

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

LÂM VỸ NGUYỄN

**NGHIÊN CỨU SỰ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA
CÂY ĐƯỚC ĐÔI (*Rhizophora apiculata* BLUME.)
Ở KHU DỰ TRỮ SINH QUYỀN RỪNG NGẬP MẶN CẦN GIỜ
BẰNG KỸ THUẬT RAPD**

**Luận văn kỹ sư
Chuyên ngành: Công Nghệ Sinh Học**

**Thành phố Hồ Chí Minh
Tháng 8/2006**

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

**NGHIÊN CỨU SỰ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA
CÂY ĐUỐC ĐÔI (*Rhizophora apiculata* BLUME.) Ở KHU DỰ
TRỮ SINH QUYỂN RỪNG NGẬP MẶN CẦN GIỜ BẰNG KỸ
THUẬT RAPD**

**Luận văn kỹ sư
Chuyên ngành: Công Nghệ Sinh Học**

**Giáo viên hướng dẫn:
TS. BÙI MINH TRÍ
TS. VIÊN NGỌC NAM**

**Sinh viên thực hiện:
LÂM VỸ NGUYỄN**

**Thành phố Hồ Chí Minh
Tháng 8/2006**

**MINISTRY OF EDUCATION AND TRAINING
NONG LAM UNIVERSITY, HCMC
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY**

**STUDYING GENETIC DIVERSITY OF THE MANGROVE
TREE (*Rhizophora apiculata* Blume.) IN CAN GIO MANGROVE
BIOPHERE RESERVE BY RAPD-PCR**

**Engineer Thesis
Major: Biotechnology**

**Research adviser
BÙI MINH TRÍ, PhD
VIÊN NGỌC NAM, PhD**

**Researcher
LÂM VỸ NGUYỄN
Term: 2002 - 2006**

HCMC, 09/2006

LỜI CẢM ƠN

Con xin cảm ơn ba mẹ cùng gia đình đã nuôi con đến ngày khôn lớn và cho con ăn học thành tài.

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 học.

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, Thầy Viên Ngọc Nam đã tận tình chỉ dẫn em trong suốt quá trình thực hiện khóa luận.

Chị Phan Đăng Thái Phương đã hết lòng hướng dẫn em trong quá trình thực hiện khóa luận.

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.

Anh Quy cùng các anh, chị trong phòng Kỹ thuật thuộc Ban quản lý Rừng phòng hộ Cần Giờ đã tận tình giúp đỡ em trong quá trình thu thập mẫu.

Xin cảm ơn các bạn lớp Công Nghệ Sinh Học 28 đã cùng tôi chia sẻ biết bao niềm vui, nỗi buồn trong suốt 4 năm đại học.

Xin chân thành cảm ơn!

LÂM VỸ NGUYỄN

TÓM TẮT

LÂM VỸ NGUYỄN, Đại Học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh. Tháng 8/2006.
“NGHIÊN CỨU SỰ ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA CÂY ĐƯỚC ĐÔI (*Rhizophora apiculata* BLUME.) Ở KHU DỰ TRỮ SINH QUYỀN RỪNG NGẬP MẶN CẦN GIỜ BẰNG KỸ THUẬT RAPD”.

Hội đồng hướng dẫn:

TS. BÙI MINH TRÍ

TS. VIÊN NGỌC NAM

Cây đước đôi (*Rhizophora apiculata* Blume.) là cây có giá trị về kinh tế và môi trường rất cao. Tại Thành phố Hồ Chí Minh, rừng đước tại Khu Dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ được xem là “lá phổi xanh của thành phố” với chức năng điều hoà không khí, giảm ô nhiễm và hấp thu CO₂ do các hoạt động công nghiệp thải ra. Tuy nhiên, sau gần 30 năm phát triển rừng đước tại Khu Dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ, TP Hồ Chí Minh đã xuất hiện dấu hiệu lụi tàn (Viên Ngọc Nam và cộng sự, 2005). Vì vậy việc xây dựng chiến lược phát triển lâu dài đem lại hiệu quả kinh tế và môi trường cao, vấn đề đánh giá tổng quát quỹ gene và mức độ đa dạng của quần thể đước tại Khu Dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ, TP Hồ Chí Minh được xem là một việc làm cấp thiết. Song song với quá trình xác định đa dạng di truyền của quần thể để từ đó có chiến lược cụ thể cho việc bảo vệ nguồn gene đối với cây đước đôi, chúng ta cũng có thể tìm ra các chỉ thị phân tử (molecular marker) và phát triển chúng thành những công cụ hữu hiệu cho phép rút ngắn thời gian của quá trình chọn, tạo giống phục vụ cho công tác trồng rừng.

Những kết quả đạt được:

- Thu thập được 45 mẫu lá đước với những đặc điểm hình thái khác nhau.
- Xác định điều kiện tối ưu để bảo quản mẫu lá đước.
- Hoàn thiện quy trình ly trích DNA từ lá đước.
- Bước đầu xây dựng quy trình RAPD phù hợp cho cây đước. Qua thử nghiệm trên primer 11 (OPN 06) và primer 5 (OPA 05) thì thấy primer 11 cho sản phẩm thể hiện sự đa dạng về di truyền cao.

- Kết quả chạy RAPD với primer 5 chỉ cho 1 band đồng hình kích thước 600 bp. Kết quả này không thể dùng để nghiên cứu sự đa dạng di truyền.
- Kết quả chạy RAPD với primer 11 cho trung bình 3,5 band/mẫu. Số lượng band/mẫu không cao nhưng lại thể hiện rõ sự đa hình giữa các mẫu. Chúng tôi thu được 8 band đa hình chiếm tỷ lệ 88,9% và 1 band đồng hình chiếm tỷ lệ 11,1%. Kết quả phân tích trên phần mềm NTSYS (Numerical Taxonomy System) phiên bản 2.1, 7 mẫu được khảo sát được chia làm 2 nhóm chính với khoảng cách phân nhóm là 0,41. Nhóm 1 gồm 6 mẫu: 78RA01, 78RA02, 79RA01, 80RA01, 80RA02, 91RA01. Đây là những mẫu được lấy từ những cây trồng từ nguồn giống tại Cà Mau. Các cây này có hệ số đồng dạng di truyền cao từ 0,66 – 0,89. Các cây trồng cùng năm có hệ số đồng dạng di truyền là 0,89. Nhóm 2 chỉ có 1 mẫu 96RA01 được trồng từ nguồn giống tại Cần giờ.
- Phân tích kết quả RAPD với primer 11 cho thấy đã có sự phân ly và lai chéo giữa các cây được đôi trong quần thể. Điều này sẽ làm phong phú thêm sự đa dạng di truyền trong quần thể được đôi tại rừng Cần Giờ.

MỤC LỤC

CHƯƠNG	TRANG
Trang tựa.....	ii
Trang tựa tiếng Anh.....	iii
Lời cảm tạ.....	iv
Tóm tắt.....	v
Mục lục.....	vii
Danh sách các chữ viết tắt.....	ix
Danh sách các hình.....	x
Danh sách các bảng và sơ đồ.....	xi
PHẦN 1: MỞ ĐẦU	1
1.1. Đặt vấn đề.....	1
1.2. Mục đích.....	2
1.3. Yêu cầu.....	2
1.4. Giới hạn của đề tài.....	2
PHẦN 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 Vai trò của 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 của Khu Dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ.....	7
2.1.4 Công tác quản lý Khu Dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ.....	8
2.2 Cây đước.....	11
2.2.1 Hình thái học.....	12
2.2.2 Nơi sống và sinh thái.....	13
2.2.3 Phân bố.....	13
2.2.4 Giá trị kinh tế.....	13
2.2.5 Tình trạng hiện nay.....	13
2.3 Quy trình ly trích DNA thực vật.....	14
2.3.1 Định lượng DNA ly trích bằng phương pháp quang phổ.....	15
2.3.2 Định tính DNA ly trích bằng phương pháp điện di.....	16
2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	17
2.4.1 Khái niệm.....	17
2.4.2 Thành phần và vai trò của các chất trong phản ứng PCR.....	17
2.4.3 Nguyên tắc của phản ứng PCR.....	18
2.4.4 Ứng dụng của kỹ thuật PCR.....	19
2.4.5 Ưu và nhược điểm của kỹ thuật PCR.....	19
2.4.5.1 Ưu điểm của kỹ thuật PCR.....	19
2.4.5.2 Nhược điểm của kỹ thuật PCR.....	19
2.5 Một số DNA marker sử dụng trong nghiên cứu sự đa dạng di truyền.....	19
2.5.1 Phân loại.....	19
2.5.2 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).....	20
2.5.3 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP).....	21
2.5.4 Microsatellite.....	21
2.5.5 Kỹ thuật RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA).....	22
2.5.5.1 Giới thiệu.....	22
2.5.5.2 Ứng dụng của kỹ thuật RAPD.....	24

2.5.6	Một số nghiên cứu về DNA marker trên cây đước.	25
2.6	Khái niệm đa dạng sinh học.	27
2.7	Khái niệm đa dạng di truyền.	28
PHẦN 3: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM		30
3.1	Thời gian và địa điểm thực hiện.	30
3.1.1	Thời gian thực hiện.	30
3.1.2	Địa điểm thực hiện.	30
3.2	Vật liệu thí nghiệm.	30
3.3	Phương pháp thí nghiệm.	31
3.3.1	Quy trình ly trích DNA.	31
3.3.1.1	Vật liệu dùng trong ly trích DNA.	31
3.3.1.2	Quy trình ly trích DNA.	34
3.3.1.3	Kiểm tra kết quả ly trích DNA.	35
3.3.2	Thực hiện kỹ thuật RAPD.	36
3.3.2.1	Dụng cụ và hóa chất dùng trong kỹ thuật RAPD	36
3.3.2.1	Bố trí thí nghiệm.	37
PHẦN 4: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN		41
4.1	Kết quả thu thập mẫu đước 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	Kết quả chạy RAPD.	47
4.3.1	Thí nghiệm 1: Sử dụng primer 11 với chu kỳ nhiệt 1	47
4.3.2	Thí nghiệm 2: Sử dụng primer 5 với chu kỳ nhiệt 2.	48
4.3.3	Thí nghiệm 3: Sử dụng primer 11 với chu kỳ nhiệt 2	49
PHẦN 5: KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ		51
5.1	Kết luận.	51
5.2	Đề nghị.	52
TÀI LIỆU THAM KHẢO		53
PHỤ LỤC		55

DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT

bp: Base pair

DNA: Deoxyribonucleic acid

dNTP: Deoxynucleotide triphosphate

EDTA: Ethylene diaminetetra acetic acid

EtBt: Ethidium bromide

OD: Optical density

PCR: Polymerase chain reaction

RNA: Ribonucleic acid

RNase: Ribonuclease

T_a: Annealing temperature

T_m: Melting temperature

UV: Ultra Violet

TE: Tris EDTA.

TAE: Tris Glacial Acetic Acid EDTA.

RAPD: Random Amplified Polymorphism of DNA.

UNESCO: United Nations Educational Scientific, and Cultural Organization

DANH SÁCH CÁC HÌNH

Hình 2.1: Bản đồ Khu Dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ.....	5
Hình 2.2: Cấu trúc thân, rễ, lá, trái và hoa đước	11
Hình 2.3: Cây đước đôi (<i>Rhizophora apiculata</i> Blume)	11
Hình 2.4: Sản phẩm RAPD trên 10 loài thuộc họ đước (Rhizophoreae) trong rừng ngập mặn ở Ấn Độ với 4 primer: (A) OPD 18; (B) OPD 20; (C) OPA 04; (D) OPA 01	26
Hình 2.5: Cây di truyền giữa 10 loài thuộc họ đước (Rhizophoreae) trong rừng ngập mặn ở Ấn Độ	27
Hình 4.1: Hoa đước	41
Hình 4.2: Vị trí lấy mẫu trên bản đồ Cần Giờ	41
Hình 4.3: Cây đước đôi có cả trái màu xanh và trái màu đỏ	42
Hình 4.4: Phần lá non dùng để ly trích DNA	44
Hình 4.5: Sự khác biệt giữa DNA mẫu ly trích theo quy trình của Doyle (quy trình 1) và mẫu ly trích theo quy trình cải tiến (quy trình 2)	45
Hình 4.6: Các mẫu DNA ly trích đước theo hai quy trình ly trích	45
Hình 4.7: Sản phẩm PCR ở thí nghiệm 1	47
Hình 4.8: Sản phẩm PCR thí nghiệm 2	48
Hình 4.9: Sản phẩm PCR của thí nghiệm 3	49
Hình 4.10: Cây phân loài một số cây đước đôi tại Khu Dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ.	50

DANH SÁCH CÁC BẢNG

TÊN BẢNG	TRANG
Bảng 2.1: Sự phân tách các đoạn DNA trong gel agarose có nồng độ khác nhau	16
Bảng 2.2: Sự phân tách các đoạn DNA trong gel polyacrylamide có nồng độ khác nhau	16
Bảng 2.3: Các loại marker DNA (Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang, 2005).....	20
Bảng 2.4: Mối quan hệ di truyền giữa cây đước đôi (<i>Rhizophora apiculata</i> Blume.) và cây đưng (<i>Rhizophora mucronata</i>) khi phân tích bằng các primer khác nhau	25
Bảng 3.1 Thành phần hóa chất sử dụng trong phản ứng RAPD ở thí nghiệm 1	37
Bảng 3.2 Chu kỳ nhiệt cho phản ứng RAPD của thí nghiệm 1	37
Bảng 3.3 Thành phần hóa chất sử dụng trong phản ứng RAPD ở thí nghiệm 2	38
Bảng 3.4 Chu kỳ nhiệt cho phản ứng RAPD của thí nghiệm 2.....	38
Bảng 3.5 Thành phần hóa chất sử dụng trong phản ứng RAPD ở thí nghiệm 3	39
Bảng 3.6 Chu kỳ nhiệt cho phản ứng RAPD của thí nghiệm 3.....	39

DANH SÁCH CÁC SƠ ĐỒ

Sơ đồ 4.1 Quy trình cải tiến ly trích DNA từ lá đước	46
--	----

PHẦN 1: MỞ ĐẦU

Đặt vấn đề.

