta thiết kế các đoạn oligonucleotide ngắn (adapter) và gắn chúng vào hai đầu cắt. Dựa vào trình tự adaptor, thiết kế primer PCR gồm hai phần: phần có trình tự bổ sung với adapter và phần có 1 – 3 Nu tùy ý và tiến hành phản ứng PCR [5].

Các bước thực hiện: Gồm năm bước cơ bản:

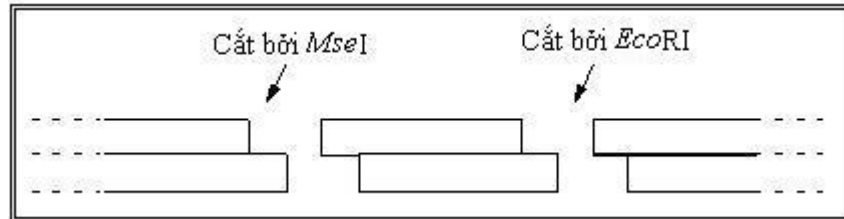
- Bước 1: Ly trích DNA.

Điều kiện tiên quyết cho phản ứng AFLP là DNA sạch và không bị gãy [11].

- Bước 2: Cắt DNA bằng enzyme giới hạn.

Sử dụng hai enzyme cắt giới hạn:

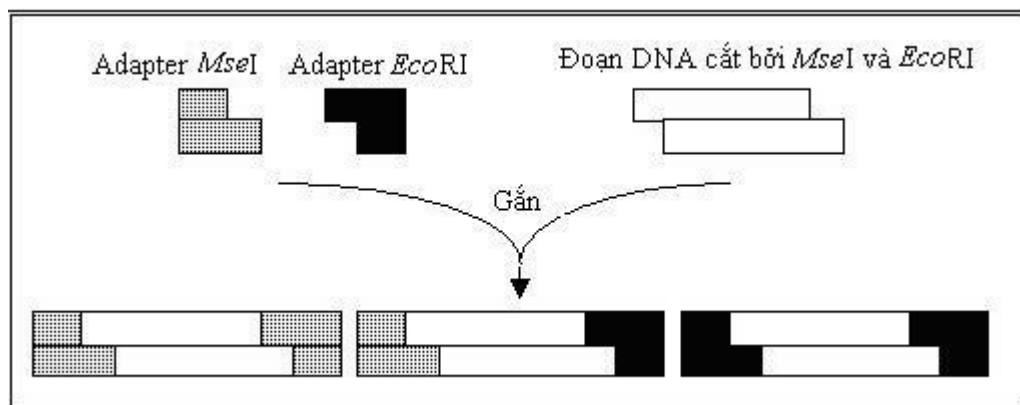
- Một enzyme có trình tự cắt thông thường (*MseI* có vị trí 4 cắt): tạo những đoạn cắt nhỏ, chúng sẽ được khuếch đại tốt và có phạm vi kích thước tối ưu khi phân tách trên gel [11].
- Một enzyme có trình tự cắt hiếm (*EcoRI* có vị trí 6 cắt): giới hạn số lượng đoạn cắt được khuếch đại [11].



Hình 2.7. Cơ chế cắt của hai enzyme [14]

- Bước 3: Nối đoạn DNA với các adapter (trình tự tiếp hợp).

Adapter chứa một trình tự lỗi và một trình tự chuyên biệt thích hợp để nối vào đầu đoạn cắt (chuyên biệt cho một trong hai vị trí cắt *MseI* hoặc *EcoRI*). Trình tự lỗi của adapter chứa một đoạn DNA khoảng 20 Nu đã biết trình tự, chúng sẽ được dùng để thiết kế primer trong phản ứng PCR. Sự cắt giới hạn và nối adapter thường tiến hành trong một phản ứng [11].

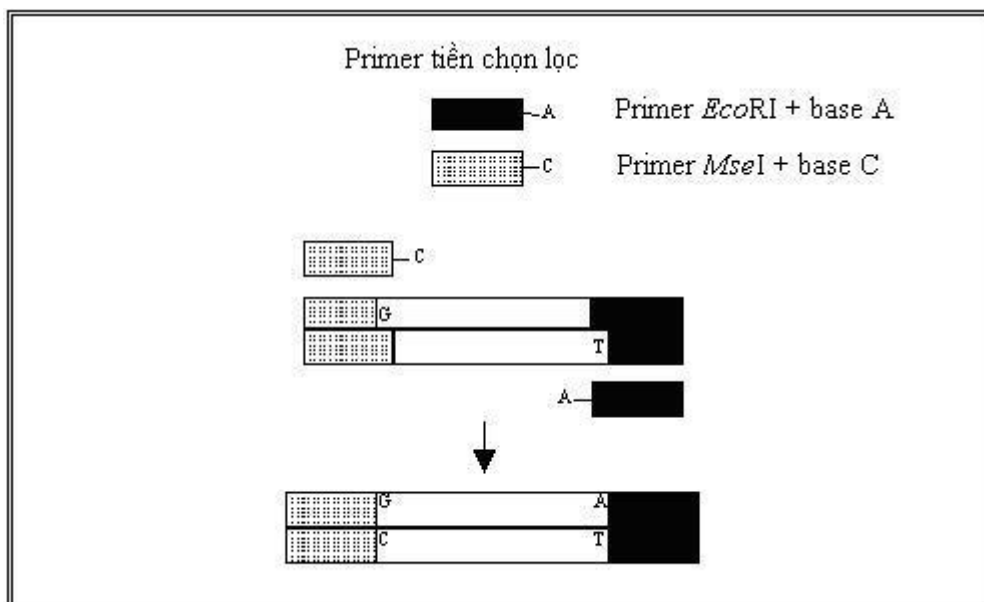


Hình 2.8. Cơ chế gắn của 2 adapter *MseI* và *EcoRI* [14]

- Bước 4: Khuếch đại các đoạn cắt giới hạn.

DNA được khuếch đại qua 2 giai đoạn:

- Giai đoạn 1: Giai đoạn khuếch đại tiền chọn lọc (preselective amplification). Khuôn mẫu là các DNA đã gắn adapter ở bước 3, sử dụng primer tiền chọn lọc là DNA mạch đơn có trình tự bổ sung với trình tự của adapter có thêm 1 Nu ở đầu 3' [5].



Hình 2.9. Cơ chế khuếch đại tiền chọn lọc [14]

- Giai đoạn 2: Giai đoạn khuếch đại chọn lọc (selective amplification). Khuôn mẫu là các DNA ở giai đoạn 1, sử dụng primer chọn lọc có trình tự tương tự primer tiền chọn lọc và có thêm 2 – 3 Nu ở đầu 3'.
- Bước 5: Phân tích sản phẩm PCR bằng điện di và xử lý số liệu bằng phần mềm thông dụng để đánh giá sự khác biệt di truyền và đa dạng sinh học của mẫu nghiên cứu [11].

Sự chọn lọc ở đây có ý nghĩa:

- Chỉ những trình tự DNA nào có gắn với adapter mới được khuếch đại.
- Sự khuếch đại tiền chọn lọc giúp chọn lọc bước đầu các trình tự DNA cần được khuếch đại.
- Sự khuếch đại chọn lọc giúp chọn lọc chặt chẽ hơn các trình tự DNA cần được khuếch đại.

- Chạy điện di các đoạn được khuếch đại trên gel polyacrylamide [5].

Ưu và nhược điểm:

- Ưu điểm:

- Lượng DNA cần dùng ít.
- Tạo nhiều băng khuếch đại – khả năng tạo đa hình cao, chỉ thị phân tử cho lượng thông tin cao.
- Kết quả có độ tin cậy cao, có khả năng lặp lại.
- Không cần biết trước trình tự bộ gene hoặc sử dụng đầu dò.
- Rất hữu dụng trong việc tạo nhanh bản đồ gene [5].

- Nhược điểm

- Tạo lượng lớn thông tin và cần phân tích trên máy vi tính.
- Đòi hỏi có chuyên môn, kỹ thuật trong phòng thí nghiệm và đặc biệt trong phân tích số liệu [5].

Ứng dụng: Kỹ thuật AFLP có rất nhiều ứng dụng:

- Sử dụng chỉ thị AFLP trong nghiên cứu di truyền:

- Nghiên cứu đa dạng di truyền.
- Phân tích sự tổng hợp chất mầm (germ plasm).
- Kiểu di truyền của cá thể và phân tích khoảng cách di truyền.
- Xác định chỉ thị DNA liên kết gần.

- Xác định cấu trúc của bản đồ chỉ thị DNA di truyền.

- Xác định cấu trúc của bản đồ thực thể sử dụng tách dòng nuôi cấy gene như YACs và BACs.

- Sử dụng AFLP trong tạo bản đồ chính xác của gene, và các bước phân lập tiếp theo của những gene này.

- Tạo “dữ liệu phiên mã” (transcript profiling) dùng phân tích biểu hiện gene [12].

2.3.4.3. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

(Đa hình của các đoạn nhân ngẫu nhiên)

Khái niệm:

RAPD là đoạn ngắn trình tự DNA được tổng hợp một cách ngẫu nhiên, giúp phân tích bộ gene dựa vào kỹ thuật phân tích PCR. Kỹ thuật RAPD ra đời sau RFLP, tuy khả năng tạo đa hình tương đương với RFLP nhưng quy trình đơn giản hơn, chi phí thấp và thu kết quả nhanh hơn. Do tính hiệu quả nên RAPD nhanh chóng có vị trí xứng đáng trong nghiên cứu đa dạng di truyền [5].

Nguyên lý:

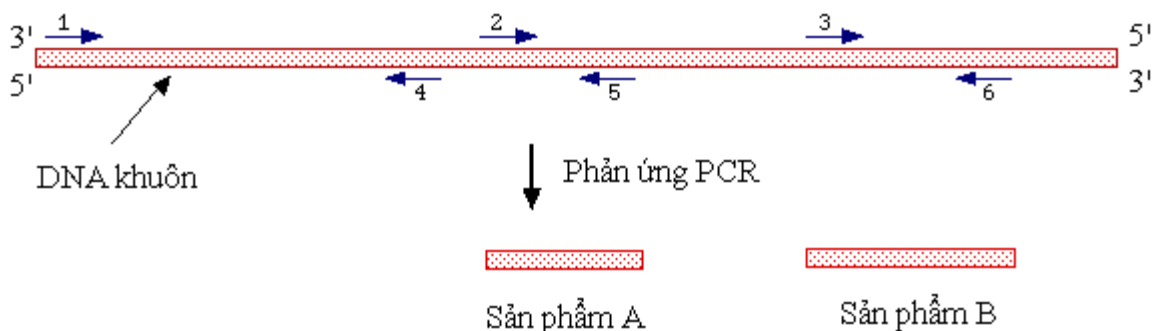
Phương pháp này xác định sự đa dạng về kích thước các đoạn DNA sau khi thực hiện PCR mẫu DNA thí nghiệm với các primer tổng hợp đơn, ngắn, dãy mã được thiết kế ngẫu nhiên mà không cần biết trình tự của DNA mẫu [2].

Sau khi bắt cặp tại các vị trí chuyên biệt trên sợi DNA, primer tiến hành sự khuếch đại để tạo ra các đoạn có kích thước khác nhau – có khi lên đến 2kb. Các đoạn có kích thước khác nhau này được nhận biết bằng điện di. Một primer có thể tạo sự đa hình DNA giữa các cá thể, và các đoạn đa hình này có thể được dùng như những marker [2].

Các bước thực hiện: Gồm bốn bước cơ bản [5]:

- Bước 1: Tách chiết, tinh sạch và đánh giá độ tinh sạch của DNA tổng số.
- Bước 2: Thực hiện phản ứng PCR với primer ngẫu nhiên
- Bước 3: Điện di trên gel agarose hoặc gel polyacrylamid.
- Bước 4: Phân tích và đánh giá kết quả đa dạng di truyền bằng các phần mềm thông dụng (NTSYSpc, UPGMA cluster, Gelcompar, lập dendrogram) các số liệu thu được cho thấy sự gần gũi hoặc cách biệt di truyền của các mẫu nghiên cứu.

Có thể tóm tắt kỹ thuật RAPD như sau [14]



Chú thích:

- Các mũi tên biểu thị cho các primer (các primer có trình tự giống nhau và dài khoảng 10 Nu). Chiều mũi tên biểu thị chiều tổng hợp DNA.

- Các số 1 → 6 biểu thị vị trí primer gắn vào DNA khuôn.

Trong trường hợp này có hai sản phẩm được tạo thành:

- Sản phẩm A: Là sản phẩm của sự khuếch đại PCR trình tự DNA nằm giữa hai primer gắn ở vị trí 2 và 5.

- Sản phẩm B: Là sản phẩm của sự khuếch đại PCR trình tự DNA nằm giữa hai primer gắn ở vị trí 3 và 6.

- Không có sản phẩm PCR được tạo bởi hai primer gắn ở vị trí 1 và 4 vì hai vị trí này quá xa nhau nên không thể hoàn thành sự khuếch đại.

- Không có sản phẩm PCR được tạo bởi các primer gắn ở các vị trí 4 và 2, 1 và 3 vì các cặp primer này không có chiều hướng vào nhau [14].

Ưu và nhược điểm:

- Ưu điểm:

- Không đòi hỏi chất lượng DNA mẫu cao, lượng DNA mẫu cần ít.

- Dễ thực hiện, dễ thành công do không cần biết trước trình tự bộ gene của đối tượng cần nghiên cứu.
- Khả năng nhân bản cao.
- Chi phí thực hiện thấp, ít tốn thời gian.
- Thao tác đơn giản, không đòi hỏi trang thiết bị cao (chỉ cần máy PCR và bộ điện di) [5].