Cây đước đôi hay đước (*Rhizophora apiculata* Blume.) là cây có giá trị về kinh tế và môi trường rất cao. Đước có khả năng giữ đất, tránh xói mòn ở những cửa sông; là cây tiên phong ở những vùng ngập mặn ở cửa sông. Gỗ đước cứng, khá bền, dùng tốt trong xây dựng, đóng đồ đạc, chống lò, cho than ít khói, nhiệt lượng cao. Vỏ đước nhiều tanin để nhuộm lưới và thuộc da. Lá đước làm phân xanh, hoa nuôi ong. Quần thể đước là thành phần chính của rừng ngập mặn có vai trò chắn sóng gió, bảo vệ vùng ven biển, là nơi nuôi dưỡng và cung cấp thức ăn cho các loài hải sản có giá trị cao.

Hiện nay quần thể đước tại Khu Dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ, TP Hồ Chí Minh chủ yếu là tái sinh nhân tạo với nguồn giống đước lấy chủ yếu từ rừng Cà Mau. Qua gần 30 năm phát triển, quần thể đước tại Khu Dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ, TP Hồ Chí Minh đã xuất hiện dấu hiệu lụi tàn (Viên Ngọc Nam và cộng sự, 2005). Vì vậy để có chiến lược phát triển lâu dài đem lại hiệu quả kinh tế và môi trường cao, vấn đề đánh giá tổng quát quỹ gene và mức độ đa dạng của quần thể đước tại Khu Dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ, TP Hồ Chí Minh được xem là một việc làm cấp thiết. Song song với quá trình xác định đa dạng di truyền của quần thể để từ đó có chiến lược cụ thể cho việc bảo vệ nguồn gene đối với cây đước, chúng ta cũng có thể tìm ra các chỉ thị phân tử (molecular marker) và phát triển chúng thành những công cụ hữu hiệu cho phép rút ngắn thời gian của quá trình chọn, tạo giống phục vụ cho công tác trồng rừng, đảm bảo cho sự phát triển bền vững.

Được sự phân công của Bộ môn Công nghệ Sinh học – Trường Đại học Nông Lâm TP. HCM, dưới sự hướng dẫn của Thầy: TS. Bùi Minh Trí, TS. Viên Ngọc Nam chúng tôi đã tiến hành thực hiện đề tài: “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”

Mục đích.

- Thiết lập phương pháp ly trích DNA và bước đầu xây dựng quy trình RAPD thích hợp cho cây đước đôi.
- Đánh giá về mặt di truyền quần thể đước trồng tại Khu Dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ, TP Hồ Chí Minh.
- Ứng dụng trong tuyển chọn giống đước phục vụ cho việc tái tạo rừng ngập mặn trong tương lai.

Yêu cầu.

- Thu thập mẫu lá từ những cây đước đôi có tuổi khác nhau và có đặc điểm khác biệt như: thân cây to, cây mọc tốt, cây mọc yếu ớt, cây bị mối, cây có u, có màu sắc trái khác lạ ...
- Ly trích đước DNA từ mẫu lá đước với độ tinh sạch cao.
- Hoàn thiện kỹ thuật RAPD trên cây đước đôi.
- Bước đầu phân tích sự đa dạng di truyền của quần thể đước từ các mẫu thu thập đước bằng kỹ thuật RAPD.
- Vẽ cây phân loại loài bằng phần mềm NTSYS.

Giới hạn của đề tài.

- Đề tài chỉ tiến hành nghiên cứu đối với quần thể đước tại một số tiểu khu trong Khu Dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ, TP Hồ Chí Minh.
- Chỉ tiến hành chạy RAPD trên 2 primer.
- Thời gian thực hiện từ 10/02/2006 đến 01/08/2006.

PHẦN 2: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1 Giới thiệu về Khu Dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ.

2.1.1 Vai trò của Khu Dự trữ sinh quyển.

Chỉ trong vòng 5 năm (2000-2005) Việt Nam đã hòa nhập với các hoạt động quốc tế trong Chương trình Con người và Sinh quyển với sự đóng góp 4 Khu dự trữ sinh quyển. Các khu dự trữ sinh quyển này bao gồm các hệ sinh thái trên đất liền và các vùng ven biển được UNESCO công nhận đang thúc đẩy mối quan hệ cân bằng giữa con người và thiên nhiên.

Áp lực từ các hoạt động kinh tế do phải đáp ứng nhu cầu phát triển của đất nước, các vấn đề môi trường đang trở nên nghiêm trọng đối với các nguồn tài nguyên, đặc biệt là đất và nước, làm giảm đi rõ rệt sự đa dạng số loài động thực vật, cảnh quan và các hệ sinh thái. Sự suy giảm đa dạng sinh học lại đang tác động trở lại đối với cuộc sống hàng ngày của người dân như lương thực, thực phẩm, thuốc chữa bệnh, nguyên liệu cho công nghiệp, xây dựng... Vai trò của đa dạng sinh học trong cuộc sống của con người là không thể thay thế được nhất là đối với các hoạt động giáo dục, nghiên cứu khoa học. Các vùng lõi và vùng đệm của các khu dự trữ sinh quyển 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. Các khu dự trữ sinh quyển đang góp một 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.

Mỗi khu dự trữ sinh quyển là địa điểm lý tưởng cho các đề tài nghiên cứu về cấu trúc và động thái các hệ sinh thái tự nhiên, đặc biệt là ở các vùng lõi. Tạo điều kiện cho việc so sánh các hệ sinh thái tự nhiên với các hệ sinh thái bị biến đổi do các tác động của con người. Các nghiên cứu này có thể tiến hành theo dõi trong một thời gian dài trên cơ sở các trạm giám sát cho phép chúng ta thấy được những thay đổi theo thời gian cũng như các thay đổi hiện nay đang diễn ra trong nước và quốc tế.

Người dân sống trong các khu dự trữ sinh quyển vẫn được phép duy trì các hoạt động truyền thống của họ để tạo nguồn thu nhập hàng ngày qua việc sử dụng các biện pháp kỹ thuật bền vững về môi trường và văn hoá. Các biện pháp kỹ thuật và canh tác

truyền thống có một ý nghĩa hết sức quan trọng trong việc bảo tồn các loài sinh vật bản địa, đó chính là kho lưu trữ nguồn vốn gene di truyền phục vụ cho công tác chọn giống và di sản di truyền cho các thế hệ mai sau.

Các khu dự trữ sinh quyển đang tạo điều kiện dễ dàng cho việc trao đổi kinh nghiệm và chia sẻ kiến thức về phát triển bền vững tài nguyên thiên nhiên. Mục đích chính của các khu dự trữ sinh quyển là nghiên cứu và tìm ra các giải pháp sử dụng đất giúp cho việc nâng cao mức sống cho người dân mà không gây hại đến môi trường. Các khu dự trữ sinh quyển cũng là nơi chia sẻ kiến thức, kỹ năng và kinh nghiệm ở các qui mô quốc gia, khu vực và quốc tế. Đồng thời, các khu dự trữ sinh quyển đang tạo điều kiện dễ dàng cho việc hợp tác trong việc giải quyết các vấn đề trong quản lý tài nguyên thiên nhiên. Các khu dự trữ sinh quyển là những 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.

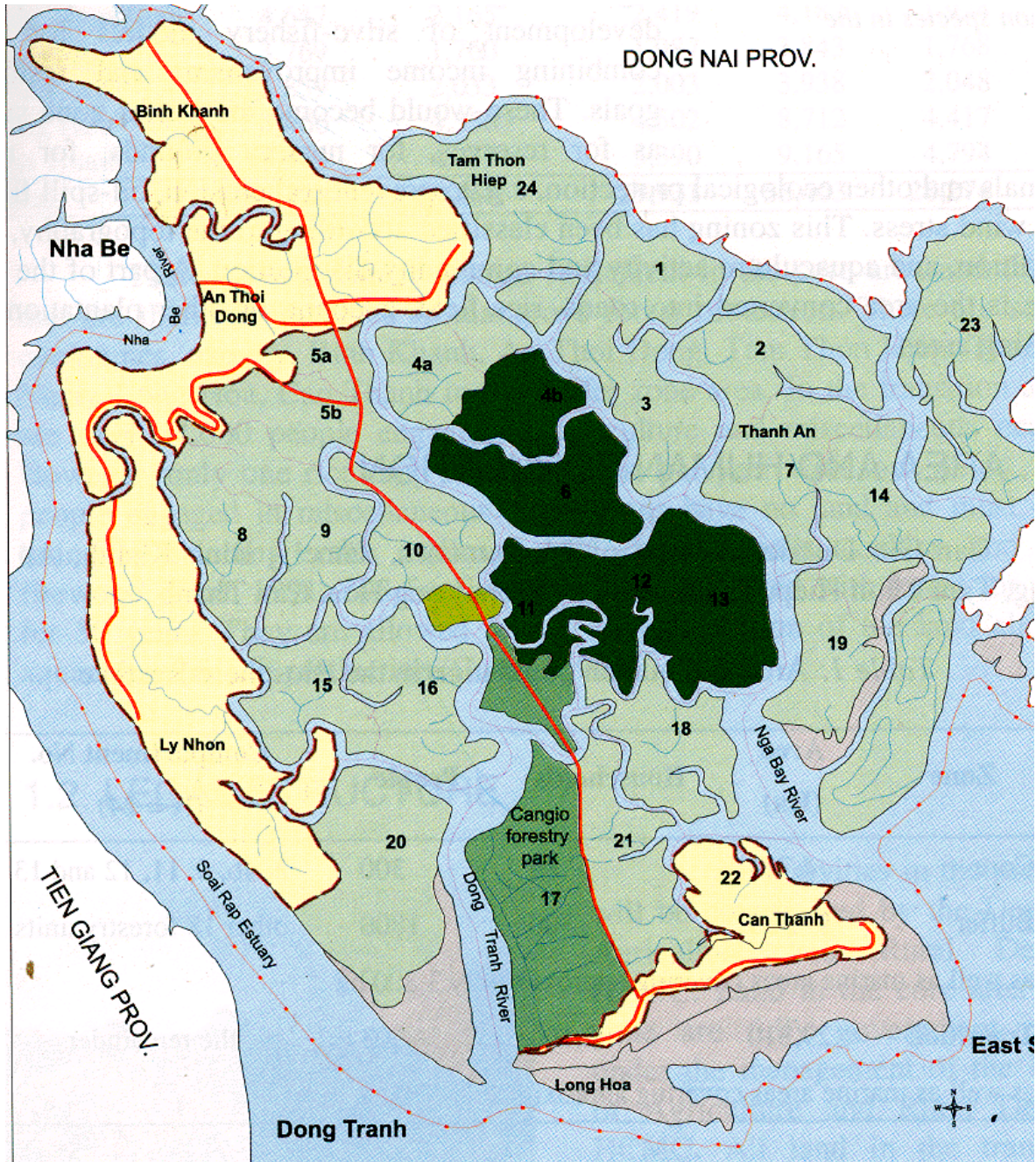
Vĩ độ Bắc: $10^{\circ}22'14'' - 10^{\circ}37'39''$

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

Ngày được UNESCO công nhận: 21/01/2000.

Tổng diện tích: 71.370 ha.

Dân số: 57.403 người .



Ghi chú:

- Vùng lõi
- Vùng đệm
- Vùng chuyển tiếp

Hình 2.1 Bản đồ Khu Dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ

Cách TP. Hồ Chí Minh 30-40km theo đường chim bay, rừng ngập mặn Cần Giờ được gọi là “Lá phổi xanh của Thành phố” với chức năng điều hoà không khí, giảm ô nhiễm và hấp thu CO₂ do các hoạt động công nghiệp. Khu Dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ được công nhận là Khu Rừng phòng hộ từ năm 1991. Ủy ban nhân dân Thành phố Hồ Chí Minh đã phê duyệt dự án đầu tư xây dựng Khu Bảo tồn thiên nhiên rừng ngập mặn Cần Giờ giai đoạn 2002-2011 theo Quyết định số 8413/QĐ-UB ngày 12/12/2001.

Đây là cánh rừng ngập mặn nhân tạo đẹp nhất và cũng là duy nhất ở Đông Nam Á. Rừng được khôi phục sau khi bị chất độc hoá học huỷ diệt gần như toàn bộ trong thời gian chiến tranh (UNESCO/MAB, 2000). Từ những năm 1929, khu vực này đã được đặt tên là khu rừng cấm Quảng Xuyên - Cần Giờ với những cánh rừng ngập mặn nguyên sinh và động vật hoang dã nổi tiếng. Chất độc hoá học đã rải xuống nhiều lần trong suốt gần 10 năm (1964-1972) làm cho hơn 80% rừng ngập mặn có nhiều cây cỏ thụ bị chết, những gốc cây to lớn còn nằm lại trong bùn đất cho tới ngày nay.

Trước ngày 30/4/1975, rừng ngập mặn Cần Giờ có 40.000 ha; tán rừng dày, với cây rừng cao trên 25 m, đường kính 25-40 cm, đước (*Rhizophora apiculata*) là loài chiếm ưu thế, cùng với các quần thể khác như bần trắng (*Sonneratia alba*), mắm trắng (*Avicennia alba*), đưng (*R. mucronata*), vẹt (*Bruguiera spp.*), xu (*Xylocarpus spp.*), cóc (*Lumnitzera spp.*), chà là (*Phoenix paludosa*), giá (*Excoecaria agallocha*)... Ngoài rừng ngập mặn, khu vực huyện Cần Giờ còn có các loại cây cỏ, cây bụi và các loài cây tái sinh tự nhiên thuộc rừng mưa ẩm, nhiệt đới và các vùng đồi đất đỏ bazan như Giồng Chùa, Giồng Ao....

Từ năm 1964 đến 1970, đế quốc Mỹ đã dùng chất độc hóa học rải dọc theo trục sông Lòng Tàu sâu vào rừng mỗi bên vài trăm mét. Các đợt rải được tiến hành nhiều lần bằng máy bay làm rừng ngập mặn Cần Giờ bị huỷ diệt hoàn toàn, hầu hết các loại cây rụng lá và chết. Các loài cây như đước, đưng gần như biến mất. Một số ít cây dà (*Cerriops spp.*), giá (*Excoecaria agallocha*) ven bờ kênh rạch tái sinh theo từng cụm nhỏ, nơi đất ngập triều có mắm, trên đất cao có chà là nước (*Phoenix paludosa*) và các loài ráng đại (*Acrostichum aureum*), dây mủ (*Gymnanthera mitida*), cóc kèn (*Derris trifoliata*), chùm lè (*Azima sarmentosa*), lúc (*Pluchea indica*), chùm gọng (*Clerodendrum inerme*)...

Sau ngày miền Nam hoàn toàn giải phóng 30/4/1975, rừng ngập mặn Cần Giờ thuộc địa phận huyện Duyên Hải, tỉnh Đồng Nai. Đến năm 1978, huyện Duyên Hải được giao lại cho thành phố Hồ Chí Minh với tổng diện tích toàn huyện lúc đó là 71.361 ha, trong đó diện tích rừng ngập mặn và đất lâm nghiệp là 34.468 ha. Lâm trường Duyên Hải lúc đó trực thuộc Ty Lâm nghiệp thành phố Hồ Chí Minh được thành lập vào năm 1978. Để bắt đầu công tác trồng rừng, trụ mầm Đước phải mua và vận chuyển từ tỉnh Minh Hải (Cà Mau) vì nguồn giống tại chỗ ở Cần Giờ không đủ cung cấp. Đến năm 1990 mới có nguồn giống Đước tại chỗ. Từ năm 1984 trở đi, một số loài cây khác như gõ biển (*Intsia bijuga*), dả vôi (*Ceriops tagal*), dả quánh (*C. decandra*), cóc trắng (*Lumnitzera racemosa*), xu ổi (*Xylocarpus granatum*), tra (*Thespesia populnea*)... cũng được trồng để phủ xanh các vùng đất cao, ít ngập triều.

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

Khu Dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ được chia làm 3 vùng chính: vùng lõi, vùng đệm, vùng chuyển tiếp.

*** 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 và 13. Vùng này đặc trưng cho các hệ sinh thái rừng trồng và đặc biệt là rừng ngập mặn tái sinh tự nhiên dọc theo các kênh rạch và bìa rừng với đa dạng sinh học cao về thành phần các loài động vật, thực vật, vi sinh vật với cảnh quan rừng ngập mặn đa dạng và hấp dẫn. Các chức năng chính bao gồm:

- 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.
- Tiến hành một số công trình nghiên cứu khoa học về sức bền hệ sinh thái và du lịch sinh thái có giới hạn.

*** Vùng đệm (37.339 ha)**

Là vùng tiếp giáp với vùng lõi, có thể tiến hành các hoạt động kinh tế, nghiên cứu, giáo dục và giải trí nhưng không ảnh hưởng đến mục đích bảo tồn 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 và 24. Với chức năng phục hồi các hệ sinh thái, vùng đệm có vai trò quan trọng trong bảo tồn vùng lõi. Các hoạt động du lịch sinh thái, tham quan và nghiên cứu có thể triển khai ở Khu căn cứ địa kháng chiến, đặc khu Rừng Sác, thăm vườn chim, vườn cò, vườn dơi sẽ góp phần nâng cao thu nhập cho người dân, nâng cao ý thức và hiểu biết giá trị của công tác bảo tồn góp phần làm giảm sức ép lên vùng lõi của khu dự trữ sinh quyển. Mặt khác, vùng đệm còn tạo không gian cho thú hoang dã như khỉ, rái cá, kỳ đà ... kiếm ăn. Khi các khu vực này trở nên ổn định, có thể bỏ sung vào vùng lõi nếu cần thiết, đồng thời tạo cảnh quan tự nhiên và hoạt động văn hoá phục vụ cho du lịch sinh thái. Ngoài ra, các mô hình lâm ngư kết hợp thân thiện với môi trường cũng được ứng dụng, trình diễn cho nhân dân địa phương đến tham quan, học tập và trao đổi kinh nghiệm.

*** Vùng chuyển tiếp: 29.310 ha**

Vùng chuyển tiếp còn được gọi là vùng phát triển bền vững, nơi cộng tác của các nhà khoa học, nhà quản lý và người dân địa phương. Tạo điều kiện thuận lợi và đẩy mạnh các hoạt động phát triển kinh tế, du lịch, dịch vụ đi đôi với tuyên truyền giáo dục nâng cao nhận thức cộng đồng.

Vùng chuyển tiếp bao gồm các khu vực còn lại của huyện Cần Giờ bao gồm các vùng bãi bồi, giồng, bãi cát, các khu vực sản xuất nông nghiệp, thủy sản, diêm nghiệp và dân cư dọc theo ven biển Cần Giờ. Đây là vùng chuyển tiếp có nhiều tiềm năng cho hoạt động kinh tế, đặc biệt là phát triển du lịch sinh thái, phát triển nông nghiệp, ngư nghiệp và thủy sản bền vững. Hệ thống nhà nghỉ, khách sạn, nhà hàng vùng ven biển Cần Giờ rất hấp dẫn khách du lịch.

2.1.4 Công tác quản lý Khu Dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ.

Khu Dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ được quản lý theo hệ thống rừng đặc dụng (Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn) theo quyết định số 173/CT ngày 29/05/1991 do Chủ tịch Hội đồng Bộ trưởng phê duyệt thành lập Rừng phòng hộ Môi trường. Ủy ban nhân dân Thành phố Hồ Chí Minh đã phê duyệt dự án đầu tư xây

dựng Khu Bảo tồn thiên nhiên rừng ngập mặn Cần Giờ giai đoạn 2002-2011 theo Quyết định số 8413/QĐ-UB ngày 12/12/2001.

Ủy ban nhân dân Huyện Cần Giờ: Trực tiếp quản lý về mặt hành chính, đất đai, tài nguyên rừng cũng như tất cả các hoạt động kinh tế, xã hội, dân cư trên địa bàn huyện. Các cơ quan trực thuộc bao gồm:

- Ban Quản lý rừng ngập mặn Cần Giờ TP. Hồ Chí Minh: Quản lý tài nguyên rừng, thực hiện chính sách bảo vệ rừng, cung cấp nguồn trợ cấp cho các hộ dân trong rừng. Các đơn vị trực thuộc ban quản lý là các tiểu khu. Các tiểu khu chịu trách nhiệm quản lý rừng và các hộ dân sống trong khu vực đó.
- Ủy ban nhân dân xã, phường, thị trấn: Quản lý về mặt hành chính trong địa bàn xã, thị trấn.

Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn: Quản lý tài nguyên rừng theo ngành, các chủ trương chính sách từ Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. Các cơ quan trực thuộc chính gồm:

- Chi cục Kiểm lâm: Tuần tra, bảo vệ rừng theo luật pháp hiện hành. Chi cục có các Trạm Kiểm lâm nằm ở các vị trí xung yếu trong rừng để công tác bảo vệ rừng đạt hiệu quả.
- Chi cục Phát triển Lâm nghiệp: Xây dựng kế hoạch tổng thể, nguồn nhân lực và tài chính cho công tác trồng và bảo vệ rừng.
- Trung tâm Nghiên cứu Khoa học Kỹ thuật và Khuyến nông: Cung cấp và tư vấn giống cây trồng vật nuôi, các mô hình kinh tế phát triển nông lâm nghiệp hài hoà với môi trường.

Sở Du lịch, Sở Tài nguyên và Môi trường, Sở Khoa học và Công nghệ: Quản lý theo ngành về các lĩnh vực liên quan: Phát triển du lịch, nghiên cứu triển khai các đề tài khoa học, công nghệ, hệ thống giám sát môi trường, tuyên truyền giáo dục, đào tạo...

Các công ty kinh doanh tư nhân: Bao gồm các công ty dịch vụ du lịch, các chủ đầm nuôi tôm, đánh bắt thủy hải sản... tham gia bảo vệ môi trường thông qua việc đóng góp thuế. phí...

Các trường đại học, viện nghiên cứu: Triển khai các đề tài nghiên cứu khoa học, giám sát, đánh giá tác động môi trường, tuyên truyền giáo dục người dân nâng cao ý thức bảo vệ rừng...

Ban Quản lý Khu dự trữ sinh quyển: Ban quản lý Khu Dự trữ sinh quyển Cần Giờ dưới sự quản lý và chỉ đạo trực tiếp của Ủy ban Nhân dân huyện Cần Giờ và Sở Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn với vai trò và nhiệm vụ điều phối tổng thể các hoạt động trên theo đúng tiêu chí của khu dự trữ sinh quyển là kết hợp hài hoà giữa bảo tồn và phát triển kinh tế. đồng thời tạo điều kiện triển khai các đề tài nghiên cứu khoa học, tuyên truyền giáo dục và đào tạo, mở rộng hợp tác quốc tế.

2.2 Cây đước

Tên Việt Nam: Đước đôi

Tên Latin: *Rhizophora apiculata* Blume.

Họ: Đước Rhizophoraceae

Bộ: Sim Myrtales

Nhóm: Cây gỗ lớn



Hình 2.2: Cấu trúc thân, rễ, lá, trái và hoa đước



Hình 2.3: Cây đước đôi (*Rhizophora apiculata* Blume.)

2.2.1 Hình thái học.

Cây bụi hay gỗ nhỏ (ở Bắc bộ) hay cây gỗ to (ở Nam bộ), cao 25 – 30 m, đường kính 60 – 70 cm. Trung bình cây tăng trưởng chiều cao 0,5 – 1 m/năm; phát triển đường kính 0,5 cm/năm.

Vỏ cây màu xám, dày 2,5 cm, nứt dọc. Gốc có nhiều rễ giống hình nơm, cao 1 – 2 m. Lá đơn, mọc đối; phiến lá hình bầu dục - thuôn hay gần hình mũi mác, dài 10 – 16 cm, rộng 3 – 6 cm, đầu và gốc lá nhọn, dày, cứng bóng, mặt dưới có nhiều chấm màu đen, gân giữa nâu đỏ, gân bên mờ; cuống dài 1,5 – 3 cm, màu đỏ nhạt.

Lá kèm dài 4 – 8 cm, màu hồng hay đỏ nhạt. Cụm hoa xim có 2 hoa, cuống dài 0,5 – 1 cm, mọc từ nách lá đã rụng. Các lá bắc con làm thành hình chén ở gốc hoa. Hoa không cuống, đài hợp, chia 4 thùy, dài 1 - 14 cm, rộng 6 – 8 mm. Tràng hoa có 4 cánh mỏng, hình mũi mác, dài 8 – 11 mm, rộng 1,5 – 5 mm. Nhị 8 – 12 mm. Bầu bán hạ, 2 ô; vòi 2 thùy. Quả hình quả lê ngược, dài 2 - 2,5 cm, có màu nâu, sần sùi. Trụ mầm hình trụ dài 20 - 35cm, phía dưới phình to, màu lục, khi chín màu hồng.

Mùa hoa tháng 4 - 5, đôi khi quanh năm, mùa quả chín tháng 11. Hạt nảy mầm thành cây con trên cây mẹ, khi thành thực thì xuất hiện một vòng cổ dài 0,8 – 1,2 cm giữa phần quả và trụ mầm. Cây con rụng vào các tháng 7 - 9.

Ngoài hình thức nhân giống bằng cách trồng bằng hạt, đã có những nghiên cứu nhằm cải thiện tỷ lệ nhân giống được phục vụ cho công tác trồng và cải tạo rừng ngập mặn. Năm 1998 Komiyama và cộng sự đã nghiên cứu việc nhân giống cây được đôi bằng cách cắt cây được con làm ba phần ngọn, thân và gốc sau đó đem trồng bình thường. Kết quả cho thấy tỷ lệ phát triển thành cây hoàn chỉnh của các mảnh cắt rất khả quan trong đó tỷ lệ phát triển thành cây của phần gốc là 100%. Kết quả này có thể mở ra một hướng mới cho việc nhân giống cây được đôi vì khá đơn giản, không cần những dụng cụ, thiết bị đặt biệt như phương pháp nuôi cấy mô. Kỹ thuật này hoàn toàn có thể áp dụng cho Việt Nam trong việc nhân giống cây được.

2.2.2 Nơi sống và sinh thái.

Cây mọc ở rừng ngập mặn cửa sông, ven biển, nơi thủy triều trung bình, bùn sét chặt, sa mặn, bãi sa bồi. Thường chiếm ưu thế hoặc gần như thuần loại ở rừng ngập mặn, có tần đất tụ dày và màu mỡ, thường xuyên chịu ảnh hưởng của thủy triều và bồi tụ mạnh. Tái sinh mạnh dưới tán cây tiên phong như: mắm đen (*Avicennia officinalis*), mắm trắng (*Avicennia alba*). Lúc đầu mọc hỗn giao và sau đó chiếm ưu thế tuyệt đối.

2.2.3 Phân bố.

Việt Nam: Bà Rịa - Vũng Tàu (Vũng Tàu - Côn Đảo), Kiên Giang (Hà Tiên, Phú Quốc), vùng cửa sông Cửu Long, bán đảo Cà Mau và từ Trung trung bộ đến Hà Tiên, chủ yếu Nam bộ.

Thế giới: Trung Quốc, Ấn Độ, Xri Lanca, Mianma, Thái Lan, Campuchia, Malaixia, Xingapo, Indônêxia, Philippin, Niu Ghinê, Ôxtrâylia.

2.2.4 Giá trị kinh tế.

Các bộ phận của cây đước đôi đều có thể sử dụng và mang lại hiệu quả kinh tế cao:

- Gỗ cứng, khá bền, dùng tốt trong xây dựng, đóng đồ đặc, chống lòi, cho than ít khói, nhiệt lượng cao. Sau khi trồng 15 năm có thể thu được 151 tấn gỗ/ha (Bo Christensen, 1978).
- Vỏ nhiều tanin để nhuộm lưới và thuộc da.
- Lá làm phân xanh, hoa nuôi ong.
- Quần thể là thành phần chính của rừng ngập mặn có vai trò chắn sóng gió, bảo vệ vùng ven biển, là nơi nuôi dưỡng và cung cấp thức ăn cho các loài hải sản có giá trị cao.

2.2.5 Tình trạng hiện nay.

Trong tương lai gần quần thể đước tại Cần Giò sẽ nguy cấp do khai thác bừa bãi quá mức, không có kế hoạch, chặt cây phá rừng lấy đất làm đầm nuôi tôm và sản xuất nông nghiệp khác. Do đó mặc dù diện tích rừng và trữ lượng cây rất lớn nhưng lại bị giảm sút nhanh chóng và có phần nghiêm trọng. Mức độ đe dọa: **Bậc V**

2.3 Quy trình ly trích DNA thực vật.

Có nhiều quy trình ly trích DNA tổng số như quy trình của Scott O.Rogers và Arnold J.Bendich (1994), quy trình của Doyle và Doyle (1987, 1990), quy trình của Ziegenhagen và Fladung (1997)... Mỗi phương pháp đều có ưu và khuyết điểm riêng. Chúng ta có thể dựa vào đối tượng được cũng như yêu cầu về chất lượng, số lượng DNA cần thu để chọn phương pháp cho thích hợp. Ngoài ra, giá thành cũng là một trong những yếu tố quyết định đến việc lựa chọn phương pháp tách chiết thích hợp.