- Nhược điểm

- Độ chính xác không cao, kết quả không ổn định.
- Khả năng nhân bản trong phản ứng PCR cao nhưng khả năng xuất hiện đa hình thấp và độ tin cậy không cao [5].

Ứng dụng:

- Nghiên cứu sự đa dạng di truyền.
- Marker phân tử [7].

Chương 3

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Thời gian và địa điểm thực hiện

3.1.1. Thời gian thực hiện

Đề tài được tiến hành từ tháng 04 năm 2007 đến tháng 08 năm 2007.

3.1.2. Địa điểm thực hiện

- Mẫu lá Cóc trắng được thu thập tại Khu dự trữ sinh quyển Rừng ngập mặn Cần Giờ.
- Mẫu lá được ly trích và thực hiện phản ứng RAPD tại Trung tâm Phân tích Thí nghiệm Hóa Sinh trường Đại học Nông Lâm tp. Hồ Chí Minh.

3.2. Vật liệu thí nghiệm

3.2.1. Mẫu lá Cóc trắng

- Địa điểm lấy mẫu: Mẫu lá được thu thập tại một số tiểu khu của Khu dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ.

- Nguyên tắc thu thập mẫu:

- Lấy mẫu theo hai đường chéo xuyên rừng: đường bộ và đường thủy. Lấy mẫu theo khoảng cách, khoảng 800 m lấy một mẫu.
- Xác định vị trí cây lấy mẫu cụ thể trên bản đồ bằng hệ thống định vị toàn cầu GPS (Global Position System).
- Chọn mẫu lá từ những cây có đặc điểm khác biệt như: cây có bệnh, lá bị sâu ăn, có hình dáng, màu sắc các bộ phận khác lạ...
- Chọn mẫu lá còn tốt, lấy cả lá non, lá trưởng thành và lá già, thường ở phần ngọn của cành có thể lấy được cả ba loại lá này.

- Ký hiệu tên mẫu: xxLRyy với xx là tên tiểu khu lấy mẫu và yy là thứ tự mẫu
- Ghi chú tất cả thông tin về mẫu như: tọa độ lấy mẫu, đặc điểm hình thái cây lấy mẫu (xem chi tiết tại bảng 1 phần phụ lục).

- Vận chuyển và bảo quản mẫu: Mẫu sau khi thu thập cho vào bịch nylon, buộc chặt, bảo quản và vận chuyển mẫu trong thùng lạnh. Mẫu được bảo quản trong tủ - 20°C.

3.2.2. Hóa chất thí nghiệm

3.2.2.1. Hóa chất ly trích DNA

| HÓA CHẤT | CÔNG DỤNG | CÁCH PHA |
|---|--|---|
| CTAB (C ₁₉ H ₄₂ NBr, M=364,5 g/mol) | Phá vỡ màng tế bào, màng nhân. | Hòa tan trong nước cất 2 lần ở 65°C. |
| Ethanol 100% | Tủa DNA ở nồng độ muối Sodium acetate cao và nhiệt độ thấp. | Dung dịch gốc. |
| Ethanol 70% | Rửa DNA. | Pha với tỷ lệ 7 thể tích ethanol 100% và 3 thể tích nước cất 2 lần đã hấp tiệt trùng. |
| Isopropanol | Tủa DNA ở nhiệt độ thấp, không cần muối sodium acetate. | Dung dịch gốc. |
| Chloroform | Biến tính protein và các sắc tố có trong mẫu. Tách lớp sau khi ly tâm. | Dung dịch gốc. |
| Isoamyl alcohol | Tránh tạo bọt trong quá trình vortex hay ly tâm tốc độ cao. | Dung dịch gốc. |
| Hỗn hợp Chloroform:isoamyl alcohol (24:1) | Biến tính protein và các sắc tố trong mẫu. Tách lớp sau khi ly tâm, DNA được phóng | Pha với tỷ lệ 24 thể tích chloroform và 1 thể tích isoamyl alcohol. |

| | | |
|--|---|---|
| | thích sẽ nằm trong pha nước ở lớp trên. | |
| EDTA 0,5M ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_3$, M=372,54 g/mol) | Gắn nối các ion hóa trị II (Mg^{++} , Ca^{++} ...) có trong dịch ly trích, ngăn chặn sự hoạt động của các enzyme phân hủy DNA. Các enzyme này hoạt động rất mạnh nếu có sự có mặt của các ion hóa trị II nhất là ion Mg^{++} . | <u>Pha 100 ml:</u> - 18,622 g bột EDTA + 80 ml nước cất 2 lần. Khuấy tan. - Chỉnh pH đạt 8, thêm nước cất 2 lần cho đủ 100 ml. - Hấp $121^\circ C/20$ phút trước khi dùng. |
| Tris-HCl 1M ($C_4H_{12}ClNO_3$, M=157,6 g/mol) | Dung dịch đệm, đảm bảo môi trường ly trích ổn định ở pH = 8. Ở độ pH này DNA ổn định nhất. | <u>Pha 100 ml:</u> - 15,7 g bột tris-HCl + 80ml nước cất 2 lần. Khuấy tan. - Chỉnh pH đạt 8, thêm nước cất 2 lần cho đủ 100 ml. Hấp $121^\circ C/20$ phút trước khi dùng. |
| NaCl 5M (M=58,5 g/mol) | Môi trường đệm thuận lợi cho việc kết tủa DNA. | <u>Pha 100 ml:</u> - 29,25 g NaCl + 100 ml nước cất 2 lần. Khuấy tan. - Hấp $121^\circ C/20$ phút trước khi dùng. |
| TE 10X | Dung dịch Stock. | <u>Pha 100 ml:</u> - 10 ml tris-HCl 1M + 2 ml EDTA 0,5M + 88 ml nước cất 2 lần. Hấp $121^\circ C/20$ phút trước khi dùng. |
| TE 1X | Hòa tan DNA. | <u>Pha 100 ml:</u> 10 ml TE 10X + 90 ml nước cất 2 lần. |
| EB (Extraction Buffer) | Dung dịch ly trích. | <u>Pha 100 ml:</u> - 57 ml nước cất 2 lần + 2 g CTAB (lắc nhẹ trong bồn ủ $65^\circ C$ cho |

| | | |
|---|---|--|
| | | tan, hạn chế tạo bọt). - Thêm vào 28 ml NaCl 5M + 10 ml tris-HCl 1M + 4 ml EDTA 0,5M + 1 ml mercapto ethanol. - Bọc giấy bạc, trữ ở 4°C, tránh ánh sáng trực tiếp. |
| EB (Extraction Buffer) có thêm PVP 2% | Dung dịch ly trích. | <u>Pha 100 ml:</u> - 57 ml nước cất 2 lần + 2 g PVP + 2 g CTAB (lắc nhẹ trong bồn ủ 65°C cho tan, hạn chế tạo bọt). - Thêm vào 28 ml NaCl 5M + 10 ml tris-HCl 1M + 4 ml EDTA 0,5M + 1 ml mercapto ethanol. - Bọc giấy bạc, trữ ở 4°C, tránh ánh sáng trực tiếp. |
| Sodium acetate 3M (CH ₃ COONa, M=82 g/mol) | Dung dịch đệm, làm tăng lực ion trong dịch trích, tạo điều kiện thuận lợi cho DNA kết tủa với ethanol 100% trong điều kiện -20°C. | <u>Pha 100 ml:</u> - 24,6 g bột sodium acetate + 100 ml nước cất 2 lần. Khuấy tan. - Hấp 121°C/20 phút trước khi dùng. |
| β-mercapto ethanol | Bảo vệ DNA. | Dung dịch gốc. |

3.2.2.2. Hóa chất kiểm tra định lượng DNA

- Nước cất 2 lần khử ion (đã hấp khử trùng)
- TE 1X

3.2.2.3. Hóa chất thực hiện phản ứng RAPD

- *Taq* buffer
- *Taq* DNA polymerase
- Nước cất 2 lần khử ion chiếu tia UV
- Primer
- dNTP
- MgCl₂
- DNA mẫu

3.2.2.4. Hóa chất dùng trong điện di và đọc kết quả

- Agarose
- TAE 1X
- TAE 0,5X
- Ladder 100 bp (Invitrogen)
- Loading dye 6X
- Ethidium bromide
- Nước cất siêu sạch khử ion

3.2.3. Trang thiết bị thí nghiệm

- Tủ lạnh các loại (Sanyo – Nhật Bản)
- Nồi hấp Autoclave (ToMy – Nhật Bản)
- Eppendorf 1,5 ml và 0,2 ml (Pháp)
- Pipet các loại (Nichiryo – Nhật Bản)
- Máy hút, tủ cấy vô trùng (Việt Nam - Anh)
- Máy ly tâm lạnh (Hettich – Đức)
- Lò Viba (Electrolux)
- Máy đo hấp thu quang phổ (HP – Mỹ)
- Máy chụp ảnh DNA (Biorad – Thụy Điển)
- Cân điện tử (Ohaus – Mỹ)
- Tủ sấy (Jencons - Anh)
- Đầu tip các loại (Đức)
- Chén và chày giã (Đức)
- Máy Vortex (IKA – Đức)
- Bồn ủ nhiệt (Memmert - Anh)
- Máy điện di (Biorad)
- Máy PCR (PTC 100 - MJ)

3.3. Phương pháp nghiên cứu

3.3.1. Phương pháp ly trích DNA

Trong đề tài nghiên cứu này, nhằm tìm được quy trình ly trích DNA tốt nhất từ lá Cóc trắng, chúng tôi tiến hành ly trích DNA tổng số từ lá Cóc trắng theo 3 quy trình: quy trình ly trích mẫu tươi (Doyle và Doyle (1998)) và 2 quy trình ly trích mẫu cải tiến.

3.3.1.1. Quy trình 1 (quy trình ly trích mẫu tươi Doyle và Doyle (1988))

Quy trình gồm 11 bước:

- Bước 1: Cân 0,15 g lá đã rửa sạch, nghiền lá với 1,2 ml dịch trích EB. Vortex thật kỹ. Ủ dịch ở 65°C trong 45 phút.

- Bước 2: Thêm 500 μl chloroform: isoamyl alcohol (tỷ lệ 24: 1), Vortex kỹ trong 10 phút, ly tâm 14.000 vòng ở 10°C trong 5 phút. Hút dịch trong.
- Bước 3: Lặp lại bước 2. Hút dịch trong.
- Bước 4: Thêm 250 μl dung dịch isopropanol lạnh. Để tủa ở -20°C trong 30 phút (tốt nhất nên để qua đêm).
- Bước 5: Ly tâm 14.000 vòng ở 10°C trong 5 phút. Đổ bỏ dịch trong.
- Bước 6: Thêm 300 μl TE 1X, ủ ở 37°C trong 1 giờ.
- Bước 7: Thêm 20 μl sodium acetate 3 M và 640 μl ethanol 100%, trộn đều. Để tủa -20°C trong 30 phút.
- Bước 8: Ly tâm 14.000 vòng ở 10°C trong 10 phút. Đổ bỏ dịch trong.
- Bước 9: Rửa cặn bằng 400 μl ethanol 70%, ly tâm 14.000 vòng ở 10°C trong 2 phút. Đổ bỏ dịch trong.
- Bước 10: Lặp lại bước 9. Để khô cặn, hòa tan cặn trong 100 μl TE 1X, ủ ở 37°C trong 30 phút.
- Bước 11: Bảo quản mẫu ở 4°C .

3.3.1.2. Quy trình 2 (quy trình ly trích mẫu cải tiến)

Quy trình này dựa trên quy trình ly trích mẫu tươi (Doyle và Doyle (1988)) nhưng có thay đổi tốc độ và thời gian ly tâm nhằm hạn chế sự đứt gãy của DNA. Quy trình gồm 11 bước được tiến hành như sau:

- Bước 1: Cân 0,3 g lá đã rửa sạch, nghiền lá với 1,2 ml dịch trích EB. Vortex thật kỹ cho đến khi hỗn hợp đồng nhất. Ủ dịch ở 65°C trong 60 phút.
- Bước 2: Thêm 500 μl chloroform: isoamyl alcohol (tỷ lệ 24: 1), đảo nhẹ, ly tâm 9000 vòng ở 10°C trong 25 phút. Hút dịch trong.
- Bước 3: Lặp lại bước 2. Hút dịch trong.
- Bước 4: Thêm 250 μl dung dịch isopropanol lạnh. Để tủa ở -20°C qua đêm.
- Bước 5: Ly tâm 9000 vòng ở 10°C trong 25 phút. Đổ bỏ dịch trong.
- Bước 6: Thêm 300 μl TE 1X, ủ ở 37°C trong 1 giờ.
- Bước 7: Thêm 20 μl sodium acetate 3 M và 640 μl ethanol 100%, trộn đều. Để tủa -20°C trong 30 phút.

- Bước 8: Ly tâm 8000 vòng ở 10°C trong 25 phút. Đổ bỏ dịch trong.
- Bước 9: Rửa cặn bằng 400 µl ethanol 70%, ly tâm 6000 vòng ở 10°C trong 10 phút. Đổ bỏ dịch trong.
- Bước 10: Lặp lại bước 9. Để khô cặn, hòa tan cặn trong 100 µl TE 1X, ủ ở 37°C trong 30 phút.

- Bước 11: Bảo quản mẫu ở -20°C

3.3.1.3. Quy trình 3 (quy trình ly trích mẫu cải tiến bằng N₂ lỏng)

Sử dụng quy trình 2 nhưng nghiền mẫu trong N₂ lỏng, có bổ sung thêm PVP 2% vào thành phần dịch trích EB và gồm 11 bước như sau:

- Bước 1: Cân 0,6 g lá Cóc trắng. Nghiền lá thật kỹ trong N₂ lỏng cho đến khi thu được dạng bột mịn, cho vào eppendorf.