Phương pháp ly trích DNA cơ bản gồm ba bước:

- Bước 1: Phá màng tế bào và màng nhân bằng phương pháp cơ học (nghiền). Thông thường người ta nghiền tế bào, trong một hỗn hợp chất tẩy (như SDS, Sarcosyl, CTAB) và proteinase (Proteinase K). Hỗn hợp này sẽ phá vỡ màng tế bào và màng nhân, giải phóng DNA ra môi trường đồng thời phân hủy các protein liên kết với DNA. Để đảm bảo sự toàn vẹn cấu trúc của các bào quan, hạn chế sự hoạt động của các enzyme thủy phân nội bào, người ta có thể phá vỡ cơ học mô và tế bào bằng cách nghiền mịn trong điều kiện lạnh sâu của Nitơ lỏng (-198°C). Sau đó sử dụng chất tẩy mạnh để phá màng tế bào và màng nhân (phá vỡ hóa học).
- Bước 2: Loại bỏ các thành phần không mong muốn trong mẫu, chủ yếu là các protein. Sự loại bỏ này dựa trên nguyên tắc hòa tan khác nhau của các loại phân tử khác nhau (nucleic acid/ protein) trong hai pha không hòa tan (phenol, Chloroform/ nước). Mẫu được lắc nhẹ trong dung dịch phenol/chloroform/iso amylalcohol (tỉ lệ 25/24/1). Dung dịch này có tác dụng làm biến tính protein đồng thời không hòa tan nucleic acid. Protein sau khi bị biến tính sẽ không còn hòa tan trong pha nước có chứa nucleic acid và sau khi ly tâm sẽ tủa thành một lớp nằm giữa pha nước và pha phenol chloroform. Pha nước có chứa nucleic acid được thu nhận lại.
- Bước 3: Tủa nucleic acid. Có thể tủa bằng ethanol hoặc isopropanol, nhưng thông thường người ta dùng isopropanol. Nucleic acid sẽ được thu nhận lại bằng ly tâm. Sau đó, cặn tủa được rửa trong ethanol 70% để loại bỏ các muối hoặc các dấu vết của isopropanol còn dính lại trên mẫu. Mục đích của việc tủa là nhằm thu nhận nucleic acid dưới dạng cô đặc, nhằm bảo vệ chúng khỏi sự phân hủy của các enzyme, đồng thời có thể hòa tan chúng lại trong dung dịch theo nồng độ mong muốn.

Một số vấn đề có thể gặp phải khi tách chiết DNA:

- DNA bị phân hủy hoặc bị gãy.
- Có lẫn tạp RNA trong mẫu DNA.
- Có lẫn tạp polysaccharide trong mẫu DNA.
- Có lẫn tạp polyphenol trong mẫu DNA.

2.3.1 Định lượng DNA bằng phương pháp quang phổ.

Mỗi loại phân tử có một đỉnh hấp thụ (tức là nơi chúng hấp thụ ánh sáng mạnh nhất) ở một độ dài sóng nhất định tùy thuộc vào cấu trúc của chúng. Ví dụ đỉnh hấp thụ của các phân tử acid nucleotide là 260nm. Sự hấp thụ này là do sự tương tác giữa các photon với các electron của vòng purine và pyrimidine. Dựa vào sự hấp thụ này người ta có thể định lượng được hàm lượng DNA có trong mẫu ly trích.

Sự hấp thụ ở đây được tính bằng đơn vị OD (Optical Density). Đối với DNA tinh khiết một đơn vị OD_{260nm} tương ứng với:

- 50 $\mu\text{g/ml}$ DNA sợi đôi.
- 40 $\mu\text{g/ml}$ DNA sợi đơn hay RNA.
- 20 $\mu\text{g/ml}$ oligonucleotide sợi đơn.

Từ giá trị OD đo được, người ta có thể suy ra được nồng độ acid nucleotide trong mẫu ly trích.

Cách tính trên chỉ đúng với mẫu DNA tinh khiết. Nếu mẫu ly trích có lẫn tạp protein thì kết quả tính toán sẽ không chính xác. Ngoài đỉnh hấp thụ là 280nm protein cũng hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 260nm như các acid nucleotide và làm sai lệch giá trị thật của nồng độ acid nucleotide. Để ước lượng độ tinh sạch của mẫu ly trích người ta tính tỷ lệ OD_{260nm}/OD_{280nm} .

- Nếu tỷ lệ này nằm trong khoảng 1,7-2,2 thì mẫu ly trích được xem là sạch.
- Nếu mẫu bị nhiễm protein thì tỷ lệ này sẽ thấp hơn nhiều.

Tuy nhiên, việc định lượng bằng phương pháp hấp thụ mật độ quang lại không cho biết chất lượng của DNA ly trích. Để biết chính xác chất lượng DNA ly trích, người ta sử dụng phương pháp điện di trên gel.

2.3.2 Định tính DNA ly trích bằng phương pháp điện di.

Nguyên tắc của kỹ thuật điện di: Trong một điện trường, các phân tử sẽ di chuyển với vận tốc tùy thuộc vào điện tích và kích thước của chúng. Nếu hai phân tử có cùng khối lượng thì phân tử nào có điện tích lớn hơn sẽ di chuyển về điện cực ngược dấu nhanh hơn.

Đối với phân tử DNA, việc điện di được thực hiện trên giá thể bán rắn là gel. Gel là môi trường xốp với các lỗ nhỏ cho phép các phân tử acid nucleotide đi qua. Kích thước phân tử càng lớn thì việc di chuyển qua gel càng chậm. Có hai loại gel được sử dụng tùy theo kích thước và mức độ phân tách của phân tử acid nucleotide: Gel agarose và gel polyacrylamide.

- Gel agarose: Lỗ có đường kính trung bình cho phép phân tách các phân tử DNA sợi đôi, kích thước 300-10000 bp. Các nồng độ agarose khác nhau cho phép tăng hiệu quả phân tách các nhóm phân tử có kích thước khác nhau.

Bảng 2.1: Sự phân tách các đoạn DNA trong gel agarose có nồng độ khác nhau

Nồng độ gel agarose (% w/v)	Kích thước đoạn DNA dạng thẳng (kb)
0,6 → 0,8	1 → 20
0,9 → 1,2	0,5 → 7
1,2 → 1,5	0,5 → 5

- Gel polyacrylamide: Cho những lỗ nhỏ, thích hợp để phân tách những đoạn DNA có kích thước dưới 500bp, hiệu quả phân tách có thể đạt 1 nucleotide. (Lưu ý: Gel polyacrylamide ở dạng lỏng là chất gây độc cho hệ thần kinh nên phải cẩn thận khi sử dụng)

Bảng 2.2: Sự phân tách các đoạn DNA trong gel polyacrylamide có nồng độ khác nhau

Nồng độ gel polyacrylamide (% w/v)	Kích thước đoạn DNA dạng thẳng (bp)
4	200 → 800
5	80 → 200
8	40 → 100
11	10 → 50

Sau khi phân tách bằng điện di, để phát hiện các phân tử DNA trên gel, người ta sử dụng một số phương pháp phát hiện như sau:

- Đối với gel agarose: Nhuộm bằng ethidium bromide. Chất này sẽ gắn xen vào giữa các base của phân tử DNA và phát huỳnh quang dưới tia tử ngoại. Điều này cho phép phát hiện vị trí các đoạn DNA trên gel.
- Đối với gel polyacrylamide: Các phân tử DNA thường được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ và vị trí của nó sẽ được phát hiện bằng kỹ thuật phóng xạ tự ghi. Ngoài ra, các phân tử DNA còn có thể được đánh dấu bằng các chất nhuộm chuyên biệt.

Dựa vào kết quả điện di, chúng ta có thể biết được chất lượng của DNA ly trích như gãy, lẫn tạp ...

2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR).

2.4.1 Khái niệm.

Kỹ thuật PCR được nhà khoa học Mỹ Mullis và cộng sự phát minh vào năm 1985. Phát minh này đã đem đến cho Mullis giải Nobel Hóa học năm 1993.

Đây là phương pháp nhằm khuếch đại một đoạn phân tử DNA nào đó một cách đặc hiệu in vitro nhờ sự xúc tác của enzyme *Taq* polymerase từ một lượng DNA mẫu rất nhỏ. Đây là một kỹ thuật trong sinh học phân tử để tạo dòng DNA rất đơn giản và hiệu quả. Bằng kỹ thuật PCR, hàng triệu đoạn DNA đặc hiệu và đồng nhất sẽ được thu nhận từ DNA mẫu.

2.4.2 Thành phần và vai trò của các chất trong phản ứng PCR.

➤ DNA mẫu:

Được ly trích từ nhiều bộ phận khác nhau của đối tượng nghiên cứu bằng nhiều phương pháp khác nhau. DNA thực vật thường được ly trích từ mô lá, DNA động vật được ly trích từ máu, lông, mô ...

Trong kỹ thuật PCR, yêu cầu về độ tinh sạch của DNA mẫu không cần cao. Tuy nhiên để thu được kết quả tốt nhất nên sử dụng DNA mẫu thực sự tinh khiết.

Số lượng DNA cần cho một phản ứng PCR khoảng 5-10 ng DNA thuần khiết. Nồng độ DNA có thể xác định được nhờ sự đo OD (mật độ quang) ở độ dài sóng 260nm. Khi DNA tinh khiết, lượng DNA được tính theo công thức :

- 1 OD_{260nm} = 50 ng/μl (đối với DNA sợi kép).
- 1 OD_{260nm} = 40 ng/μl (đối với DNA sợi đơn).

➤ Primer (mồi):

Là một đoạn acid nucleid có trình tự liên kết đặc hiệu với đoạn DNA cần khuếch đại. Phản ứng PCR sử dụng một cặp primer đặc hiệu bao gồm F-primer (mồi xuôi) và R-primer (mồi ngược).

Cặp primer quyết định sự thành công của kỹ thuật PCR. Nếu primer được thiết kế đúng thì đoạn DNA đích sẽ được khuếch đại chính xác.

➤ dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP):

dATP, dCTP, dTTP, dGTP được sử dụng với nồng độ như nhau.

➤ Dung dịch buffer:

Tạo môi trường thuận thích hợp nhất để *Taq* polymerase hoạt động.

➤ *Taq* polymerase:

Ban đầu, khi chưa sử dụng loại enzyme *Taq* - polymerase người ta phải thêm DNA polymerase trong từng chu kỳ nhân bản, vì DNA polymerase cần cho quá trình tổng hợp DNA không chịu được nhiệt độ lớn hơn 90⁰ C ở giai đoạn tách hai sợi của phân tử DNA. Năm 1988 người ta phát hiện được loại *Taq* polymerase, một DNA polymerase bền với nhiệt, được cô lập từ vi khuẩn *Thermus aquaticus* sống ở suối nước nóng, với enzyme này chỉ cần cho một lần *Taq* polymerase là đủ.

➤ Ion kim loại Mg⁺⁺:

Tạo điều kiện thuận lợi cho *Taq* polymerase hoạt động.

2.4.3 Nguyên tắc của phản ứng PCR.

Phản ứng PCR được thực hiện qua 25-35 chu kỳ. Mỗi chu kỳ bao gồm các bước: denature (biến tính DNA), annealing (gắn mồi), extension (kéo dài).

- Denature: 94 - 96 °C, 60 giây (thời gian có thể dài hoặc ngắn hơn tùy theo độ dài DNA mẫu). Đây là bước làm biến tính DNA mẫu từ sợi kép thành sợi đơn.
- Annealing: 50 – 60 °C, 30 giây. Đây là bước primer gắn đặc hiệu vào sợi DNA đích (sợi đơn). Nhiệt độ trong bước này tùy thuộc vào độ dài của cặp primer.
- Extension: 72°C, 60 – 90 giây. Đây là bước kéo dài primer nhờ hoạt động của *Taq* polymerase. Nhiệt độ 72°C là tối ưu cho hoạt động của *Taq* polymerase.

- Sau 25 -35 chu kỳ, tiếp tục ủ ở 72°C trong 5 - 15 phút để hoàn thiện các sản phẩm PCR.

2.4.4 Ứng dụng của kỹ thuật PCR

Hiện nay, thành tựu của PCR mở ra nhiều triển vọng cho sinh học phân tử, với nhiều ứng dụng trong sinh học, trong y khoa, trong nông nghiệp ...

- Trong nghiên cứu genomic: Nhân bản vô tính với PCR, recombinant PCR, multiplex PCR ...
- Trong nghiên cứu y học: Phát hiện, chẩn đoán được nhiều loại bệnh do virus, vi khuẩn, ký sinh trùng ... gây ra.
- Trong nông nghiệp: Chọn lọc giống cây trồng nhờ DNA marker (MAS), kiểm tra kết quả chuyển gene ...

2.4.5 Ưu và nhược điểm của kỹ thuật PCR

2.4.5.1 Ưu điểm của kỹ thuật PCR

Cho kết quả nhanh, nhạy, chỉ cần một lượng nhỏ DNA là có thể thực hiện được.

2.4.5.2 Nhược điểm của kỹ thuật PCR

Do quá nhạy nên kỹ thuật PCR có thể cho kết quả dương tính giả. Trong một số trường hợp vi sinh vật gây bệnh đã chết hoặc chưa đủ lượng gây bệnh thì phản ứng PCR vẫn cho kết quả dương tính.

2.5 Một số DNA marker sử dụng trong nghiên cứu sự đa dạng di truyền.

2.5.1 Phân loại

Về bản chất, bất kỳ chuỗi mã DNA nào được dùng để phân biệt hai cá thể, hai dòng hoặc hai giống khác nhau đều có thể xem như một DNA marker.

Dựa vào kỹ thuật thực hiện các DNA marker có thể chia làm hai nhóm:

- Marker dựa trên cơ sở lai DNA: RFLP.
- Marker dựa trên sự khuếch đại DNA bằng kỹ thuật PCR: ALP, AFLP, SSR, SSCP, RAPD.

Dựa trên kiểu hình có thể chia DNA marker thành hai nhóm:

- Marker đồng trội: Những marker có thể phân biệt được cá thể đồng hợp tử và cá thể dị hợp tử. Bao gồm marker allozyme, microsatellite, RFLP.
- Marker trội: Những marker không thể phân biệt những cá thể đồng hợp tử và dị hợp tử. Bao gồm RAPD, AFLP.

Bảng 2.3: Các loại marker DNA (Bùi Chí Bửu và Nguyễn Thị Lang, 2005)

Chỉ thị (marker)	Tên đầy đủ
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
AP-PCR	Arbitrary Primer-PCR
DAF	DNA Amplification Fingerprinting
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ALP	Amplicon Length Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeat (Microsatellite)
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
STS	Sequence-Tagged Sites

2.5.2 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

RFLP được định nghĩa là tính đa hình chiều dài các phân đoạn cắt giới hạn, biểu hiện sự khác nhau về kích thước các phân đoạn được tạo ra khi cắt DNA bằng các enzyme cắt giới hạn khi có sự thay đổi trình tự trên DNA bộ nhân hoặc trong các bào quan khác.

RFLP là kỹ thuật được sử dụng phổ biến nhất hiện nay. Nguyên tắc của kỹ thuật này dựa trên độ đặc hiệu của các enzyme cắt hạn chế (RE) đối với vị trí nhận biết của chúng trên DNA bộ gene. DNA bộ gene sẽ được cắt bằng các enzyme cắt giới hạn, chạy điện di qua gel agarose, thấm qua màng lai và lai với một mẫu dò DNA (được đánh dấu phóng xạ) liên kết với một locus đặc biệt. Sự khác biệt vị trí cắt giữa hai cá thể sẽ tạo ra những phân đoạn cắt khác nhau.

RFLP có ưu điểm là marker đồng trội cho phép phân biệt được cá thể đồng hợp và dị hợp. Do kích thước DNA khảo sát trong RFLP lớn vì vậy số lượng marker tạo ra nhiều đủ đáp ứng nhu cầu nghiên cứu. Tuy nhiên do qui trình thực hiện phức tạp, nguy hiểm đối với sức khỏe người nghiên cứu (sử dụng phóng xạ đánh dấu), DNA yêu cầu có chất lượng cao đã làm hạn chế việc sử dụng kỹ thuật này.

Cùng với sự phát triển kỹ thuật PCR, kỹ thuật RFLP trở nên đơn giản hơn. Một cặp môi oligonucleotide có thể dùng khuếch đại một vùng DNA cần khảo sát, sau đó đoạn DNA được khuếch đại được cắt bằng các restriction enzyme, điện di và phân tích trên gel nhuộm ethidium bromide hoặc bạc. PCR-RFLP bỏ qua bước lai phóng xạ nên giá thành rẻ hơn và ít nguy hiểm hơn phương pháp RFLP.

2.5.3 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

AFLP được định nghĩa là sự đa hình các đoạn cắt khuếch đại, là kỹ thuật kết hợp giữa RFLP và PCR. AFLP sử dụng enzyme cắt giới hạn cắt DNA bộ gene, sử dụng những phân đoạn DNA làm khuôn cho phản ứng khuếch đại PCR. AFLP có thể dùng để phân biệt các cá thể rất gần nhau, thậm chí ngay cả những dòng đồng gene. Sự khác nhau trong chiều dài các đoạn khuếch đại có thể do những thay đổi của các base trong vùng trình tự môi, hoặc thêm, mất đoạn ở giữa hai vị trí cắt.

Thông thường, restriction enzyme sử dụng trong AFLP là một cặp enzyme, một enzyme cắt thường xuyên (tạo ra những trình tự nhỏ) và một enzyme cắt không thường xuyên (nhằm hạn chế số lượng các đoạn cắt). Cặp enzyme thường được dùng nhất là EcoRI - MseI. Sau khi cắt bằng cặp enzyme này, một trình tự nối mạch đôi (adaptor) sẽ được gắn vào hai đầu đoạn DNA cắt bằng enzyme ligase. Đoạn adaptor gồm 2 phần: phần trình tự lõi và phần trình tự đặc hiệu cho vị trí cắt enzyme. Môi của phản ứng PCR được thiết kế dựa trên trình tự adaptor và chứa một trình tự chọn lọc khoảng vài nucleotide. Chỉ những phân đoạn DNA nào chứa cả trình tự adaptor và trình tự nucleotide chọn lọc mới được khuếch đại, chính trình tự chọn lọc sẽ làm giảm sự xuất hiện sản phẩm PCR và làm đơn giản quá trình phân tích

AFLP nhanh, không phức tạp như RFLP nhưng vẫn khảo sát được toàn bộ gene. Kỹ thuật này đòi hỏi ít lượng DNA ban đầu, không cần biết trước trình tự đích và độ lặp lại phản ứng cao, các môi sử dụng không cần đặc hiệu loài (các môi thương mại có thể dùng cho hầu hết các loài). Tuy nhiên AFLP là một marker trội, điều này làm hạn chế phân biệt cá thể đồng hợp và dị hợp.

2.5.4 Microsatellite

Rải rác ở những vị trí khác nhau trên bộ gene eukaryote là những vùng có tính biến dị cao. Những vùng này có chứa các trình tự DNA gọi là VNTR (variable number

tandem repeat) còn gọi là các tiểu vệ tinh. Các VNTR này đặc trưng bởi số lần lặp lại của trình tự lõi (đơn vị trình tự) DNA như: $(AC)_n$, $(AG)_n$, $(AT)_n$, $(TAT)_n$, $(TCT)_n$, $(CAG)_n$ Microsatellite là các VNTR có số đơn vị trình tự lõi từ 1-6bp, số lần lặp lại của microsatellite khoảng 70 lần. Do số lần lặp lại của mỗi microsatellite là khác nhau ở mỗi cá thể nên tính đa hình tạo ra khi sử dụng phương pháp này là rất cao.

Dựa trên trình tự DNA microsatellite được bảo tồn ở các cá thể cùng loài cho phép chúng ta thiết kế mỗi để khuếch đại trình tự lặp lại trong toàn bộ kiểu gene, trình tự mỗi sử dụng trình tự đặc hiệu ở hai đầu locus microsatellite. Kích thước các đoạn DNA được khuếch đại thường từ 100 - 200 bp. Kết quả tạo ra các đoạn DNA có chiều dài khác nhau phân tách trên gel polyacrylamide.

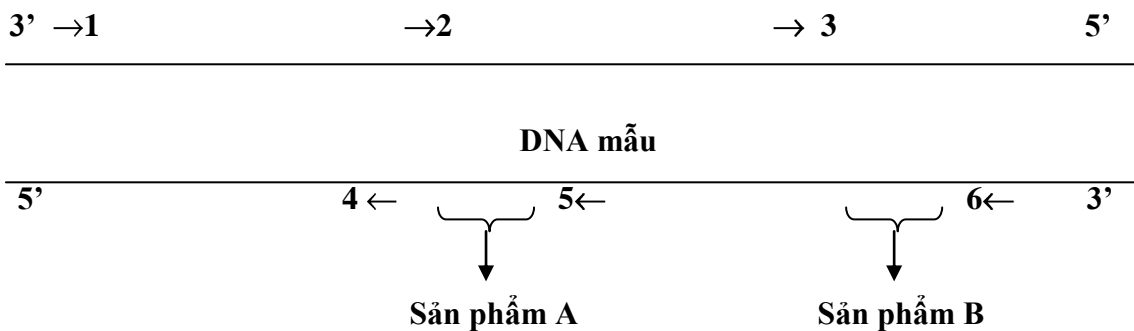
Xác định trình tự đặc hiệu hai đầu locus microsatellite là bước đầu tiên rất quan trọng trong việc phân tích kỹ thuật này. Do đó, việc sử dụng microsatellite gặp phải nhược điểm lớn là phải xác định trình tự đặc hiệu cho mỗi locus đa hình. Ưu điểm lớn nhất của microsatellite là có tính đa hình cao và là một marker đồng trội.

2.5.5 Kỹ thuật RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA).

2.5.5.1 Giới thiệu.

Là phương pháp xác định sự đa hình về kích thước các đoạn DNA sau khi thực hiện PCR mẫu DNA thí nghiệm. Kỹ thuật cho phép phát hiện thể đa hình mà không cần biết trước thứ tự các nucleotide bằng cách dùng các primer tổng hợp, đơn, ngắn, dãy mã được thiết kế ngẫu nhiên để thực hiện PCR. 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 tới 2 kb. Các đoạn với kích thước khác nhau này được nhận biết bằng điện di. Một primer có thể tạo nên sự đa hình DNA giữa các cá thể và các đoạn đa hình này có thể được dùng như những marker để xác định sự đa dạng di truyền. RAPD được xem như một phương pháp tạo sự đa hình DNA nhanh và hữu hiệu. Các bộ kit primer dùng cho RAPD đã được thương mại hóa trên thị trường và các primer cũng rất dễ được tổng hợp. Về trang thiết bị chỉ cần có máy PCR và hệ thống điện di. Cần quan tâm đến yếu tố nồng độ DNA, điều kiện thí nghiệm, chương trình chạy PCR và cần lựa chọn primer thích hợp cho sự đa hình cao.

Có thể tóm tắt kỹ thuật RAPD như sau:



Sự bắt cặp và khuếch đại trong phản ứng RAPD - PCR

Ghi chú: Các mũi tên biểu thị cho các primer (các primer có trình tự giống nhau, khoảng 10 nucleotide); các số 1, 2, 3, 4, 5, 6 tượng trưng cho các vị trí trên DNA mẫu mà primer gắn vào; các primer bắt cặp vào các vị trí 1, 2, 3 trên mạch đơn DNA mẫu 3' - 5', các primer bắt cặp vào các vị trí 4, 5, 6 trên mạch đơn DNA mẫu 5' - 3'.

Trong trường hợp này, có 2 sản phẩm PCR được tạo thành:

- Sản phẩm A: Là sản phẩm PCR khuếch đại một đoạn DNA nằm giữa hai vị trí 2 và 5.
- Sản phẩm B: Là sản phẩm PCR khuếch đại một đoạn DNA nằm giữa hai vị trí 3 và 6.
- Không có sản phẩm PCR hình thành bởi các primer nằm ở vị trí 1 và 4 do hai vị trí này quá xa nhau để cho phép hoàn thành sự khuếch đại.
- Không có sản phẩm hình thành bởi các primer nằm ở vị trí 2 và 4, 3 và 5, do các primer không có chiều hướng vào nhau.

Kỹ thuật RAPD được thực hiện theo ba bước cơ bản:

- Tách chiết DNA tổng số, nhân DNA bằng máy PCR
- Điện di trên gel agarose hoặc gel polyacrylamid
- Xác định tính 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.

Tuy nhiên trong thực tế khi thực hiện phản ứng RAPD – PCR thường gặp phải một số vấn đề:

- Nồng độ DNA mẫu khác nhau có thể làm thay đổi số band trên băng gel điện di. Nồng độ DNA mẫu thích hợp cho mỗi phản ứng là 20 – 50 ng.

- PCR buffer thường được cung cấp theo *Taq* - polymerase và có thể có hoặc không có Mg^{2+} . Kỹ thuật RAPD phụ thuộc rất nhiều vào nồng độ Mg^{2+} , nếu nồng độ Mg^{2+} khác nhau thì sản phẩm RAPD sẽ khác nhau.
- *Taq* - polymerase của các nhà sản xuất khác nhau cho kết quả sản phẩm khác nhau rất lớn. Vì vậy, loại *Taq* - polymerase và nồng độ của *Taq* đòi hỏi phải chính xác và được xác định qua thực nghiệm.
- Chu kỳ nhiệt có thể có sự thay đổi về số chu kỳ và nhiệt độ, điều này phụ thuộc vào máy PCR và độ dày của eppendorf.
- Kết quả không ổn định. Với cùng 1 mẫu DNA, cùng 1 thành phần hóa chất nhưng ở 2 lần thực hiện khác nhau có thể cho ra kết quả khác nhau.

2.5.5.2 Ứng dụng của kỹ thuật RAPD

Nghiên cứu sự đa dạng di truyền.

Marker phân tử

➤ Ưu điểm của kỹ thuật RAPD

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

Đễ thực hiện và dễ thành công do không cần biết trước trình tự bộ gene của đối tượng cần nghiên cứu, thao tác đơn giản.

Thời gian thực hiện nhanh. Khả năng nhân bản cao.

Chi phí thực hiện thấp. Kỹ thuật RAPD thường được sử dụng kết hợp với những kỹ thuật cao cấp khác để đánh giá đa dạng di truyền và nhận diện chỉ thị phân tử có độ tin cậy cao.

➤ Nhược điểm của kỹ thuật RAPD

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. Khả năng nhận diện chỉ thị phân tử thấp và có độ tin cậy không cao.

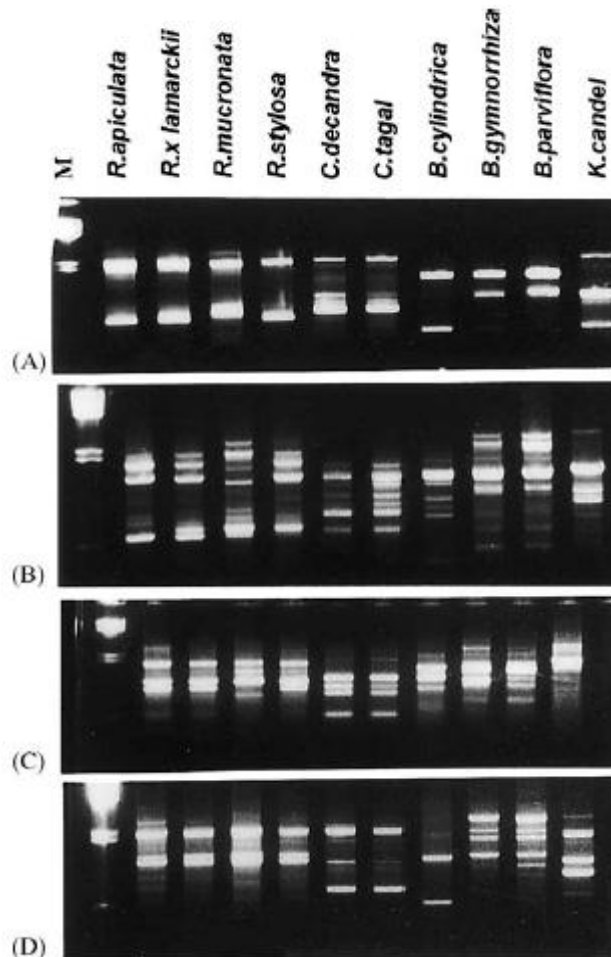
2.5.6 Một số nghiên cứu về DNA marker trên cây đước.