- Bước 2: Thêm 1 ml dịch trích EB (có PVP). Vortex kỹ cho đến khi hỗn hợp đồng nhất. Ủ ở 65°C trong 60 phút (lưu ý cứ cách 30 phút vortex dịch lại một lần).

- Bước 3: Thêm 500 µl chloroform: isoamyl alcohol, đảo nhẹ trong 30 phút. Ly tâm 9000 vòng ở 10°C trong 25 phút. Hút dịch trong.

- Bước 4: Lặp lại bước 3. Hút dịch trong.

- Bước 5: Thêm 300 µl dung dịch isopropanol lạnh. Để tủa ở -20°C qua đêm.

- Bước 6: Ly tâm 9000 vòng ở 10°C trong 25 phút. Đổ bỏ dịch trong.

- Bước 7: Thêm 300 µl TE 1X. Ủ ở 37°C trong 60 phút.

- Bước 8: Thêm 20 µl sodium acetate và 640 µl ethanol 100%, trộn đều. Để tủa ở -20°C trong 60 phút.

- Bước 9: Ly tâm 8000 vòng ở 10°C trong 25 phút. Đổ bỏ dịch trong.

- Bước 10: Rửa tủa bằng 400 µl ethanol 70%, ly tâm 8000 vòng ở 10°C trong 10 phút. Đổ bỏ dịch trong.

- Bước 11: Lặp lại bước 10. Đổ bỏ dịch trong. Để tủa thật khô. Hòa tan tủa trong 100 µl TE 1X. Ủ ở 37°C trong 30 phút.

- Bước 12: Bảo quản mẫu ở -20°C.

3.3.2. Kiểm tra kết quả ly trích DNA

3.3.2.1. Kiểm tra định lượng DNA bằng quang phổ kế

Cách tiến hành:

- Dụng đường chuẩn: Dùng dung dịch TE 1X để tạo đường chuẩn.
- Pha loãng dung dịch DNA: Dùng TE 1X để pha loãng DNA đến nồng độ thích hợp (thường pha loãng 100 lần). Hút 20 μ l dịch DNA mẫu cho vào curvette, thêm 1,8 ml TE 1X.
- Tiến hành đo OD trên máy ở các bước sóng 260 nm và 280 nm.

Công thức tính hàm lượng DNA

$$\text{DNA (ng/}\mu\text{l)} = [(62,9 * \text{OD}_{260 \text{ nm}}) - (36 * \text{OD}_{280 \text{ nm}})] * n$$

Với:

- $\text{OD}_{260 \text{ nm}}$: Giá trị mật độ quang của DNA ở bước sóng 260 nm.
- $\text{OD}_{280 \text{ nm}}$: Giá trị mật độ quang của DNA ở bước sóng 280 nm.
- n: Độ pha loãng DNA (thường n = 100).

3.3.2.2. Kiểm tra định tính DNA bằng điện di trên gel

Cách tiến hành:

- Pha gel agarose nồng độ 1%: Cân 0,125 g agarose cho vào 12,5 ml dung dịch TAE 0,5X. Đun sôi trong lò Viba khoảng 2 phút cho agarose tan thật đều.
- Đổ gel, chờ agarose đông (lưu ý khuôn đổ gel phải thật cân bằng, tránh tạo bọt khi đổ gel).
- Load DNA vào các giếng theo tỷ lệ 2 μ l loading dye: 4 μ l DNA mẫu.
- Chạy điện di ở 100 V, 400 mA trong khoảng 20 phút.
- Nhuộm ethidium bromide trong khoảng 15 phút, sau đó rửa sạch bản gel.
- Đưa bản gel vào máy Geldoc đọc kết quả bằng tia cực tím.

3.3.3. Phản ứng RAPD

3.3.3.1. Primer

Phản ứng RAPD được tiến hành sử dụng 7 primer: primer 1, primer 2, primer 9, OPAC10, RAH8, OPA5, OPA10.

- Trình tự primer 1 (OPA02): 5'– TGCCGAGCTG –3' và $T_m = 40,7^\circ\text{C}$.
- Trình tự primer 2 (OPA03): 5'– AGTCAGCCAC –3' và $T_m = 34,3^\circ\text{C}$.
- Trình tự primer 9 (OPN02): 5'– GGTACTCCCC –3' và $T_m = 33,9^\circ\text{C}$.
- Trình tự primer OPAC10: 5'– AGCAGCGAGG –3' và $T_m = 34^\circ\text{C}$.
- Trình tự primer RAH8: 5'– GAGAGCCAAC –3' và $T_m = 31,9^\circ\text{C}$.
- Trình tự primer OPA5: 5'– AGGGGTCTTG –3' và $T_m = 30,2^\circ\text{C}$.
- Trình tự primer OPA10: 5'– GTGATCGCAG –3' và $T_m = 30,7^\circ\text{C}$.

3.3.3.2. Bố trí thí nghiệm

Nhằm tìm ra được thành phần hóa chất và chu trình nhiệt tốt nhất cho phản ứng RAPD trên cây Cóc trắng, chúng tôi đã chọn một số mẫu DNA đạt độ tinh sạch cao để tiến hành 4 thí nghiệm phản ứng RAPD – PCR.

Thí nghiệm 1:

- Mục đích thí nghiệm: Khảo sát chu trình nhiệt thích hợp.
- Chỉ tiêu đánh giá: Có band trên gel điện di.
- Phương pháp thực hiện: Phản ứng được thực hiện với primer OPAC10 với thành phần hóa chất trong bảng 3.1 và chu trình nhiệt trong bảng 3.2, 3.3.

Bảng 3.1. Thành phần hóa chất phản ứng RAPD của thí nghiệm 1

| Hóa chất | Nồng độ đầu | Nồng độ cuối | Thể tích sử dụng |
|---------------------------|--------------|--------------|------------------|
| PCR buffer | 10X | 1X | 2,5 µl |
| MgCl ₂ | 25 mM | 2,5 mM | 2,5 µl |
| dNTP | 10 mM | 0,1 mM | 0,25µl |
| Primer | 100 pmol/ µl | 26 pmol/ µl | 6,5µl |
| <i>Taq</i> DNA polymerase | 5 U | 1 U | 0,2 µl |
| DNA mẫu | 20 ng/ µl | 20 ng | 1 µl |
| H ₂ O | | | 12,05 µl |
| Tổng thể tích | | | 25 µl |

Bảng 3.2. Chu trình nhiệt 1 cho phản ứng RAPD của thí nghiệm 1

| Số chu kỳ | Nhiệt độ (°C) | Thời gian (phút) |
|----------------------|---------------|------------------|
| 1 | 94 | 3 |
| | 94 | 1 |
| 40 | 36 | 1 |
| | 72 | 2 |
| 1 | 72 | 15 |
| Giữ 4 ⁰ C | | |

Bảng 3.3. Chu trình nhiệt 2 cho phản ứng RAPD của thí nghiệm 1

| Số chu kỳ | Nhiệt độ (°C) | Thời gian (phút) |
|-----------|---------------|------------------|
| 1 | 94 | 5 |
| | 94 | 1/2 |
| 40 | 36 | 1/2 |
| | 72 | 1 |
| 1 | 72 | 5 |

Giữ 4°C

Thí nghiệm 2:

- Mục đích thí nghiệm: Khảo sát nồng độ các thành phần phản ứng.
- Chỉ tiêu đánh giá: Chất lượng band trên gel điện di.
- Phương pháp thực hiện: Phản ứng RAPD được thực hiện trên cả 7 primer với thành phần hóa chất trong bảng 3.4 và chu trình nhiệt trong bảng 3.5.

Bảng 3.4. Thành phần hóa chất trong phản ứng RAPD của thí nghiệm 2

| Hóa chất | Nồng độ gốc | Nồng độ cuối | Thể tích sử dụng |
|---------------------------|--------------|--------------|------------------|
| PCR buffer | 25 mM | 2,5 mM | 2,5 µl |
| MgCl ₂ | 25 mM | 3 mM | 3 µl |
| dNTP | 25 mM | 0,2 mM | 0,2 µl |
| Primer | 100 pmol/ µl | 1,2 pmol/ µl | 0,3 µl |
| <i>Taq</i> DNA polymerase | 5U | 1U | 0,2 µl |
| DNA mẫu | 20 ng | 20 ng | 1 µl |
| H ₂ O | | | 17,8 µl |
| Tổng thể tích | | | 25 µl |

Bảng 3.5. Chu trình nhiệt cho phản ứng RAPD của thí nghiệm 2

| Số chu kỳ | Nhiệt độ (°C) | Thời gian (phút) |
|-----------|----------------|------------------|
| 1 | 94 | 5 |
| | 94 | 1/2 |
| 40 | T _a | 1/2 |
| | 72 | 1 |
| 1 | 72 | 5 |
| Giữ 4°C | | |

- Primer 1 có T_a = 40°C.
- Các primer: primer 2, OPAC10 có T_a = 36°C.

- Các primer: RAH8, OPA5, OPA10 có $T_a = 34^\circ\text{C}$.

Thí nghiệm 3:

- Mục đích thí nghiệm: Xác định khả năng tạo sản phẩm RAPD của các mẫu DNA ly trích được nghiền trong EB và nghiền trong N_2 lỏng.

- Chỉ tiêu đánh giá: Độ nét của band trên gel điện di.

- Phương pháp thực hiện: Phản ứng RAPD được thực hiện sử dụng primer OPAC với thành phần hóa chất trong bảng 3.6 và chu trình nhiệt trong bảng 3.7. Sử dụng DNA mẫu là 6 mẫu ly trích được nghiền trong EB, 2 mẫu ly trích được nghiền trong N_2 lỏng.

Thí nghiệm 4:

- Mục đích thí nghiệm: Thực hiện phản ứng RAPD – PCR.

- Chỉ tiêu đánh giá: Chất lượng và số lượng của các band trên gel điện di.

- Phương pháp thực hiện: Phản ứng RAPD được thực hiện sử dụng primer OPAC10 với thành phần hóa chất trong bảng 3.6 và chu trình nhiệt trong bảng 3.7

Bảng 3.6. Thành phần hóa chất trong thí nghiệm 3 và 4

| Hóa chất | Nồng độ gốc | Nồng độ cuối | Thể tích sử dụng |
|---------------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|
| PCR buffer | 25 mM | 2,5 mM | 2,5 μl |
| MgCl_2 | 25 mM | 3 mM | 3 μl |
| dNTP | 25 mM | 0,2 mM | 0,2 μl |
| Primer | 100 pmol/ μl | 1 pmol/ μl | 0,25 μl |
| <i>Taq</i> DNA polymerase | 5U | 1U | 0,2 μl |
| DNA mẫu | 20 ng | 20 ng | 1 μl |
| H_2O | | | 17,8 μl |
| Tổng thể tích | | | 25 μl |

Bảng 3.7. Chu trình nhiệt cho phản ứng RAPD của thí nghiệm 3 và 4

| Số chu kỳ | Nhiệt độ (°C) | Thời gian (phút) |
|-----------|---------------|------------------|
| 1 | 94 | 5 |
| | 94 | ½ |
| 40 | 36 | ½ |
| | 72 | 1 |
| 1 | 72 | 5 |
| Giữ 4°C | | |

Một số lưu ý khi thực hiện phản ứng RAPD:

- Các thành phần hóa chất trong phản ứng RAPD được sử dụng với thể tích rất nhỏ, đặc biệt là *Taq* polymerase (thể tích hút 0,2 µl) và không có pipet nào có thể hút chính xác một thể tích nhỏ như vậy. Do đó, để đảm bảo độ chính xác cho các thể tích hút, thông thường người ta trộn (mix) một lần nhiều phản ứng, sau đó chia ra từng ống nhỏ và thêm DNA mẫu vào.

- Thao tác trộn phản ứng phải được thực hiện trong tủ cấy vô trùng để đảm bảo không bị tạp nhiễm. Hóa chất dùng để trộn phải được giữ lạnh trong nước đá.

- Thao tác trộn phải đều và nhẹ nhàng, lưu ý tránh tạo bọt trong quá trình trộn.

- *Taq* polymerase hoạt động ngay sau khi bỏ vào phản ứng, vì vậy phải bỏ *Taq* vào sau cùng. Sau khi bỏ *Taq* các thao tác còn lại phải được tiến hành nhanh chóng.

- *Taq* polymerase rất dễ hư hỏng và bay hơi, thể tích trong ống gốc ban đầu rất ít (20 µl) nên thao tác hút *Taq* phải thật cẩn thận, tránh để *Taq* dính thành eppendorf. Nên ly tâm *Taq* trước và sau khi trộn để tránh hiện tượng dính trên thành eppendorf.

- Sản phẩm PCR được bảo quản lạnh -20°C, hạn chế thay đổi nhiệt độ đột ngột vì sẽ làm phân hủy DNA trong sản phẩm.

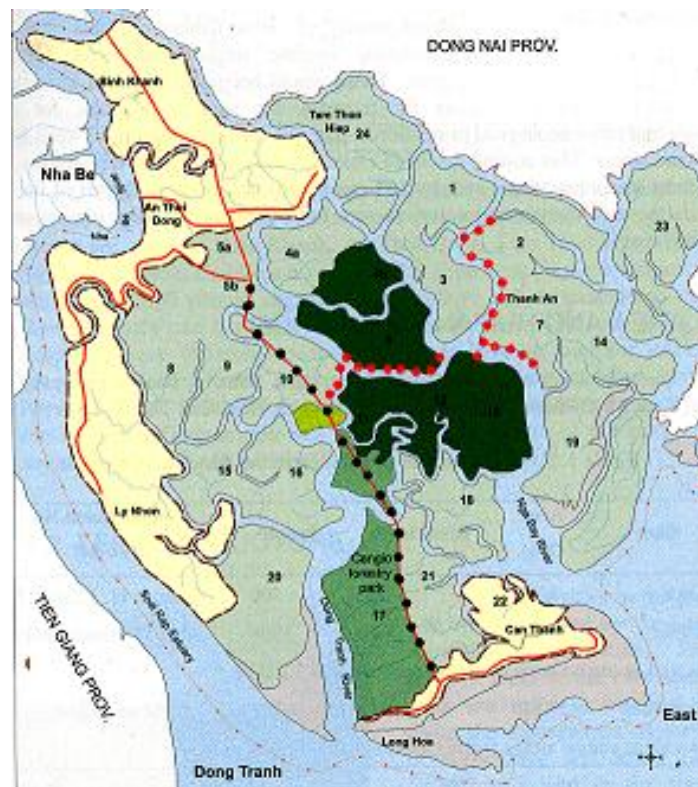
Chương 4

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Kết quả thu thập mẫu lá Cóc trắng tại khu dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ

Trong công tác thu thập mẫu, chúng tôi gặp nhiều khó khăn trong việc tìm kiếm những mẫu có đặc tính khác lạ như dự kiến ban đầu đề ra. Nguyên nhân chính là do việc đi lại trong rừng rất hạn chế vì có nhiều vùng đất lún và ngập nước. Chúng tôi đã không thể đi sâu vào rừng để lấy những mẫu có đặc điểm khác lạ.

Chúng tôi đã tiến hành 4 đợt thu mẫu thực địa tại khu dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ, lấy được tổng cộng 45 mẫu lá Cóc trắng theo hai đường chéo: đường bộ và đường thủy xuyên rừng. Vị trí lấy mẫu và đặc điểm mẫu thu thập được thể hiện trong hình 4.1 và bảng 1 phần phụ lục.



Hình 4.1. Vị trí lấy mẫu trên bản đồ Cần Giờ

Các mẫu được thu thập từ nhiều tiểu khu và từ những cây đã trưởng thành, đa số đã có hoa và quả. Các cây lấy mẫu theo đường bộ có dấu hiệu bị sâu ăn lá, lá có đốm bệnh màu nâu, trong khi các cây lấy mẫu theo đường thủy rất xanh tốt, ít thấy hiện tượng này. Hai đường chéo lấy mẫu đi xuyên diện tích rừng, khoảng cách lấy mẫu khá xa và cách đều nhau khoảng 800 m. Vì vậy, mặc dù lượng mẫu lấy được (45 mẫu) là ít so diện tích quần thể Cóc trắng có trong rừng nhưng cũng đã đại diện cho quần thể Cóc trắng tại đây.

4.2. Bảo quản mẫu và hoàn thiện quy trình ly trích DNA

4.2.1. Bảo quản mẫu

Khác với các loài đước và mắm thường bị hóa nâu khi bảo quản trong điều kiện -20°C , mẫu lá Cóc trắng có thể bảo quản lâu dài ở nhiệt độ này. Mẫu lá có thể trữ được khoảng 30 ngày mà lá vẫn còn màu xanh và không bị hóa nâu khi lấy ra nhiệt độ phòng để ly trích (xem hình 4.2). Khi tiến hành ly trích trên những mẫu lá được bảo quản sau 30 ngày, chúng tôi vẫn thu được kết quả tốt thể hiện trong hình 4.6. Đây là một ưu điểm rất thuận lợi cho chúng tôi trong điều kiện tiến hành thí nghiệm phải lấy mẫu ở xa, việc lấy mẫu khó khăn và cần bảo quản mẫu trong thời gian dài.



Hình 4.2. Mẫu lá Cóc trắng sau 30 ngày bảo quản

Qua một số thí nghiệm về thời gian và phương pháp bảo quản mẫu, chúng tôi có một số nhận xét như sau:

- Mẫu lá Cóc trắng có thể bảo quản trên 30 ngày ở -20°C .

- Cách bảo quản mẫu tốt nhất là sau khi lấy mẫu tươi từ cây, lau thật sạch mẫu, cho vào túi nilon, ép hết không khí trong túi ra ngoài, buộc chặt miệng túi. Vận chuyển mẫu bằng thùng lạnh và bảo quản mẫu trong tủ lạnh -20°C .

- Mẫu lá Cóc trắng sau 30 ngày bảo quản vẫn cho kết quả tốt khi ly trích DNA.

4.2.2. Hoàn thiện quy trình ly trích

Giai đoạn đầu chúng tôi thực hiện ly trích DNA theo quy trình 1 (quy trình ly trích mẫu tươi (Doyle và Doyle (1988))). Kết quả là chúng tôi không thu được DNA mẫu hoặc là lượng DNA mẫu ít, lẫn tạp và bị gãy vụn rất nhiều (bị smear trên gel điện di). Chỉ số đo OD của những mẫu này rất thấp, chỉ từ 1,2 – 1,4 (xem kết quả chi tiết tại bảng 2 phần phụ lục). Điều này có thể là do quá trình bảo quản mẫu trong giai đoạn đầu chưa tốt làm mẫu bị hư hỏng. Ngoài ra còn có thể là do thao tác ly trích chưa tốt như nghiền mẫu quá mạnh, vortex quá mạnh làm DNA bị gãy, thao tác hút ở bước 2 và 3 không tốt làm mẫu DNA bị lẫn tạp.

Mẫu DNA ly trích theo quy trình này hoàn toàn không tinh sạch, không đủ điều kiện để thực hiện phản ứng RAPD.

Sau khi tiến hành thay đổi một số yếu tố như thời gian ủ, lượng mẫu, tốc độ ly tâm theo quy trình 2, thao tác ly trích đã thành thực hơn, thao tác nghiền nhẹ và đều tay hơn, chúng tôi đã cải thiện được chất lượng DNA mẫu. Kết quả ly trích DNA tốt hơn, DNA ít bị smear hơn khi điện di nhưng lượng DNA còn ít và tạp rất nhiều. Chỉ số đo OD của những mẫu này cũng chỉ từ 1,3 – 1,6 và chỉ có 6 mẫu đạt $1,8 \leq \text{OD} \leq 2,2$ (xem kết quả chi tiết tại bảng 3 phần phụ lục). Điều này có nghĩa là quy trình 2 vẫn chưa phải là quy trình ly trích phù hợp cho cây Cóc trắng, và những mẫu DNA ly trích từ quy trình này không đủ tiêu chuẩn để thực hiện các phân tích

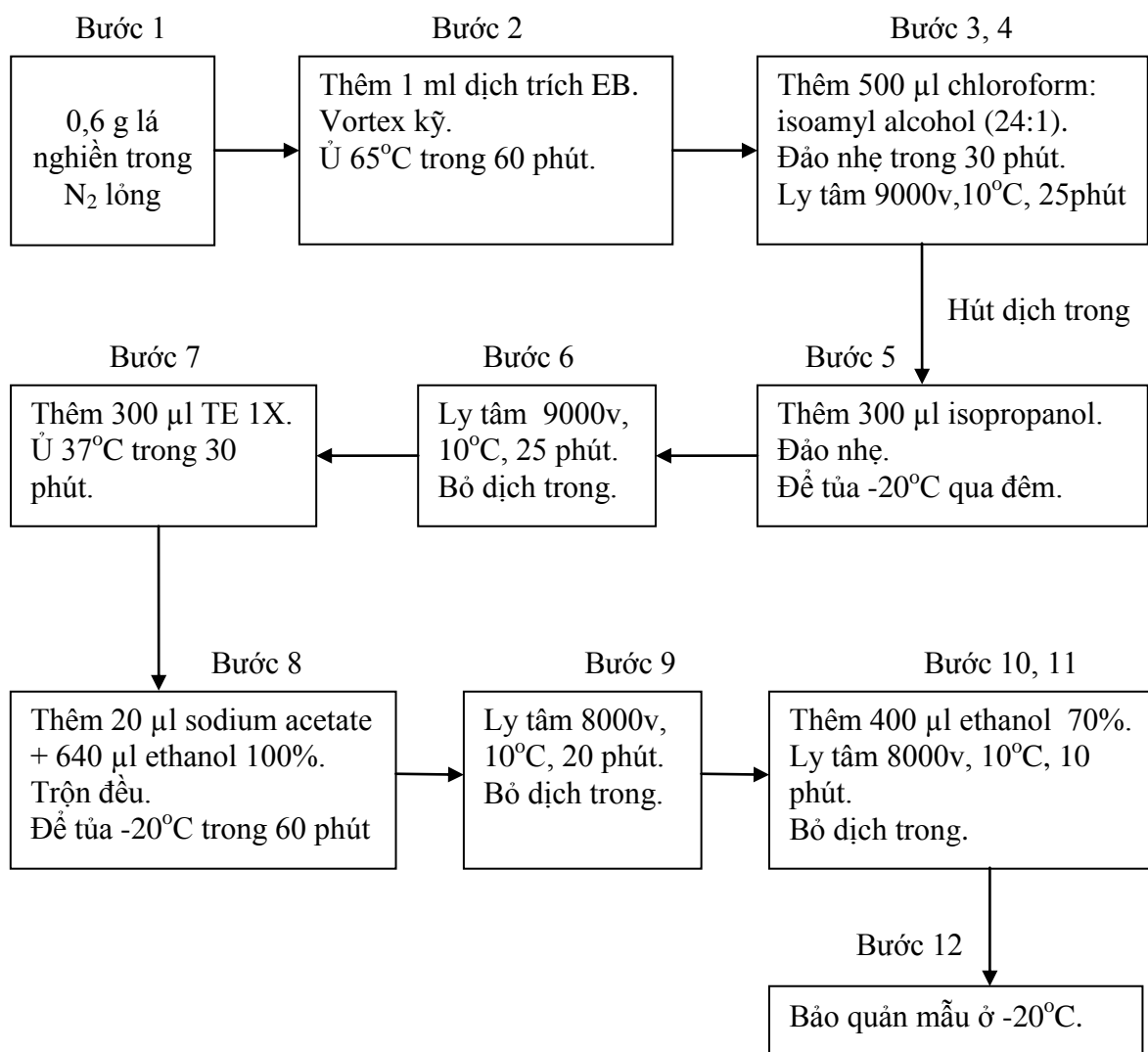
tiếp theo. Ngoài ra, sau một thời gian trữ DNA, khi chạy điện di lại những mẫu này, chúng tôi nhận thấy có sự mất mát một lượng lớn DNA.

Theo chúng tôi nhận định, điều này có thể là do Cóc trắng là cây ngập mặn nên hàm lượng muối, sắc tố cũng như các hợp chất thứ cấp khác trong lá cao hơn so với cây bình thường. Việc ly trích theo quy trình 1 và 2 không loại bỏ được hết các hợp chất này. Sự hiện diện của chúng làm hạn chế tác dụng của các hóa chất trong dịch ly trích, làm DNA bị gãy khi vortex hay ly tâm và làm DNA bị phân hủy trong quá trình bảo quản.

Mặt khác, lá Cóc trắng là lá mỏng nước và dai nên lượng DNA trong 1 g lá thấp hơn so với các loại cây ngập mặn khác, lượng DNA thu được cũng ít hơn. Khi nghiền trong dịch EB lỏng, lá dễ nát thành mảng nhưng khó nhuyễn. Vì vậy, để đồng nhất mẫu lá và dịch EB, việc nghiền mẫu trong thời gian kéo dài và nghiền tương đối mạnh làm DNA bị gãy là không thể tránh khỏi. Chất lượng DNA ly trích phụ thuộc quá nhiều vào thao tác nghiền mẫu.

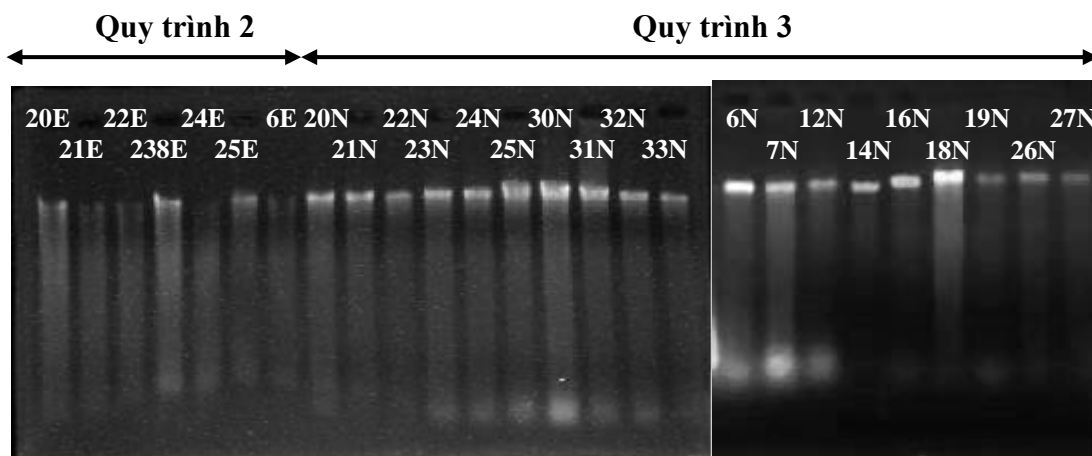
Để khắc phục tình trạng trên, chúng tôi đã tiến hành nghiền mẫu thử nghiệm trong N_2 lỏng, bổ sung thêm PVP 2% để loại bớt các hợp chất phenol, các bước tiến hành theo quy trình 3. Kết quả chúng tôi thu được DNA vượt trội hơn hẳn so với quy trình 1 và 2 về chất lượng DNA và thuận tiện trong thao tác.