Năm 1997, Madasamy Parani và cộng sự đã sử dụng kỹ thuật RAPD và RFLP để nghiên cứu mối quan hệ giữa cây đước đôi (*Rhizophora apiculata* Blume.) và cây đưng (*Rhizophora mucronata*). Kết quả nghiên cứu cho thấy có mối quan hệ rất gần giữa cây đước đôi (*Rhizophora apiculata* Blume.) và cây đưng (*Rhizophora mucronata*).

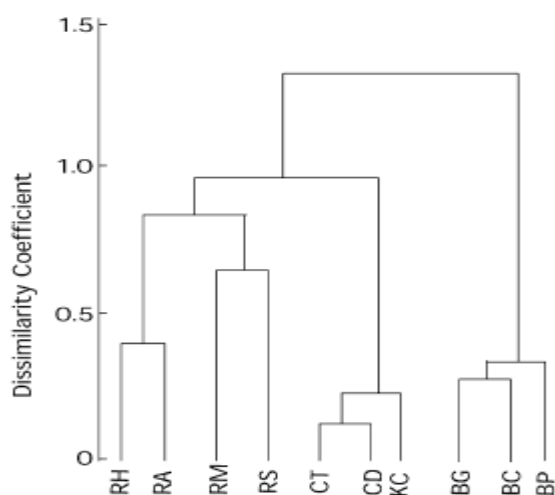
Bảng 2.4: Mối quan hệ di truyền giữa cây đước đôi (*Rhizophora apiculata* Blume.) và cây đưng (*Rhizophora mucronata*) khi phân tích bằng các primer khác nhau

Details of RAPD analysis								
No.	Primer	Sequence of the primer	Number of amplification products				Polymorphism ^a between <i>R. apiculata</i> and <i>R. mucronata</i> (%)	Similarity ^b between the combined banding pattern and the hybrid banding pattern (%)
			<i>Rhizophora apiculata</i>	<i>Rhizophora mucronata</i>	Combined banding pattern of <i>R. apiculata</i> and <i>R. mucronata</i>	Hybrid		
1	OPA06	5'GGTCCCTGAC	1	2	2	2	50	100
2	OPA08	GTGACGTAGG	3	2	3	4	33	75 ^c
3	OPA10	GTGATCGCAG	4	5	6	6	50	100
4	OPA14	TCTGTGCTGG	1	1	1	1	0	100
5	OPA15	TTCGAACCC	2	1	2	2	50	100
6	OPA16	AGCCAGCGAA	4	3	4	4	25	100
7	OPA17	GACCGCTTGT	7	5	7	7	28	100
8	OPA20	GTGCGATCC	3	6	6	6	50	100
9	OPD01	ACCGGAAGG	4	3	4	4	25	100
10	OPD03	GTCGCCGTC	4	6	6	5	33	83
11	OPD06	ACCTGAACGG	1	2	2	2	50	100
12	OPD07	TTGGCAGGG	2	3	3	3	33	100
13	OPD08	GTGTGCCCA	6	6	6	6	0	100
14	OPD13	GGGGTGACGA	3	4	4	4	25	100
15	OPD15	CATCCGTGCT	2	3	4	3	50	75
16	OPAF07	GGAAAGCGTC	3	5	5	5	40	100
17	OPAF10	GGTGGAGAC	2	4	5	4	80	80
18	OPAF11	ACTGGGCCTC	11	10	13	13	38	100
19	OPAF12	GACGCAGCIT	7	4	7	7	43	100
20	OPAF13	CCGAGGTGAC	4	2	5	5	80	100
21	OPAF14	GGTGCGCACT	5	9	10	10	60	100
22	OPAF15	CACGAACCTC	3	3	4	4	50	100
23	OPAF18	GTGTCCCTCT	4	5	6	6	50	100
24	OPAR16	CCTTGCGCCT	3	6	6	6	50	100
25	OPAR20	TGCGCCATCC	5	5	6	6	50	100
Total/average			94	105	127	125	42	96.5

Cũng tương tự như sự phân loại các loài cây ngập mặn, sự phân biệt các loài trong họ đước (Rhizophoreae) trước hết được dựa vào các đặc điểm hình thái. Tuy nhiên nhiều đặc tính hình thái lại không đặc thù và bị trùng lặp. Điều này đã gây khó khăn trong việc phân biệt các loài. Năm 1988 Ballment và cộng sự đã báo cáo về hệ isozyme của cây dà (*Ceriops*). Năm 1998 Sun và cộng sự đã nghiên cứu sự khác nhau về kiểu gene của cây trang (*Kandelia*). Năm 2002, bằng kỹ thuật RAPD và RFLP, Mukkamala Lakshmi và cộng sự đã nghiên cứu mối quan hệ giữa các cây thuộc họ đước (Rhizophoreae) tại Ấn Độ và cho kết quả được thể hiện ở hình 2.5



Hình 2.4: Sản phẩm RAPD trên 10 loài thuộc họ đước (Rhizophoreae) trong rừng ngập mặn ở Ấn Độ với 4 primer: (A) OPD 18; (B) OPD 20; (C) OPA 04; (D) OPA 01



Hình 2.5: Cây di truyền giữa 10 loài thuộc họ đước (Rhizophoreae) trong rừng ngập mặn ở Ấn Độ

2.6 Khái niệm đa dạng sinh học.

Hiện nay có ít nhất 25 định nghĩa thuật ngữ "Đa dạng sinh học". Theo Công ước Đa dạng sinh học, khái niệm "Đa dạng sinh học" (biodiversity, biological diversity) có nghĩa là sự khác nhau giữa các sinh vật sống ở tất cả mọi nơi, bao gồm: Các hệ sinh thái trên cạn, trong đại dương và các hệ sinh thái thủy vực khác, cũng như các phức hệ sinh thái mà các sinh vật là một thành phần,...; thuật ngữ này bao hàm sự khác nhau trong một loài, giữa các loài và giữa các hệ sinh thái.

Có thể coi thuật ngữ "đa dạng sinh học" lần đầu tiên được Norse và McManus (1980) định nghĩa, bao hàm hai khái niệm có liên quan với nhau là: đa dạng di truyền (tính đa dạng về mặt di truyền trong một loài) và đa dạng sinh thái (số lượng các loài trong một quần xã sinh vật). Đa dạng sinh học (Biological Diversity) có nghĩa là sự phong phú, đa dạng của các dạng sống hiện đang tồn tại trên Trái Đất. Đa dạng sinh học bao gồm sự đa dạng của các dạng sống, vai trò sinh thái mà chúng thể hiện và đa dạng di truyền mà chúng có. Sự đa dạng sinh học được biết ở ba mức, đó là:

- Sự đa dạng của các hệ sinh thái.
- Sự đa dạng của các loài.
- Sự đa dạng di truyền hay sự đa dạng của các nguồn gene bên trong loài.

Năm 1991, J. Steele đề xuất một cấp thứ tư - đa dạng chức năng - sự đa dạng của những phản ứng khác nhau đối với những thay đổi của môi trường, nhất là sự đa

dạng về quy mô không gian và thời gian mà các sinh vật phản ứng với nhau và với môi trường.

Các định nghĩa khác về Đa dạng sinh học:

- Bao gồm tất cả các loài thực vật, động vật, vi sinh vật, các hệ sinh thái và quá trình sinh thái học mà chúng tham gia . Đây là khái niệm bao trùm cho mức độ phong phú của tự nhiên, bao gồm cả số lượng và tần số xuất hiện của các hệ sinh thái, các loài và các gene di truyền trong một tổ hợp xác định. (McNeely và cộng sự, 1990).
- Tính đa dạng của gene di truyền, kiểu gene và các bộ gene cũng như mối quan hệ của chúng với môi trường ở mức phân tử, loài, quần thể và hệ sinh thái (FAO, 1990).
- Tính đa dạng của sinh vật ở mọi cấp độ, từ những biến dị di truyền trong cùng một loài đến sự đa dạng của các loài, giống/chi, họ và thậm chí cả các mức phân loại cao hơn; bao gồm cả đa dạng hệ sinh thái, gồm cả các quần xã sinh vật trong các sinh cảnh cụ thể và các điều kiện vật lý mà chúng sinh sống trong đó (Wilson, 1992).
- Tính đa dạng về cấu trúc và chức năng của các dạng sống ở các mức di truyền, quần thể, loài, quần xã và hệ sinh thái (Sandlund và cộng sự., 1993).
- Là toàn bộ đa dạng di truyền, đa dạng loài và đa dạng sinh thái, cũng như những tác động tương hỗ giữa chúng, trong một vùng xác định, tại một thời điểm xác định (di Castri, 1995).

2.7 Khái niệm đa dạng di truyền.

Đa dạng di truyền là tất cả các gene di truyền khác nhau của tất cả các cá thể thực vật, động vật, nấm, và vi sinh vật. Đa dạng di truyền tồn tại trong một loài và giữa các loài khác nhau .

Đa dạng di truyền là sự đa dạng về thành phần gene giữa các cá thể trong cùng một loài và giữa các loài khác nhau; là sự đa dạng về gene có thể di truyền được trong một quần thể hoặc giữa các quần thể.

Đa dạng di truyền là biểu hiện sự đa dạng của các biến dị có thể di truyền trong một loài, một quần xã hoặc giữa các loài, các quần xã. Xét cho cùng, đa dạng di truyền

chính là sự biến dị của sự tổ hợp trình tự của bốn cặp base cơ bản, thành phần của acid nucleotide, tạo thành mã di truyền.

Một biến dị gene xuất hiện ở một cá thể do đột biến gene hoặc nhiễm sắc thể, ở các sinh vật sinh sản hữu tính có thể được nhân rộng trong quần thể nhờ tái tổ hợp. Người ta ước tính rằng, số lượng các tổ hợp có thể giữa các dạng khác nhau của các trình tự gene ở người cũng như ở ruồi giấm đều lớn hơn số lượng các các nguyên tử trong vũ trụ. Các dạng khác của đa dạng di truyền có thể được xác định tại mọi cấp độ tổ chức, bao gồm cả số lượng DNA trong mỗi tế bào, cũng như số lượng và cấu trúc nhiễm sắc thể.

Tập hợp các biến dị gene trong một quần thể giao phối cùng loài có được nhờ chọn lọc. Mức độ sống sót của các biến dị khác nhau dẫn đến tần suất khác nhau của các gene trong tập hợp gene. Điều này cũng tương tự trong tiến hoá của quần thể. Như vậy, tầm quan trọng của biến dị gene là rất rõ ràng: Nó tạo ra sự thay đổi tiến hoá tự nhiên cũng như chọn lọc nhân tạo.

Chỉ một phần nhỏ (thường nhỏ hơn 1%) vật chất di truyền của các sinh vật bậc cao là được biểu hiện ra ngoài thành các tính trạng kiểu hình hoặc chức năng của sinh vật; vai trò của những DNA còn lại và tầm quan trọng của các biến dị gene của nó vẫn chưa được làm rõ.

Ước tính cứ 109 gene khác nhau phân bố trên sinh giới thì có 1 gene không có đóng góp đối với toàn bộ đa dạng di truyền. Đặc biệt, những gene kiểm soát quá trình sinh hóa cơ bản, được duy trì bền vững ở các đơn vị phân loại khác nhau và thường ít có biến dị, mặc dù những biến dị này nếu có sẽ ảnh hưởng nhiều đến tính đa dạng của sinh vật. Đối với các gene duy trì sự tồn tại của các gene khác cũng tương tự như vậy. Hơn nữa, một số lớn các biến dị phân tử trong hệ thống miễn dịch của động vật có vú được quy định bởi một số lượng nhỏ các gene di truyền.

PHẦN 3:

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM

3.1 Thời gian và địa điểm thực hiện.

3.1.1 Thời gian thực hiện.

Đề tài được thực hiện từ 10/02/2006 đến 01/08/2006

3.1.2 Địa điểm thực hiện.

Mẫu lá được thu thập tại Khu Dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ.

Mẫu lá được ly trích DNA và chạy 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.

Mẫu lá được thu thập tại tiểu khu 4b, tiểu khu 6b, tiểu khu 11, tiểu khu 12, tiểu khu 15, khu An Hòa, An Phước thuộc Khu Dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ.

Nguyên tắc thu thập mẫu:

- Xác định được vị trí cụ thể của cây lấy mẫu trên bản đồ thông qua hệ thống định vị toàn cầu GPS (Global Position System).
- Thu thập lá của cây được đôi (lá già, lá non, lá bánh tẻ).
- Chọn mẫu lá từ những cây có đặc điểm khác biệt như: thân cây to, cây mọc tốt, cây mọc yếu ớt, cây bị mối, cây có u, cây có hình dáng lá khác lạ ...
- Chọn mẫu lá từ trên những cây được đôi có năm tuổi khác nhau như được 74, 78, 79, 80.

Ký hiệu tên mẫu: Mẫu được đặt tên là xxRAyy với xx là năm trồng, yy là thứ tự của mẫu.

3.3 Phương pháp thí nghiệm.

3.3.1 Quy trình ly trích DNA.

3.3.1.1 Vật liệu dùng trong ly trích DNA.

a. Thiết bị và dụng cụ.

Chày và cối (Đức).

Bình và khay đựng Nitơ lỏng.

Cân điện tử (Ohaus - Mỹ).

Bồn ủ nhiệt (Mettler-Anh).

Tủ lạnh 4°C và -20°C.

Máy Vortex (IKA - Đức).

Máy hút và tủ cấy vô trùng (Việt Nam /Anh).

Máy vi ly tâm lạnh (Hettich - Đức).

Nồi hấp Autoclave (ToMy - Nhật Bản).

Lò Viba (Electrolux).

Tủ sấy (Jencons-Anh).

Máy điện di (Biorad).

Máy chụp ảnh DNA (Biorad - Thụy Điển).

Đầu tips các loại (Đức).

Pipet các loại (Nichiryo – Nhật Bản).

Máy đo hấp thụ quang phổ (HP - Mỹ).

Máy PCR (BioRad – Thụy Điển).

Tủ lạnh các loại (Sanyo - Nhật Bản).

Eppendorf 1,5 ml và 0,2 ml (Pháp).

Hóa chất ly trích.