Quy trình 3 gồm 12 bước được thực hiện theo hình 4.3.



Hình 4.3. Quy trình 3 (quy trình ly trích nghiền trong N₂ lỏng)

So sánh kết quả ly trích DNA theo quy trình 3 với hai quy trình còn lại, chúng tôi nhận thấy chất lượng DNA được cải thiện đáng kể, lượng DNA thu được nhiều hơn, DNA ít bị gãy và lượng tạp cũng giảm đáng kể. Điều này được thể hiện rõ qua độ sáng của band DNA trên gel điện di hình 4.4.



Hình 4.4. Gel điện di kết quả ly trích DNA theo quy trình 2 và 3

Ly trích theo quy trình 3 sử dụng N_2 lỏng trong quá trình nghiền mẫu giúp hiện tượng đứt gãy DNA giảm xuống mức thấp nhất, việc sử dụng PVP và rửa DNA 2 lần cũng giúp loại bỏ các tạp chất như protein, polysaccharide... giúp nâng cao chất lượng DNA thu được. Nhìn chung, quy trình 3 đảm bảo đủ các yếu tố cần thiết khi ly trích, DNA mẫu thu được từ quy trình này có chất lượng tốt và ổn định, có thể được sử dụng cho tất cả các kỹ thuật nghiên cứu đa dạng di truyền đòi hỏi DNA có độ tinh sạch cao.

Ngoài ra, phương pháp nghiền có nhiều tiện lợi như lá dễ nghiền hơn do lá trở nên giòn trong N_2 , có thể nghiền mẫu mạnh tay mà không sợ DNA bị đứt gãy, không cần nghiền mẫu trong tủ hút, không có mùi khó chịu trong quá trình nghiền, việc rửa chày cối sau khi nghiền cũng đơn giản hơn, giúp tiết kiệm thời gian (trung bình 1 mẫu 0,6 g nghiền trong 10 phút so với 30 phút khi nghiền với EB).

Vì vậy, chúng tôi quyết định sử dụng quy trình 3 để ly trích DNA đồng loạt từ mẫu lá Cóc trắng.

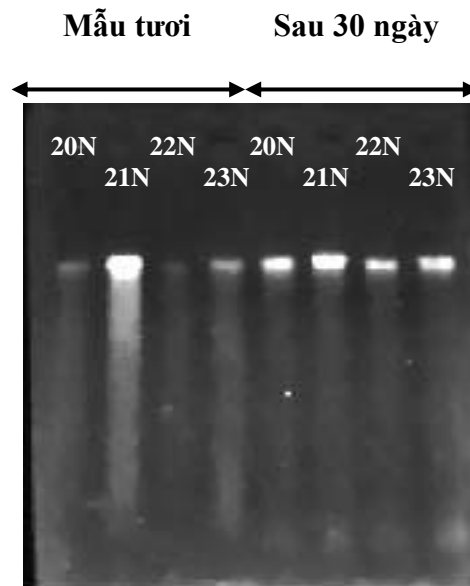
Chúng tôi thực hiện ly trích theo quy trình 3 trên tổng số 45 mẫu, thu được DNA từ 35 mẫu đạt tiêu chuẩn dùng cho các kỹ thuật sinh học phân tử chiếm 77,78%. Trong 35 mẫu thu được có 30 mẫu đạt $1,8 \leq OD \leq 2,2$ chiếm 66,67%, 35 mẫu có hàm lượng DNA lớn hơn 50 ng/ μ l chiếm 100%. (kết quả chi tiết ở bảng 4 phụ lục)

Đối với 10 mẫu ly trích thu được DNA không đạt tiêu chuẩn hoặc không thu được DNA đều là những mẫu lấy từ tuyến đường bộ và bị đốm bệnh màu nâu (quan sát lá bệnh trên hình 4.5). Điều này có thể là do cây Cóc trắng là cây ngập mặn thật sự (true mangrove) sống trong nước ngập triều, nên những cây sống dọc theo tuyến đường bộ không được đáp ứng đủ điều kiện sống tốt, hơn nữa những cây này có lá bị đốm bệnh màu nâu nên đã ảnh hưởng đến hoạt tính của hóa chất ly trích và làm mất lượng lớn DNA trong quá trình loại bỏ tạp chất.



Hình 4.5. Lá Cóc trắng bị đốm nâu và sâu ăn

Trong quá trình ly trích DNA, chúng tôi nhận thấy những mẫu lá được bảo quản trên 30 ngày khi ly trích theo quy trình 3 vẫn cho kết quả tốt, tạo band sáng và ít tạp trên gel điện di trong hình 4.6. Điều này cho thấy lá Cóc trắng sau bảo quản 30 ngày vẫn cho kết quả khi ly trích.



Hình 4.6. Kết quả điện di sản phẩm ly trích DNA từ mẫu lá tươi ban đầu theo quy trình 2 và mẫu lá bảo quản sau 30 ngày theo quy trình 3

Trong quá trình ly trích, chúng tôi nhận thấy về mặt thao tác cần lưu ý một số vấn đề sau:

- Trước khi cân mẫu lá, nên dùng khăn giấy lau sạch mẫu lá và gói mẫu trong giấy bạc, không rửa mẫu với nước vì sẽ làm mẫu dễ bị dập.
- Khi nghiền mẫu với N_2 lỏng, mẫu lá chưa nghiền, eppendorf đựng mẫu và các dụng cụ sử dụng để nghiền mẫu phải luôn để trong N_2 lỏng.
- Nghiền mẫu thật kỹ, không dùng lực quá mạnh và nghiền đều tay cho đến khi có dạng bột mịn, không để mẫu chảy nước trong suốt quá trình nghiền cho đến khi thêm EB.
- Dịch trích EB khi bảo quản ở $4^\circ C$ thường có hiện tượng kết tủa (CTAB) làm ảnh hưởng đến hiệu quả ly trích DNA, do đó nên ủ EB ở $65^\circ C$ trước khi sử dụng.
- β -mercapto ethanol là chất dễ bay hơi và có mùi khó chịu, do đó chỉ nên thêm β -mercapto ethanol vào EB ngay trước khi sử dụng để không làm mất hoạt tính của chất này.
- Nên thêm chloroform: isoamyl alcohol bằng với thể tích dịch trong giúp tác dụng loại bỏ các hợp chất thứ cấp tốt hơn. Các bước tiếp theo sau khi thêm

chloroform: isoamyl alcohol, chỉ nên khuấy trộn nhẹ nhàng và đem ly tâm, không nên vortex để tránh làm gãy DNA.

- Ở bước 3 và 4, khi chuyển lấy dịch trong cân cần thận tránh lấy phạm vào phần tạp phía dưới, sẽ làm giảm độ tinh sạch của DNA. Do đó, ở hai bước này nên hút dịch trong thật nhẹ, thường thể tích hút dịch trong ở bước 3 là 450 μ l, ở bước 4 là 300 μ l.

- Ở bước 11, khi phơi khô tủa nên chú ý là nếu tủa quá khô sẽ làm hỏng DNA, nếu còn ethanol sẽ ảnh hưởng xấu đến DNA trong quá trình bảo quản và phản ứng PCR.

- Sau một thời gian trữ DNA ở -20°C , chúng tôi nhận thấy có sự suy giảm chất lượng DNA, biểu hiện ở band DNA bị mờ, bị smear và lượng tạp chất tăng. Điều này có thể là do trong quá trình trữ DNA, chúng tôi đã lấy DNA ra khỏi tủ -20°C để thực hiện một số phân tích khác như đo OD, điện di lại lấy kết quả, pha loãng và điện di mẫu pha loãng để chuẩn bị cho phản ứng RAPD, nên đã làm DNA bị shock nhiệt khi thay đổi đột ngột từ nhiệt độ lạnh sang nhiệt độ phòng. Do đó nên hạn chế lấy DNA ra khỏi tủ âm. Khi cần phân tích thêm, nên để eppendorf chứa DNA lên đá lạnh để hạn chế shock nhiệt.

Sau khi hoàn thiện quá trình ly trích và kiểm tra kết quả ly trích DNA, chúng tôi có một số kết luận như sau:

- Ly trích DNA tốt nhất nên thực hiện trên lá trưởng thành vì lá non có nhiều nhựa và hợp chất phenol, lá già lại có quá nhiều chất xơ và hàm lượng muối trong lá cao.

- Nghiền mẫu trong N_2 lỏng và thực hiện ly trích theo quy trình 3 cho DNA kết quả tốt và ổn định, có thể sử dụng được cho tất cả các kỹ thuật sinh học phân tử đòi hỏi DNA có độ tinh sạch cao.

- Phương pháp nghiền có nhiều tiện lợi, giúp tiết kiệm thời gian.

- Tăng thời gian ủ giúp thu được nhiều DNA hơn.

- Giảm tốc độ ly tâm và tăng thời gian ly tâm tránh cho DNA bị đứt gãy nhưng vẫn đảm bảo kết tủa tốt.

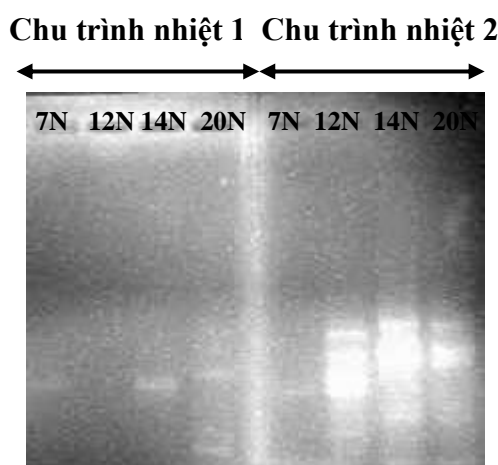
- Sau ly trích nên trữ DNA trong điều kiện -20°C . Khi tiến hành các bước phân tích tiếp theo nên để DNA trong đá lạnh để tránh cho DNA bị shock nhiệt làm hao hụt lượng DNA ban đầu.

- Mẫu lá Cóc trắng bảo quản sau 30 ngày vẫn còn xanh tốt, khi ly trích DNA theo quy trình 3 vẫn cho kết quả tốt.

4.3. Thực hiện phản ứng RAPD

4.3.1. Thí nghiệm 1

Trong thí nghiệm 1, chúng tôi sử dụng primer OPAC10 với chu trình nhiệt 1 và 2 nhằm tìm ra chu trình nhiệt thích hợp cho phản ứng RAPD trên cây Cóc trắng. Qua thí nghiệm 1, chúng tôi thu được kết quả thể hiện ở hình 4.7.



Hình 4.7. Hình điện di sản phẩm PCR ở thí nghiệm 1

Kết quả điện di cho thấy thành phần hóa chất và chu trình nhiệt 1 của phản ứng RAPD trong thí nghiệm 1 không phù hợp cho cây Cóc trắng. Chúng tôi không thu được sản phẩm PCR ở hầu hết các mẫu, có hai mẫu có đoạn DNA được khuếch đại nhưng rất mờ, không xác định được band nên kết quả không sử dụng được trong phân tích đa dạng di truyền. Việc tạo band mờ có thể là do các nguyên nhân sau:

- Nồng độ $MgCl_2$ không phù hợp.
- Nồng độ primer quá lớn.
- Chu trình nhiệt chưa phù hợp.
- Thao tác trộn phản ứng chưa tốt.

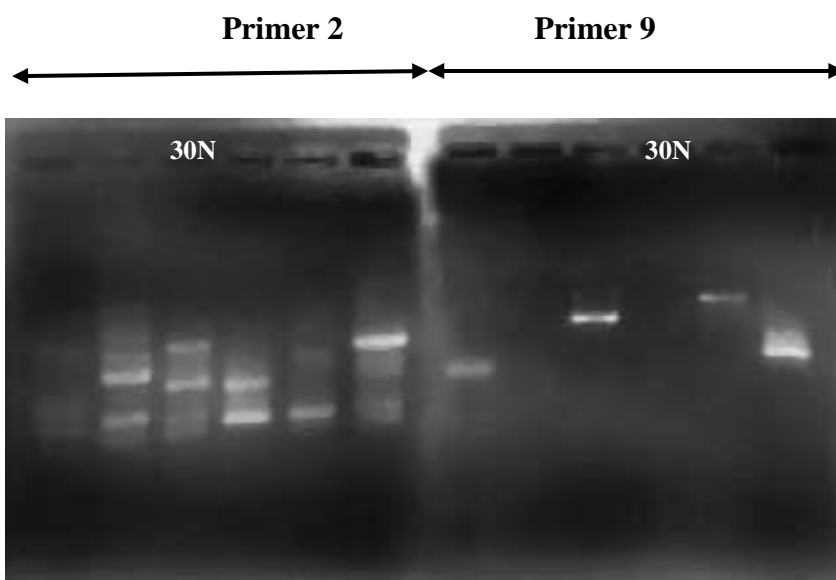
Với thành phần hóa chất không thay đổi, thứ tự mẫu DNA không đổi, trong thí nghiệm 1 chúng tôi khảo sát thêm chu trình nhiệt 2, tăng thời gian biến tính ở chu kỳ 1 giúp DNA tách rời nhau hoàn toàn, giảm thời gian ở các chu kỳ tiếp theo giúp tránh các thành phần hóa chất chịu tác dụng nhiệt quá lâu. Kết quả điện di cho thấy có sản phẩm DNA được khuếch đại. Tuy các band chưa tách rõ nhưng band sáng và có xác định được một vài band. Điều này cho thấy chu trình nhiệt 2 phù hợp với cây Cóc trắng hơn và chúng tôi quyết định sử dụng chu trình nhiệt này để thực hiện các phân tích tiếp theo. Vấn đề còn lại là thay đổi các thành phần hóa chất để có được sản phẩm PCR tốt hơn.

4.3.2. Thí nghiệm 2

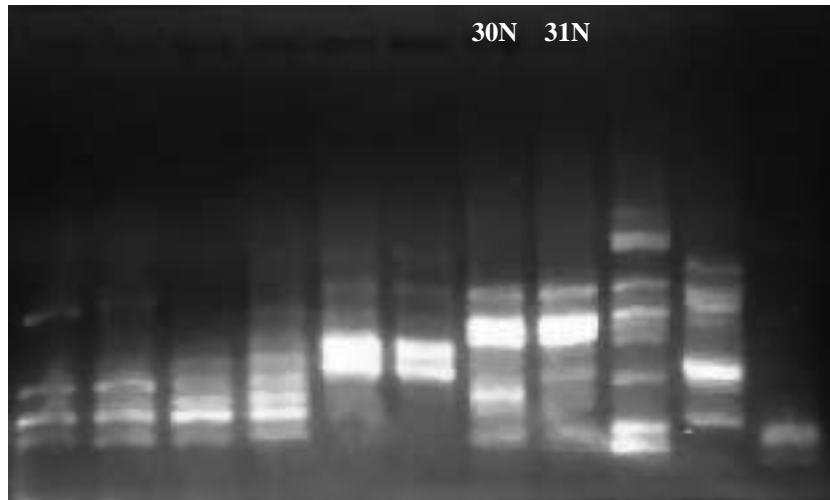
Trong thí nghiệm 2, chúng tôi sử dụng chu trình nhiệt 2, kết hợp với việc thay đổi một số nồng độ của các hóa chất trong phản ứng RAPD và khảo sát trên tất cả 7 primer để tìm ra primer thích hợp sử dụng trong nghiên cứu đa dạng di truyền trên cây Cóc trắng. Kết quả khảo sát các môi được thể hiện trong các hình 4.8, 4.9, 4.10, 4.11.



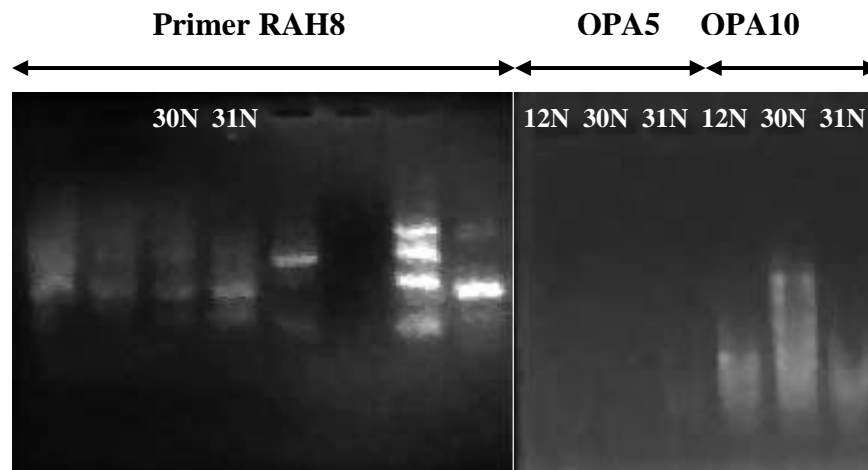
Hình 4.8. Hình điện di sản phẩm RAPD với primer 1



Hình 4.9. Hình điện di sản phẩm RAPD với primer 2 và 9



Hình 4.10. Hình điện di sản phẩm RAPD với primer OPAC10



Hình 4.11. Hình điện di sản phẩm RAPD với primer RAH8, OPA5, OPA10

Kết quả điện di cho thấy:

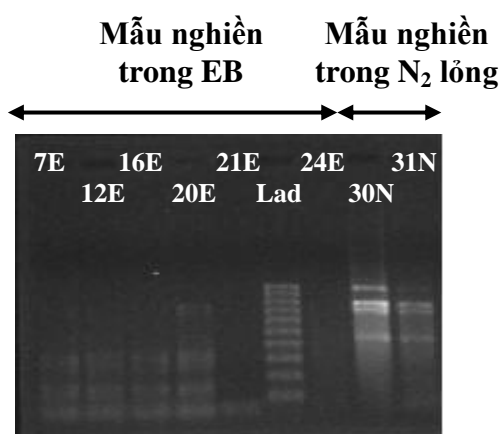
- Các primer 9, OPA5, không cho sản phẩm PCR với cây Cóc trắng. Điều này có thể là do môi trường không thích hợp, hoặc các thành phần hóa chất chưa tốt, chu trình nhiệt có nhiệt độ bất cập không phù hợp.

- Các primer RAH8, OPA10 có tạo sản phẩm PCR với cây Cóc trắng, nhưng band điện di bị mờ, không tách band rõ rệt. Nếu muốn sử dụng hai primer này cần phải tối ưu hóa quy trình phản ứng qua nhiều giai đoạn như nồng độ các thành phần hóa chất và chu trình nhiệt, mất nhiều thời gian công sức nên chúng tôi quyết định không sử dụng hai primer này.

- Các primer 1, primer 2, OPAC10 tạo sản phẩm PCR cho kết quả điện di có band sáng, gọn, ít bị nhòe, tách band rõ. Ba primer này có thể dùng trong phản ứng RAPD trên cây Cóc trắng. Tuy nhiên, khi so sánh số band trên gel điện di thì primer OPAC10 tạo nhiều band hơn (5 band) so với primer 2 (3 band), và tạo band đẹp hơn so với primer 1 nên khả năng tạo đa hình cao hơn. Do đó, chúng tôi quyết định chọn primer OPAC10 để thực hiện thí nghiệm 3.

4.3.3. Thí nghiệm 3

Trong thí nghiệm 3, chúng tôi sử dụng primer OPAC10 để thực hiện phản ứng RAPD trên 6 mẫu ly trích DNA được nghiền trong EB có chỉ số OD là 1,8 và 2 mẫu ly trích được nghiền trong N₂ lỏng. Chúng tôi thu được kết quả thể hiện ở hình 4.12.

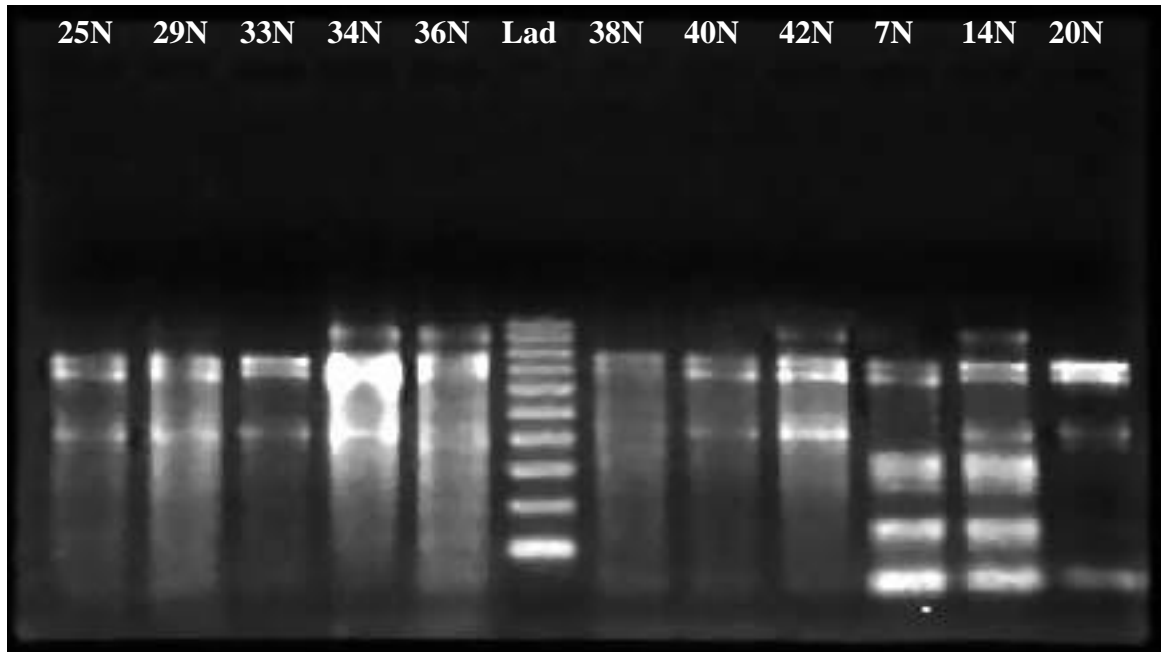


Hình 4.12. Hình điện di sản phẩm RAPD của thí nghiệm 3

Kết quả điện di cho thấy các mẫu DNA ly trích được nghiền trong EB cho sản phẩm RAPD không tốt, band mờ, tách band không rõ, còn các mẫu DNA ly trích nghiền trong N₂ lỏng cho sản phẩm RAPD sáng rõ. Điều này có thể là do DNA ly trích theo quy trình 2 bị mất dần lượng DNA sau thời gian bảo quản, và các tạp chất còn sót lại gây ảnh hưởng xấu đến phản ứng PCR. Điều này càng khẳng định hơn tính vượt trội của quy trình nghiền mẫu trong N₂ lỏng.

4.3.4. Thí nghiệm 4

Trong thí nghiệm 4 chúng tôi sử dụng primer OPAC10 với thành phần hóa chất ở bảng 3.6 và chu trình nhiệt ở bảng 3.7. Chúng tôi thu được kết quả thể hiện ở hình 4.13.



Hình 4.13. Hình điện di sản phẩm RAPD của thí nghiệm 4

Kết quả điện di cho thấy sản phẩm PCR chưa tốt, các band có độ sáng không đồng đều, một số band mờ, sự tách band ở một số mẫu không rõ rệt, gây khó khăn khi đọc kết quả. Điều này có thể là do chu trình nhiệt và thành phần hóa chất dùng trong phản ứng RAPD vẫn chưa được tối ưu, và thao tác trộn phản ứng còn chưa tốt, chúng tôi cũng không loại trừ khả năng DNA mẫu bị thay đổi chất lượng sau một thời gian bảo quản.

Tuy nhiên, với sự hỗ trợ của công cụ “Detected band” trên phần mềm Quantity one, chúng tôi đã ghi nhận được kết quả như sau:

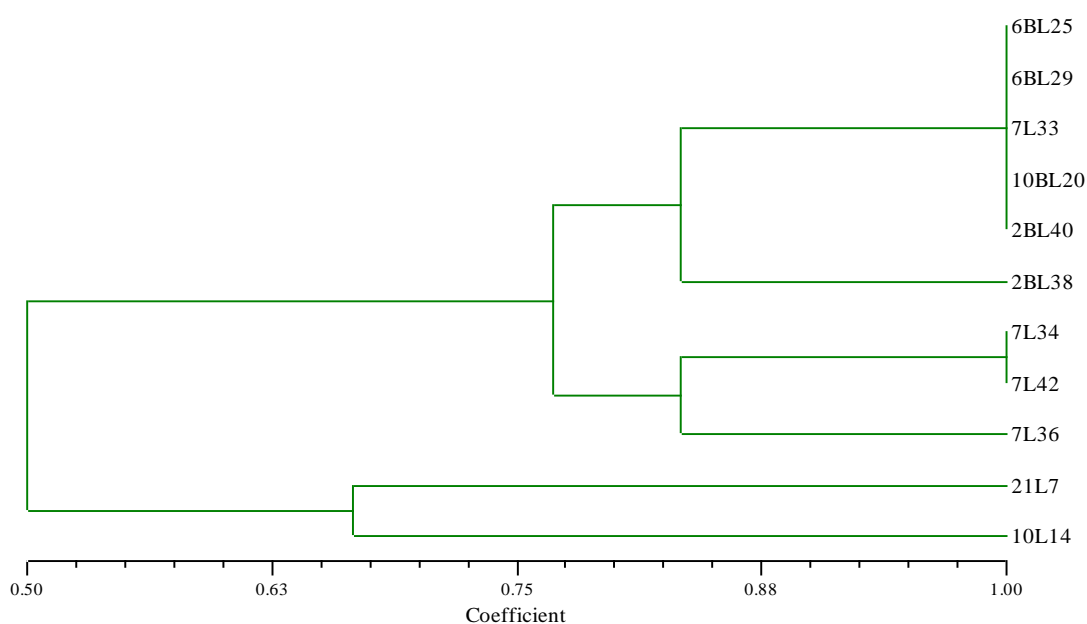
- Thu được tổng cộng 38 band từ 11 mẫu phân tích, số band nhiều nhất xuất hiện trong 1 mẫu là 6, ít nhất là 2, trung bình 3,5 band/ 1 mẫu. Số lượng band/ mẫu không cao nhưng vẫn thể hiện được sự đồng hình và đa hình giữa các mẫu phân tích

- Có 2 band đồng hình xuất hiện ở 11 mẫu, kích thước band là 700 bp và 800 bp chiếm tỷ lệ 5,3%.

- Có 4 band đa hình, chiếm tỷ lệ 10,5%. Các band đa hình là cơ sở phân biệt các mẫu có tính trạng khác nhau. Trong các band đa hình thì band có kích thước 150 bp, 300 bp chỉ xuất hiện ở các mẫu 7N, 14N; band đa hình 450 bp xuất hiện ở đa số các mẫu, chỉ không xuất hiện ở 3 mẫu 36N, 38N, 7N; band đa hình 1000 bp chỉ xuất hiện ở các mẫu 34N, 36N, 42N, 14N.

Tuy chúng tôi thực hiện phản ứng RAPD với lượng mẫu không lớn nhưng trong các mẫu cho sản phẩm luôn có sự xuất hiện 2 band đồng hình có kích thước 700 bp và 800 bp, trong khi các cây ngậ mặn khác như Đước đôi, Đung, Mắm trắng, Mắm đen và Mắm biển không thấy xuất hiện band đồng hình ở các kích thước này. Hai band này có thể là band đặc trưng dùng để phân biệt Cóc trắng với các loài cây ngậ mặn khác. Do đó nên tách band này để giải trình tự nhằm phục vụ cho công tác xác định và chọn tạo giống.