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 $65^{\circ}C$
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
Iso Propanol	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
Iso Amyl 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 thích sẽ nằm trong pha nước ở lớp trên	Pha với tỷ lệ 24 thể tích Chloroform và 1 thể tích Isoamyl Alcohol
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 100ml:</u> - 18,622 g bột EDTA + 80ml nước cất 2 lần. Khuấy tan. - Chỉnh pH đạt 8, thêm nước cất 2 lần cho đủ 100ml. - 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 pH8. Ở độ pH này DNA ổn định nhất	<u>Pha 100ml:</u> - 19,7 g bột Tris-HCl + 80ml nước cất 2 lần. Khuấy tan. - Chỉnh pH đạt 8, thêm nước cất 2 lần cho đủ 100ml. - 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 100ml:</u> - 29,25 g NaCl + 100ml nước cất 2 lần. Khuấy tan. - Hấp 121°C/20 phút trước khi dùng.
TE 10X	Dung dịch Stock	<u>Pha 100ml:</u> - 10ml Tris-HCl 1M + 2ml EDTA 0,5M + 88ml nước cất 2 lần. - Hấp 121°C/20 phút trước khi dùng.
TE 1X	Hòa tan DNA	<u>Pha 100ml:</u> 10ml TE 10X + 90ml nước cất 2 lần
EB (Extraction Buffer)	Dung dịch ly trích	<u>Pha 100ml:</u> - 57ml nước cất 2 lần + 2g CTAB (lắc nhẹ trong bồn ủ 65°C cho tan, hạn chế tạo bọt). - Thêm vào 28ml NaCl 5M + 10ml Tris-HCl 1M + 4ml EDTA 0,5M + 1ml 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 100ml:</u> - 24,6g bột Sodium Acetate + 100ml nước cất 2 lần. Khuấy tan. - Hấp 121°C/20 phút trước khi dùng
RNase (Ribonuclease) (10%, w/v)	Enzyme thủy phân RNA có trong dịch trích	<u>Pha 1ml:</u> - 10mg bột RNase + 1ml nước cất 2 lần. - Bọc giấy bạc, trữ ở 4°C, tránh ánh sáng trực tiếp.
Mercapto Ethanol	Bảo vệ DNA	Dung dịch gốc

3.3.1.2 Quy trình ly trích DNA

Trong đề tài nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành thực hiện ly trích DNA tổng số trên 2 quy trình: quy trình ly trích mẫu tươi (Doyle và Doyle (1988)) và quy trình ly trích cải tiến.

a. **Quy trình 1: Quy trình ly trích mẫu tươi (Doyle và Doyle (1988))** gồm 12 bước:

- Bước 1: Cân 0,15 g lá đã rửa sạch. Cho 1,2 ml dịch trích EB vào eppendorf, nghiền lá với dung dịch này. Vortex thật kỹ. Ủ ở 65⁰ C trong 45 phút.
- Bước 2: Thêm 500 µl Chloroform: isoamyl alcohol (24: 1), khuấy bằng vortex 10 phút, li tâm 5 phút 14.000 vòng ở 10⁰ C.
- Bước 3: Chuyển lấy dịch trong lặp lại bước 2.
- Bước 4: Chuyển lấy dịch trong, thêm vào 2 µl RNase, ủ ở 37⁰ C trong 1giờ.
- Bước 5: Thêm vào 250 µl dung dịch isopropanol lạnh. Để tủa ở -20⁰ C khoảng 30 phút (nên để qua đêm).
- Bước 6: Li tâm 5 phút 14.000 vòng ở 10⁰ C. Đổ bỏ dịch trong.
- Bước 7: Cho vào 300 µl TE 1X, ủ ở 37⁰ C trong 1giờ.
- Bước 8: Thêm 20 µl muối Sodium acetate 3 M, và 640 µl Ethanol 100%, trộn đều và để - 20⁰ C trong 30 phút.
- Bước 9: Li tâm 10 phút 14.000 vòng ở 10⁰ C, đổ bỏ dịch trong.
- Bước 10: Rửa cặn với 400 µl Ethanol 70% bằng cách ly tâm 2 phút 14.000 vòng ở 10⁰ C, đổ bỏ dịch trong.
- Bước 11: Lặp lại bước 10. Để khô cặn, hoà tan cặn trong 100 µl TE 1X, ủ ở 37⁰ C trong 30 phút.
- Bước 12: Bảo quản mẫu ở 4⁰ C.

b. **Quy trình 2: Quy trình ly trích cải tiến** gồm 12 bước:

- Bước 1: Lấy 0,2 g lá non rửa sạch và lau khô, nghiền trong nitor lỏng, cho vào eppendorf.
- Bước 2: Thêm 1,2 ml dịch trích EB, vortex kỹ ở tốc độ thấp (600-800 vòng/phút). Ủ qua đêm ở 55°C.
- Bước 3: Ly tâm 12.000 vòng trong 15 phút ở 4°C. Thu dịch nổi.
- Bước 4: Thêm 500 µl Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1), đảo nhẹ. Ly tâm 12.000 vòng trong 15 phút ở 4°C. Thu dịch nổi.
- Bước 5: Lập lại bước 4. Thu được V µl dịch nổi.
- Bước 6: Thêm 0,2 V Sodium acetate 3M và 0,6 V Isopropanol lạnh. Đảo trộn kỹ. Ủ -20°C trong 90 phút.
- Bước 7: Ly tâm 10.000 vòng trong 10 phút ở 4°C. Đổ bỏ dịch trong, thu kết tủa.
- Bước 8: Rửa kết tủa bằng cách thêm 400 µl ethanol 70% và ly tâm 10.000 vòng trong 1 phút ở 4°C. Đổ bỏ dịch trong.
- Bước 9: Rửa kết tủa bằng cách thêm 400 µl ethanol 100% và ly tâm 10.000 vòng trong 1 phút ở 4°C. Đổ bỏ dịch trong.
- Bước 10: Phơi thật khô kết tủa ở nhiệt độ phòng.
- Bước 11: Hòa tan kết tủa trong 100 µl TE 1X, ủ ở 37°C đến khi kết tủa tan hoàn toàn (có thể ủ qua đêm).
- Bước 12: Bảo quản mẫu ở -20°C.

3.3.1.3 Kiểm tra kết quả ly trích DNA.

a. **Kiểm tra định lượng DNA bằng quang phổ kế.**

Một cách tổng quát, hàm lượng DNA trong mẫu ly trích được tính theo công thức:

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

Với:

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

Cách tiến hành:

- Xây dựng đường chuẩn: Dùng dung dịch TE 1X để tạo đường chuẩn.
- Pha loãng dung dịch DNA đến nồng độ thích hợp để đo (thường pha loãng 100 lần) với dung dịch TE 1X: Hút 20 μ l dung dịch DNA cho vào Curvette, hòa tan với 1,8 ml TE 1X. Tiến hành đo OD.

b. Kiểm tra định tính DNA bằng phương pháp điện di trên gel.

Mẫu DNA ly trích được điện di trên gel agarose 0,8% ở hiệu điện thế 100 V, cường độ dòng điện 250 mA trong 15 phút.

Sau khi chạy điện di xong, ngâm gel trong hỗn hợp Ethidium Bromide 0,5 μ g/ml và TAE 0,5X trong 15 phút. Gel sau khi nhuộm được rửa nhẹ dưới vòi nước sạch và đưa vào máy chụp ảnh DNA.

Dưới tia UV, Ethidium Bromide liên kết với sợi đôi DNA sẽ phát quang và tạo thành các band trên gel.

3.3.2 Thực hiện kỹ thuật RAPD.

3.3.2.1 Dụng cụ và hóa chất dùng trong kỹ thuật RAPD

a) Dụng cụ, thiết bị:

Pipet (0,5-10 μ l, 10-100 μ l).

Đầu típ (10 μ l, 100 μ l).

Eppendorf loại 200 μ l.

Tủ cấy vô trùng (Anh).

Máy PCR (BioRad – Thụy Điển).

b) Hóa chất:

Taq polymerase (BioRad – Thụy Điển).

Buffer free Mg⁺⁺.

MgCl₂.

Nước siêu sạch.

Primer: Sử dụng hai primer:

- Trình tự của primer 11 (OPN 06): 5'GAGACGCACA 3' và T_m = 35,3⁰ C
- Trình tự của primer 5 (OPA 05): 5'GGGTAACGCC 3' và T_m = 37,4 °C

3.3.2.1 Bố trí thí nghiệm.

Nhằm tìm ra được chu kỳ nhiệt và thành phần hóa chất tối ưu cho kỹ thuật RAPD trên cây đước, chúng tôi đã tiến hành 3 thí nghiệm.

- ❖ **Thí nghiệm 1:** Sử dụng primer 11 (OPN 06), với thành phần các chất và chu kỳ nhiệt được thể hiện ở bảng 3.1 và bảng 3.2

Bảng 3.1: Thành phần hóa chất sử dụng trong phản ứng RAPD ở thí nghiệm 1

Hóa chất	Nồng độ đầu	Thể tích sử dụng	Nồng độ cuối
PCR buffer	10X	2,5 µl	1X
MgCl ₂	25 mM	2 µl	2 mM
dNTP	10 mM	0,3µl	120 µM
Primer	10 pM	0,65µl	2,6 pM
<i>Taq</i> DNA polymerase	5 U	0,1µl	0,5 U
DNA mẫu	20 ng/µl	1 µl	20 ng
H ₂ O		18,45µl	
Tổng thể tích phản ứng			25µl

Bảng 3.2: Chu kỳ nhiệt cho phản ứng RAPD của thí nghiệm 1

Số chu kỳ	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)
1	94	3
	94	1
33	36	1
	72	1
1	72	10
Hold 4 ⁰ C		

- ❖ **Thí nghiệm 2:** Sử dụng primer 5 (OPA 05), với thành phần các chất và chu kỳ nhiệt được thể hiện ở bảng 3.3 và bảng 3.4

Bảng 3.3: Thành phần hóa chất sử dụng trong phản ứng RAPD ở thí nghiệm 2

Hóa chất	Nồng độ đầu	Thể tích sử dụng	Nồng độ cuối
PCR buffer	10X	2,5 µl	1X
MgCl ₂	25 mM	2,5 µl	2,5 mM
dNTP	10 mM	0,25 µl	100 µM
Primer	100 pmol/µl	6,5 µl	26 pM
<i>Taq</i> DNA polymerase	5 U	0,2 µl	1 U
DNA mẫu	20 ng/µl	2 µl	40 ng
H ₂ O		16,9 µl	
Tổng thể tích phản ứng			25µl

Bảng 3.4: Chu kỳ nhiệt cho phản ứng RAPD của thí nghiệm 2

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

- ❖ **Thí nghiệm 3:** Sử dụng primer 11 (OPN 06), với thành phần các chất và chu kỳ nhiệt được thể hiện ở bảng 3.5 và bảng 3.6

Bảng 3.5: Thành phần hóa chất sử dụng trong phản ứng RAPD ở thí nghiệm 3

Hóa chất	Nồng độ đầu	Thể tích sử dụng	Nồng độ cuối
PCR buffer	10X	2,5 µl	1X
MgCl ₂	25 mM	2,5 µl	2,5 mM
dNTP	10 mM	0,25µl	100 µM
Primer	100 pmol/µl	6,5µl	26 pM
<i>Taq</i> DNA polymerase	5 U	0,2µl	1 U
DNA mẫu	20 ng/µl	2 µl	40 ng
H ₂ O		16,9 µl	
Tổng thể tích phản ứng			25µl

Bảng 3.6: Chu kỳ nhiệt cho phản ứng RAPD của thí nghiệm 3

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

*** Một số lưu ý khi thực hiện phản ứng RAPD:**

Trong thành phần của phản ứng, *Taq* polymerase được sử dụng với thể tích rất nhỏ (0,1 - 0,2 μ l) và không có pipet nào có thể hút chính xác một thể tích nhỏ như vậy. Vì vậy, để đảm bảo độ chính xác của thí nghiệm, thông thường người ta trộn (mix) một lần nhiều phản ứng, sau đó đem chia ra các ống và cho DNA mẫu vào sau cùng.

Các thao tác mix mẫu phải được thực hiện trong tủ cấy vô trùng nhằm tránh sự tạp nhiễm. Trong quá trình mix mẫu, hóa chất và DNA mẫu phải được giữ lạnh để tránh hư hỏng.

Các thao tác mix mẫu phải tiến hành nhẹ nhàng, tránh tạo bọt trong quá trình mix.

Taq polymerase phải được bỏ vào sau cùng. Sau khi đã cho *Taq* vào trong hỗn hợp, các thao tác tiếp theo phải tiến hành nhanh chóng vì *Taq* sẽ hoạt động ngay.

PHẦN 4: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1 Kết quả thu thập mẫu được tại Khu Dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ.

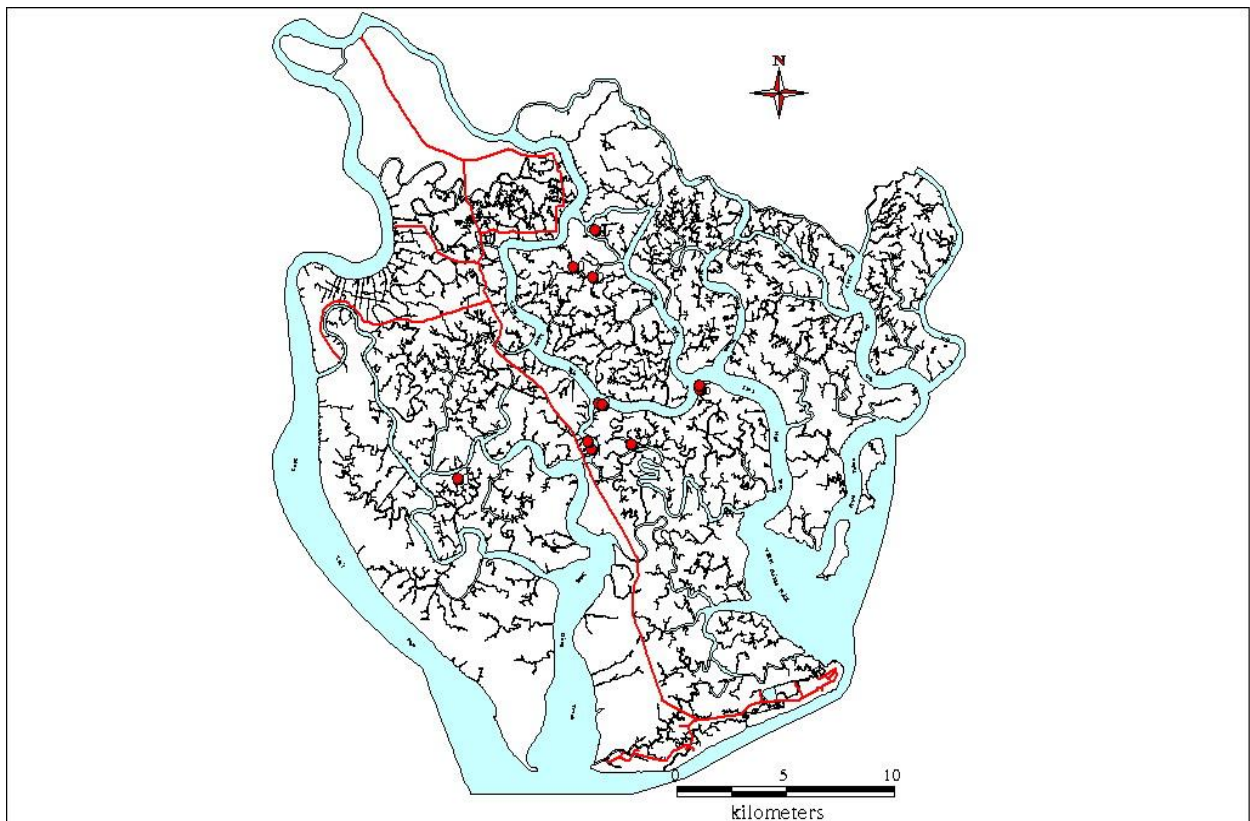
Chúng tôi đã tiến hành thu thập được hơn 40 mẫu lá được gồm nhiều năm tuổi với những đặc điểm hình thái khác nhau như: cây bị mối mọt ăn; cây ốm yếu; cây to, khỏe; cây có hai màu trái (đỏ và xanh); cây có 4 hoa (*Rhizophora x Lamarckii*)....



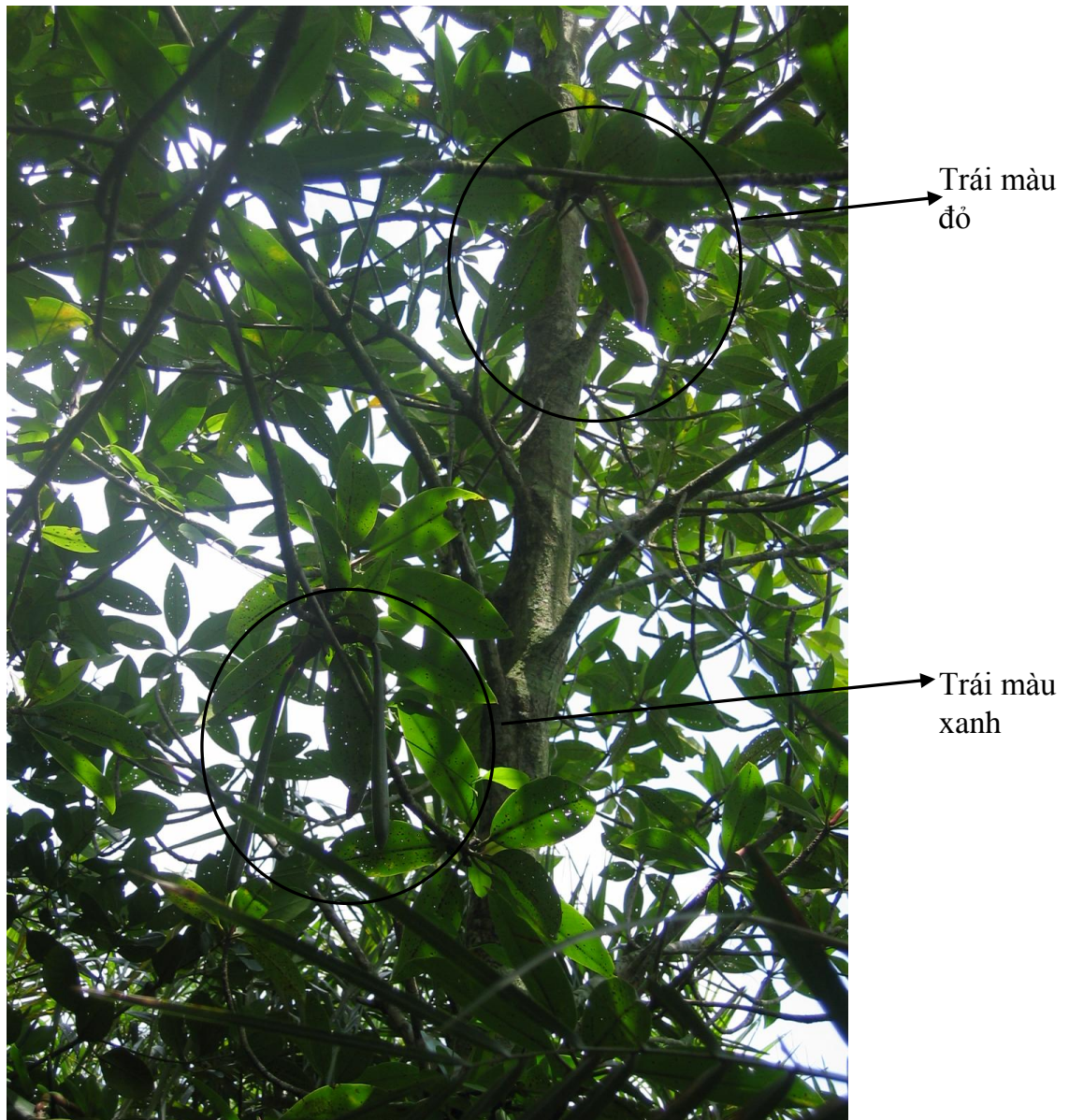
(A)

(B)

Hình 4.1: Hoa được (A) Hoa của cây được lai *Rhizophora x Lamarckii* (4 bông)
(B) Hoa của cây được đôi *Rhizophora apiculata* Blume



Hình 4.2: Vị trí lấy mẫu trên bản đồ Cần Giờ



Hình 4.3 Cây đước đôi có cả trái màu xanh và trái màu đỏ

Tuy số mẫu thu thập được chỉ là rất ít so với tổng diện tích hơn 70.000ha của Khu Dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ nhưng cũng đã đại diện được phần nào quần thể được tại đây.

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

4.2.1 Bảo quản mẫu.

Mẫu lá đước không thể bảo quản lâu dài ngay cả trong điều kiện -20°C . Mẫu lá đước được bảo quản trong tủ lạnh -20°C sẽ nhanh chóng bị hư hỏng (hóa nâu, dập...) ngay khi vừa lấy ra khỏi tủ lạnh. Khoảng thời gian mẫu bị hư hỏng chỉ trong hơn 10 giây, không kịp để nghiền mẫu trong dịch trích. Điều này là do khi trữ ở -20°C , các tinh thể nước có kích thước lớn đã được tạo thành và phá vỡ vách cellulose của tế bào lá đước.

Ở điều kiện nhiệt độ phòng, các tinh thể nước tan ra làm cho hợp chất phenol có trong tế bào lá được phóng thích ra ngoài và làm hóa nâu mẫu lá.

Qua một số thí nghiệm về thời gian tồn trữ mẫu, chúng tôi đã có kết luận:

- Cách trữ mẫu tốt nhất là cho vào trong túi nilông, ép hết không khí trong túi ra ngoài và trữ ở 4°C. Với cách trữ này thì mẫu có thể trữ được trong vòng 10 ngày mà không bị hư hỏng khi lấy ra ngoài điều kiện nhiệt độ phòng.
- Việc trữ mẫu đã nghiền trong nitơ lỏng ở điều kiện -70°C có thể trữ được trong vòng 20 ngày và mẫu nhanh chóng bị hư hỏng (hóa nâu, dập...) ngay khi vừa lấy ra khỏi tủ lạnh.
- Để đạt được kết quả ly trích tốt nhất nên ủ mẫu với dịch trích EB ngay khi vừa nghiền xong.

4.2.2 Hoàn thiện quy trình ly trích.

Ban đầu chúng tôi thực hiện theo quy trình 1 (Quy trình ly trích mẫu tươi (Doyle và Doyle (1988))). Kết quả chúng tôi không thu được DNA mẫu hoặc là lượng DNA thu được không tinh sạch và bị gãy vụn rất nhiều. Có thể điều này là do quá trình bảo quản mẫu không tốt làm cho mẫu bị hư hỏng. Ngoài ra còn có thể do các thao tác ly trích chưa được chuẩn như vortex quá mạnh, nghiền mẫu quá mạnh làm DNA bị đứt gãy.

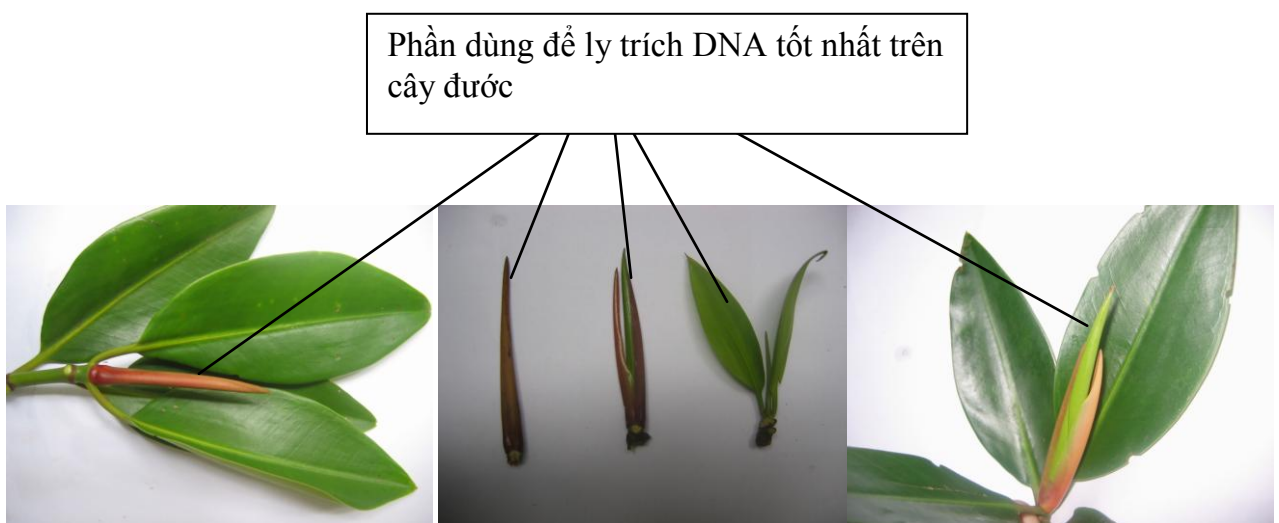
Mẫu DNA thu được từ quy trình này hoàn toàn không tinh sạch và không đủ tiêu chuẩn để chạy RAPD.

Việc ly trích DNA từ mẫu được gặp nhiều khó khăn vì lá được có chứa nhiều polysaccharide làm cho dịch trích rất nhớt. Có thể chất nhớt này đã hạn chế sự kết tủa của DNA và làm cho DNA bị trôi đi khi đổ bỏ dịch trong ở bước 6, 9, 10, 11. Đồng thời trong lá được còn chứa nhiều chất thứ cấp nên làm hạn chế tác dụng của các hóa chất ly trích.

Sau nhiều lần thay đổi một số yếu tố như thời gian ủ, lượng mẫu, tốc độ ly tâm, thử nghiền mẫu trong nitơ lỏng ... chúng tôi đã hoàn thiện và quyết định ly trích theo quy trình 2 (Quy trình cải tiến). Mẫu DNA thu được từ quy trình 2 tốt và đủ tiêu chuẩn để chạy RAPD.

Qua quá trình hoàn thiện quy trình ly trích, chúng tôi rút ra một số kết luận:

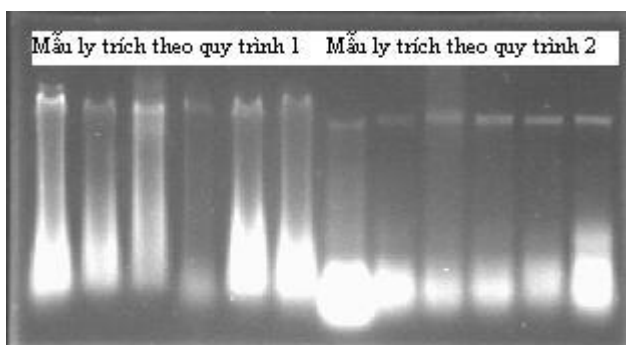
- Việc sử dụng nitơ lỏng trong giai đoạn nghiền mẫu cho kết quả ly trích tốt hơn so với mẫu nghiền trực tiếp với dịch trích EB. Mẫu lá được sau khi nghiền với nitơ lỏng nên ủ ngay với dịch trích EB để cho kết quả tốt hơn.
- Tăng thời gian ủ mẫu và giảm nhiệt độ ủ giúp cho lượng DNA được phóng thích tốt hơn.
- Giảm tốc độ ly tâm tránh cho DNA bị đứt gãy.
- Việc ly tâm và thu dịch nổi trước khi thêm Chloroform có thể đã loại bỏ được phần lớn chất thứ cấp trong lá được giúp cho Chloroform có tác dụng tốt hơn.
- Ly trích DNA từ mẫu lá được non sẽ dễ dàng hơn và DNA ly trích được có độ tinh sạch cao hơn. Lá non còn nằm trong 2 lá phụ màu đỏ được rửa sạch và lau khô để tiến hành ly trích.



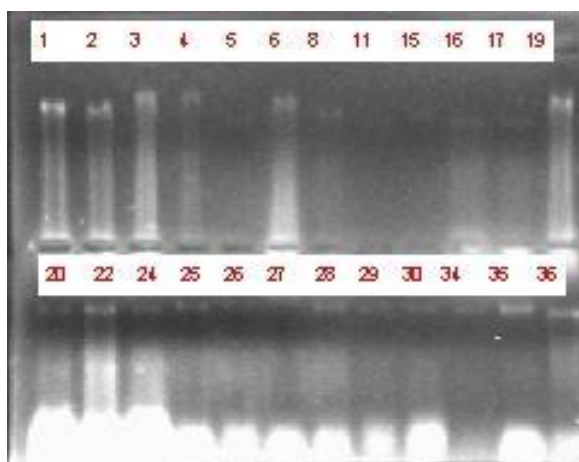
Hình 4.4: Phần lá non dùng để ly trích DNA

DNA mẫu thu được từ quy trình này khá tốt, kết quả điện di cho thấy rõ chất lượng của DNA mẫu thu được từ hai quy trình.

DNA mẫu thu được từ quy trình này khá tốt, kết quả điện di cho thấy rõ chất lượng của DNA mẫu thu được từ hai quy trình.