Từ kết quả thể hiện trên gel điện di, chúng tôi mã hóa các band đồng hình và đa hình ở các mẫu thành ma trận nhị phân (0: không có band, 1: có band) dưới dạng file .xls. Sau đó dùng phần mềm NTSYS phiên bản 2.1 để phân tích số liệu trong file này để xây dựng bảng hệ số đồng dạng di truyền (bảng 4.1) và vẽ cây phát sinh loài (hình 4.14). Qua đó, chúng tôi phân tích mối tương quan di truyền giữa các mẫu nghiên cứu.



Hình 4.14. Cây phân loại một số cây Cóc trắng tại Khu dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ

Việc phân tích sản phẩm RAPD bằng phần mềm NTSYS cho các kết quả như sau:

- Mười một mẫu Cóc trắng chạy RAPD được chia làm 2 nhóm với hệ số đồng dạng là 0,5. Nhóm I gồm hai mẫu 21L7 và 10L14 có hệ số đồng dạng 0,67. Đây là hai mẫu Cóc trắng được lấy từ các cây mọc dọc theo tuyến lấy mẫu đường bộ. Nhóm II gồm 9 mẫu 6BL25, 6BL29, 7L33, 10BL20, 2BL40, 2BL38, 7L34, 7L42, 7L36 có hệ số đồng dạng di truyền từ 0,76 – 1. Đây là các mẫu lấy từ các cây mọc dọc theo tuyến lấy mẫu đường thủy. Như vậy, các cây lấy mẫu thuộc đường thủy và đường bộ có thể xuất phát từ các nguồn giống khác nhau. Chúng tôi vẫn chưa tìm được thông tin về nguồn gốc giống cây Cóc trắng tại rừng Cần Giờ một cách chi tiết. Tuy nhiên, nếu tiến hành nghiên cứu đa dạng di truyền với số lượng mẫu lớn có thể xác định chính xác hơn nhận định trên.

- Các cây Cóc trắng thuộc cùng một tiểu khu có hệ số đồng dạng di truyền khá cao: 6BL25 và 6BL29, 7L34 và 7L42 có hệ số đồng dạng di truyền là 1; 7L33, 7L34, 7L36, 7L42 có hệ số đồng dạng di truyền là 0,83; 2BL38, 2BL40 cũng có hệ

số đồng dạng di truyền là 0,83. Các mẫu thuộc các tiểu khu nằm kề nhau trên tuyến lấy mẫu cũng có hệ số đồng dạng là 0,76 (các tiểu khu 6, 7 và 2 nằm kề nhau theo tuyến lấy mẫu đường thủy). Như vậy, các cây trong cùng tiểu khu có thể có nguồn giống gần nhau, cá biệt có một vài cây hoàn toàn giống nhau về mặt di truyền. Điều này chứng tỏ sự đa dạng di truyền trong tiểu khu thấp, cần phải có kế hoạch cải thiện.

- Các mẫu lấy từ đường bộ và các mẫu lấy từ đường thủy có hệ số đồng dạng di truyền thấp hơn các mẫu lấy trong cùng tiểu khu hoặc các mẫu lấy ở các tiểu khu liền nhau nhưng vẫn lớn hơn 0,5. Hệ số này cho thấy các mẫu chạy RAPD có sự đa dạng di truyền ở mức độ thấp.

Theo chúng tôi nhận định, điều này có thể là do chúng tôi chỉ tiến hành thu mẫu ngẫu nhiên dọc theo hai đường chéo xuyên rừng, không có điều kiện đi sâu vào các tiểu khu ở xa để lấy các mẫu có đặc tính khác lạ.

Mặt khác, chúng tôi cũng không có điều kiện thu thập mẫu trên cơ sở những dòng giống đã được xác định trước nên độ đa dạng của quần thể mang tính ngẫu nhiên. Ngoài ra còn có thể là do quần thể Cóc trắng tại rừng Cần Giờ là quần thể tái sinh tự nhiên sau chiến tranh (khác với quần thể Đước đôi được tái sinh nhân tạo bằng cách lấy các nguồn giống khác về trồng tại rừng), các cây phân bố theo sự phát tán tự nhiên (phát tán theo gió, theo dòng chảy của kênh rạch) nên việc quần thể Cóc trắng tại đây có độ đa dạng di truyền thấp là hoàn toàn có thể xảy ra. Như vậy, càng về sau thì hệ số đồng dạng di truyền càng cao, hiện tượng “lại giống” có thể xảy ra làm giảm sức sống, cây dễ bị sâu bọ và các mầm bệnh tấn công trên diện rộng đe dọa sự tồn tại của quần thể Cóc trắng tại rừng Cần Giờ. Do đó, việc có kế hoạch cụ thể để khoanh nuôi, tái sinh, trồng mới cây Cóc trắng, ví dụ như lấy cây ở các tiểu khu 21 và 10 trồng xen vào các tiểu khu 2B, 6B, 7 và ngược lại để tăng tính đa dạng di truyền của quần thể loài cây này là cần thiết, giúp quần thể Cóc trắng có thể tồn tại lâu dài, giữ nguyên và làm phong phú hơn sinh cảnh và sự đa dạng sinh học của rừng.

Chương 5

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1. Kết luận

Từ các kết quả thu chúng tôi rút ra một số kết luận như sau:

- Sử dụng lá trưởng thành và nghiền lá trong N₂ lỏng để thu được DNA có chất lượng tốt, đủ tiêu chuẩn dùng trong các bước phân tích tiếp theo.

Quá trình bảo quản DNA lâu dài ảnh hưởng đến chất lượng DNA, làm phân hủy DNA. Do đó nên giữ nhiệt độ ổn định trong suốt quá trình bảo quản. DNA ly trích xong nên sử dụng thực hiện phản ứng RAPD ngay.

- Primer OPAC10 có khả năng tạo đa hình với cây Cóc trắng, tạo hai band đa hình và bốn band đồng hình. Hai band đồng hình ở kích thước 700 bp và 800 bp có thể là chỉ thị phân tử cho cây Cóc trắng.
- Quần thể Cóc trắng tại Khu dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ có hệ số đồng dạng di truyền cao trên cây phân loại (từ 0,5 – 1), độ đa dạng di truyền thấp. Càng về sau thì hệ số đồng dạng di truyền càng cao, độ đa dạng di truyền càng giảm. Do đó cần có sự can thiệp của con người giúp trồng mới rừng, cải thiện sự đa dạng di truyền của quần thể cây ngập mặn, trong đó có Cóc trắng.

5.2. Đề nghị

- Có kế hoạch điều tra thu thập số liệu cụ thể về nguồn gốc giống cây Cóc trắng tại các tiểu khu, số năm tuổi, tình trạng quần thể hiện nay để phục vụ cho công tác thu mẫu nghiên cứu được tốt hơn.
- Tối ưu hóa quy trình RAPD trên cây Cóc trắng để có một quy trình ổn định cho hiệu quả cao.
- Khảo sát thêm các primer khác để tìm ra được primer tạo độ đa hình cao trên cây Cóc trắng. Thực hiện phản ứng RAPD trên lượng mẫu lớn hơn nhằm đánh giá một cách chính xác hơn mức độ đa dạng di truyền của quần thể Cóc trắng tại Khu dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ.
- Tách riêng band 700 bp và 800 bp khi thực hiện phản ứng RAPD với primer OPAC10 để giải trình tự nhằm phân biệt loài Cóc trắng với các loài khác thuộc họ *Combretaceae* trong rừng ngập mặn.
- Kết hợp thêm việc nghiên cứu đa dạng di truyền của cây Cóc đỏ (*Lumnitzera littorea*) là loài cây quý hiếm trong Sách đỏ để xác định độ tương đồng của bộ gene hai loài này, xác định thêm chỉ thị phân tử cho chi *Lumnitzera*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TÀI LIỆU TIẾNG VIỆT

1. Nguyễn Quỳnh Anh, 2005. *Bước đầu đánh giá mức độ đa dạng di truyền của quần thể điều (Anacardium occidentale L.) tại tỉnh Bà Rịa – Vũng Tàu bằng kỹ thuật RAPD và AFLP*. Luận văn tốt nghiệp Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh. 83 trang.
2. Phạm Văn Bình, 2005. *Đánh giá sơ bộ mức độ đa dạng di truyền của quần thể điều (Acanardium occidentale L) hiện được trồng tại tỉnh Ninh Thuận bằng kỹ thuật RAPD và AFLP*. Luận văn tốt nghiệp Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh. 59 trang.
3. Trịnh Đình Đạt, 2006. *Công nghệ sinh học – tập bốn – Công nghệ di truyền*. Nhà xuất bản Giáo Dục, TP. Hồ Chí Minh. 171 trang.
4. Hồ Huỳnh Thùy Dương, 2003. *Sinh học phân tử*. Nhà xuất bản Giáo Dục, TP Hồ Chí Minh. 301 trang.
5. Phạm Thành Hồ, 1998. *Di truyền học*. Nhà xuất bản Giáo Dục, TP. Hồ Chí Minh. 612 trang.
6. *Khôi phục và phát triển bền vững hệ sinh thái Rừng ngập mặn Cần Giờ TP. Hồ Chí Minh (1978 - 2000). Giải thưởng Hồ Chí Minh về Khoa học và Công nghệ năm 2005*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, TP. Hồ Chí Minh, 2006. 134 trang.
7. Nguyễn Thị Lang, 2002. *Phương pháp cơ bản trong nghiên cứu Công nghệ sinh học*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, TP. Hồ Chí Minh. 219 trang.
8. Nguyễn Thị Lang, Bùi Chí Bửu, 2005. *Sinh học phân tử giới thiệu phương pháp và ứng dụng*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, TP. Hồ Chí Minh. 238 trang.
9. Lâm Vỹ Nguyên, 2006. *Nghiên cứu sự đa dạng di truyền của cây đước đôi (Rhizophora apiculata BLUME) ở Khu dự trữ sinh quyển Rừng ngập mặn Cần Giờ bằng kỹ thuật RAPD*. Luận văn tốt nghiệp Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh. 55 trang.
10. Nguyễn Tấn Việt, 2006. *Rừng Cần Giờ, bây giờ cần gì?.* Sài Gòn Giải Phóng thứ bảy: **số ra ngày 19/08/2006.**

TÀI LIỆU TIẾNG NƯỚC NGOÀI

11. Ambike Baldev Gaikwad. *Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) technique*. National Bureau of Plant Genetic Resources, New Delhi-12.
12. IPGR and Cornell University, 2003. *Using molecular marker technology in studies on plant genetic diversity – AFLP*

TRANG WEB

13. <http://www.amazon.com>.
14. <http://www.appliedbiosystem.com>.
15. <http://avery.rutgers.edu/WSSP/StudentScholar/project/archives/onio/poly.htm>
16. <http://www.indian-ocean.org/bioinformatics/mangrove/mangcd/fightm/PF17.htm>
17. <http://www.mangrove.or.jp>
18. <http://www.mekonginfo.org/>
19. <http://www.nea.gov.vn/nIndex.asp?ID=20263>
20. <http://www.vacne.org.vn/HoiVien/CanGio1.htm>
21. <http://vnexpress.net/Vietnam/Khoa-hoc/2001/07/3B9B2091>.
22. <http://zipcodezoo.com/>

PHỤ LỤC

Bảng 1. Danh sách các mẫu Cóc trắng thu thập tại Khu dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ

| MẪU | TIÊU KHU | TỌA ĐỘ ĐỊA LÝ | ĐẶC ĐIỂM |
|-------|--------------|----------------------------|---|
| 17L1 | 17 | 48P 0708583 UTM 1150288 | Chiều cao 2.5 m, đường kính 15 cm Lá nhỏ, có nhiều đốm nâu. Có nhiều trái, không có hoa |
| 17L2 | 17 | 48P 0707988 UTM 1150623 | Chiều cao 5 m, đường kính 20 cm. Lá to, xanh tốt, bị sâu ăn lá. Có nhiều trái, không có hoa. |
| 17L3 | 17 | 48P 0707448 UTM 1152105 | Chiều cao 10 m, gốc to, phân nhiều cành từ gốc nên không xác định được đường kính Lá nhỏ, có nhiều đốm nâu. Có nhiều trái, có ít hoa. |
| 21L4 | 21 | 48P 0706752 UTM 1154072 | Chiều cao 1.5 m, đường kính 5 cm. Lá nhỏ, có nhiều đốm nâu, lá bị sâu ăn. Có nhiều trái, ít hoa. |
| 17L5 | 17 | 48P 0706678 UTM 1154972 | Chiều cao 5 m, đường kính 10 cm. Lá xanh tốt, bị sâu ăn. Có ít trái, ít hoa. |
| 21L6 | 21 | 48P 0706898 UTM 1156443 | Chiều cao 8 m, đường kính 15 cm. Lá có nhiều đốm nâu. Trái rất nhiều, không hoa. |
| 21L7 | 21 | 48P 0706380 UTM 1157741 | Chiều cao 10 m, đường kính 20 cm. Lá nhiều đốm nâu. Có nhiều trái, không có hoa. |
| 11L8 | 11 (trái) | 48P 0705765 UTM 1158774 | Chiều cao 5 m, đường kính 5 cm. Lá xanh tốt. Có ít trái, có hoa. |
| 11L9 | 11 (phải) | 48P 0705441 UTM 1159250 | Chiều cao 10 m, đường kính 25 cm. Lá xanh tốt, có ít đốm nâu. Có trái, không có hoa. |
| 11L10 | 11 (phải) | 48P 0705161 UTM 1159715 | Chiều cao 10 m, đường kính 5 cm. Lá rậm rạp, xanh tốt, có ít đốm nâu. Có trái, có hoa. |
| 11L11 | 11 (trái) | 48P 0704781 UTM 1160407 | Chiều cao 1.5 m, đường kính 3 cm. Lá thưa, xanh tốt, ít đốm nâu. Có nhiều trái, có hoa. |
| 11L12 | 11 | 48P 0704086 | Chiều cao 1.5 m, đường kính 3 cm. |

| | | | |
|--------|--------------|----------------------------|--|
| | (trái) | UTM 1161940 | Lá có nhiều đốm nâu, bị sâu ăn. Có nhiều trái, không có hoa. |
| 10L13 | 10 (phải) | 18P 0703881 UTM 1162362 | Chiều cao 5 m, đường kính 15 cm. Lá rậm rạp, xanh tốt, có ít đốm nâu, Có nhiều trái, không có hoa. |
| 10L14 | 10 (phải) | 48P 0703258 UTM 1163077 | Chiều cao 5 m, đường kính 10 cm. Lá rậm rạp, xanh tốt. Có nhiều trái, không có hoa. |
| 10L15 | 10 (phải) | 48P 0702913 UTM 1163559 | Chiều cao 3 m, đường kính 3 cm. Lá nhỏ, nhiều đốm nâu, bị sâu ăn. Có quả, có hoa. |
| 10L16 | 10 (phải) | 48P 0702489 UTM 1164263 | Chiều cao 1 m, đường kính 3 cm. Lá thưa, có nhiều đốm nâu, bị sâu ăn. Có ít trái, không có hoa. |
| 10L17 | 10 (trái) | 48P 0701380 UTM 1165102 | Chiều cao 1 m, đường kính 3 cm. Lá có nhiều đốm nâu. Có trái, không có hoa. |
| 5BL18 | 5B | 48P 0700650 UTM1166971 | Chiều cao 2m, đường kính 5 cm. Lá xanh tốt. Không có trái, không có hoa. |
| 5BL19 | 5B | 48P 0699673 UTM 1169617 | Chiều cao 10 m, đường kính 7 cm. Lá xanh tốt, ít đốm nâu. Không có trái, có hoa. |
| 10BL20 | 10B | 48P 0704645 UTM 1161886 | Lá xanh tốt, có ít đốm nâu. Có trái, không có hoa. |
| 10BL21 | 10B | 48P 0704353 UTM 1162004 | Lá rậm rạp, có nhiều đốm nâu. Có trái, có hoa. |
| 10AL22 | 10A | 48P 0704558 UTM 1162782 | Lá xanh tốt, không có đốm nâu. Có trái, không có hoa. |
| 6BL23 | 6B | 48P 0705498 UTM 1163894 | Lá thưa thớt, xanh tốt, có ít đốm nâu. Không có trái, không có hoa. |
| 6BL24 | 6B | 48P 0705911 UTM 1163727 | Cây cao khẳng khiu, nhiều cành khô xơ. Lá thưa thớt, xanh tốt, có ít đốm nâu. Không có trái, không có hoa. |
| 6BL25 | 6B | 48P 0706393 UTM 1163652 | Lá rậm rạp, xanh tốt. Có trái, không có hoa. |
| 6BL26 | 6B | 48P 0706852 UTM 1163693 | Lá xanh tốt, có ít đốm nâu, lá bị sâu ăn. Có trái, có hoa. |
| 6BL27 | 6B | 48P 0707424 UTM 1163700 | Lá rậm rạp, xanh tốt, không có đốm nâu. Có trái, không có hoa. |
| 6BL28 | 6B | 48P 0707851 UTM 1163576 | Lá xanh tốt, không có đốm nâu. Không có trái, không có hoa. |
| 6BL29 | 6B | 48P 0708195 UTM 1163468 | Lá xanh tốt, không có đốm nâu. Có trái, không có hoa. |

| | | | |
|-------|----|----------------------------|---|
| 6BL30 | 6B | 48P 0709080 UTM 1163798 | Cây khẳng khiu, phân nhiều nhánh, cành khô. Lá thưa, xanh tốt, không có đốm nâu. Không có trái, có hoa. |
| 13L31 | 13 | 48P 0709814 UTM 1164396 | Lá thưa, xanh tốt, không có đốm nâu. Không có trái, không có hoa. |
| 7L32 | 7 | 48P 0710845 UTM 1165053 | Lá xanh tốt, không có đốm nâu. Có trái, không có hoa. |
| 7L33 | 7 | 48P 0711177 UTM 1165656 | Cây nhiều cành nhánh. Lá xanh tốt, không có đốm nâu. Có trái, có hoa. |
| 7L34 | 7 | 48P 0711348 UTM 1166061 | Lá xanh tốt, không có đốm nâu. Có trái, không có hoa. |
| 7L35 | 7 | 48P 0711394 UTM 1166150 | Lá xanh tốt, có đốm nâu. Có trái, không có hoa. |
| 7L36 | 7 | 48P 0711567 UTM 1166474 | Lá nhỏ, xanh tốt, không có đốm nâu. Có trái, không có hoa. |
| 7L37 | 7 | 48P 0711726 UTM 1166759 | Lá xanh tốt, không có đốm nâu. Có trái, không có hoa. |
| 2BL38 | 2B | 48P 0711903 UTM 1167160 | Lá rậm rạp, xanh tốt, không có đốm nâu. Có trái, không có hoa. |
| 7L39 | 7 | 48P 0712166 UTM 1167209 | Lá xanh tốt, có ít đốm nâu. Có trái to, không có hoa. |
| 2BL40 | 2B | 48P 0712389 UTM 1167331 | Lá xanh tốt, không có đốm nâu. Có trái, không có hoa. |
| 7L41 | 7 | 48P 0713150 UTM 1167524 | Lá xanh tốt, không có đốm nâu. Không có trái, không có hoa. |
| 7L42 | 7 | 48P 0714263 UTM 1168125 | Lá xanh tốt, không có đốm nâu. Có trái, không có hoa. |
| 2BL43 | 2B | 48P 0714899 UTM 1168188 | Lá xanh tốt, không có đốm nâu. Có trái, không có hoa. |
| 2BL44 | 2B | 48P 0713738 UTM 1170168 | Lá xanh tốt, có nhiều đốm nâu. Có trái, không có hoa. |
| 2BL45 | 2B | 48P 0712365 UTM 1170955 | Cành lá sum suê, có ít đốm nâu. Có trái, không có hoa. |

Bảng 2. Giá trị OD của các mẫu ly trích theo quy trình 1

| STT | TÊN MẪU | TỶ LỆ | Abs <260 nm> | Abs <280 nm> |
|-----|---------|---------|--------------|--------------|
| 1 | 21L7 | 1,35870 | 0,35140 | 0,25863 |
| 2 | 11L12 | 1,47090 | 0,31942 | 0,21717 |
| 3 | 10L14 | 1,37410 | 0,16093 | 0,11712 |
| 4 | 10L16 | 1,25410 | 0,20660 | 0,16474 |
| 5 | 10BL20 | 1,25280 | 0,20780 | 0,16586 |
| 6 | 10BL21 | 1,41340 | 0,42324 | 0,29945 |
| 7 | 10AL22 | 1,36460 | 0,37607 | 0,27560 |
| 8 | 6BL23 | 1,35540 | 0,35472 | 0,26170 |
| 9 | 6BL24 | 1,36040 | 0,35592 | 0,26164 |
| 10 | 6BL25 | 1,36130 | 0,33904 | 0,24906 |

Bảng 3. Giá trị OD của các mẫu ly trích theo quy trình 2

| STT | TÊN MẪU | TỶ LỆ | Abs<260 nm> | Abs<280 nm> |
|-----|---------|---------|-------------|-------------|
| 1 | 21L6 | 1,63470 | 0,14783 | 9,0428 E-2 |
| 2 | 21L7 | 2,04280 | 0,18781 | 9,1937 E-2 |
| 3 | 11L11 | 1,51890 | 0,28739 | 0,18921 |
| 4 | 11L12 | 1,97540 | 0,19388 | 9,8145 E-2 |
| 5 | 10L14 | 1,46500 | 0,32831 | 0,22448 |
| 6 | 10L16 | 2,01140 | 0,18798 | 9,3460 E-2 |
| 7 | 5BL18 | 1,64890 | 0,34692 | 0,21040 |
| 8 | 5BL19 | 1,3690 | 0,16403 | 0,11982 |
| 9 | 10BL20 | 1,80010 | 0,13046 | 7,2470 E-2 |
| 10 | 10BL21 | 2,00030 | 0,19039 | 9,5182 E-2 |
| 11 | 10AL22 | 1,56970 | 0,24052 | 0,15323 |
| 12 | 6BL23 | 1,67880 | 0,13645 | 8,1275 E-2 |
| 13 | 6BL24 | 2,02680 | 0,18795 | 9,2736 E-2 |
| 14 | 6BL25 | 1,52650 | 0,28197 | 0,18471 |

Bảng 4. Giá trị OD của các mẫu ly trích theo quy trình 3

| STT | TÊN MẪU | TỶ LỆ | Abs<260 nm> | Abs<280 nm> |
|-----|---------|---------|-------------------|-------------|
| 1 | 17L1 | | Không cho kết quả | |
| 2 | 17L2 | | Không cho kết quả | |
| 3 | 17L3 | | Không cho kết quả | |
| 4 | 21L4 | | Không cho kết quả | |
| 5 | 17L5 | | Không cho kết quả | |
| 6 | 21L6 | 1,85950 | 9,9663 E-2 | 5,3596 E-2 |
| 7 | 21L7 | 2,00540 | 9,8450 E-2 | 4,9093 E-2 |
| 8 | 11L8 | | Không cho kết quả | |
| 9 | 11L9 | | Không cho kết quả | |
| 10 | 11L10 | | Không cho kết quả | |
| 11 | 11L11 | 1,61780 | 0,15273 | 9,4405 E-2 |
| 12 | 11L12 | 2,05230 | 0,14587 | 7,1075 E-2 |
| 13 | 10L13 | | Không cho kết quả | |
| 14 | 10L14 | 2,09790 | 0,15192 | 7,2417 E-2 |
| 15 | 10L15 | 1,78460 | 0,26338 | 0,14759 |
| 16 | 10L16 | 1,98180 | 9,1039 E-2 | 4,5937 E-2 |
| 17 | 10L17 | 1,54030 | 0,24343 | 0,15804 |
| 18 | 5BL18 | 1,95020 | 6,8969 E-2 | 3,5365 E-2 |
| 19 | 5BL19 | 1,98150 | 6,2750 E-2 | 3,1669 E-2 |
| 20 | 10BL20 | 2,11070 | 1,6807 E-2 | 7,9627 E-2 |
| 21 | 10BL21 | 2,18210 | 2,5607 E-2 | 1,1735 E-2 |
| 22 | 10AL22 | 2,16600 | 2,5790 E-2 | 1,1907 E-2 |
| 23 | 6BL23 | 2,03590 | 0,14718 | 7,2293 E-2 |
| 24 | 6BL24 | 1,91300 | 0,12156 | 6,3545 E-2 |
| 25 | 6BL25 | 2,08880 | 0,15239 | 7,2957 E-2 |
| 26 | 6BL26 | 2,02050 | 0,11123 | 5,5050 E-2 |
| 27 | 6BL27 | 1,83270 | 7,9355 E-2 | 4,330 E-2 |
| 28 | 6BL28 | 1,84070 | 7,8523 E-2 | 4,2660 E-2 |
| 29 | 6BL29 | 2,03000 | 8,8066 E-2 | 4,3383 E-2 |
| 30 | 6BL30 | 2,03360 | 8,7981 E-2 | 4,3263 E-2 |
| 31 | 13L31 | 2,04050 | 0,10603 | 5,1963 E-2 |
| 32 | 7L32 | 1,96280 | 0,12397 | 6,3162 E-2 |
| 33 | 7L33 | 2,04170 | 0,18972 | 9,2922 E-2 |
| 34 | 7L34 | 1,97520 | 0,12302 | 6,2280 E-2 |
| 35 | 7L35 | 2,01925 | 0,18792 | 9,3068 E-2 |
| 36 | 7L36 | 2,16300 | 2,0506 E-2 | 9,4805 E-2 |
| 37 | 7L37 | 1,80010 | 0,13046 | 7,2470 E-2 |
| 38 | 2BL38 | 2,23550 | 1,9769 E-2 | 8,8434 E-2 |
| 39 | 7L39 | 1,96040 | 0,12060 | 6,1522 E-2 |

| | | | | |
|----|-------|-------------------|------------|------------|
| 40 | 2BL40 | 2,0976 | 3,6278 E-2 | 1,7295 E-2 |
| 41 | 7L41 | 1,88520 | 2,2685 E-2 | 1,2033 E-2 |
| 42 | 7L42 | 1,98990 | 0,11276 | 5,6663 E-2 |
| 43 | 2BL43 | 1,64770 | 0,34552 | 0,20970 |
| 44 | 2BL44 | 1,53290 | 0,26463 | 0,17263 |
| 45 | 2BL45 | Không cho kết quả | | |

Bảng 5. Ma trận nhị phân mã hóa sản phẩm phản ứng RAPD của thí nghiệm 4

| Mẫu Locus | 6B 25 | 6B 29 | 7L 33 | 7L 34 | 7L 36 | 2BL 38 | 2BL 40 | 7L 42 | 21L 7 | 10L 14 | 10BL 20 |
|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|----------|----------|-----------|------------|
| 1000 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 800 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 700 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 450 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 300 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 150 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |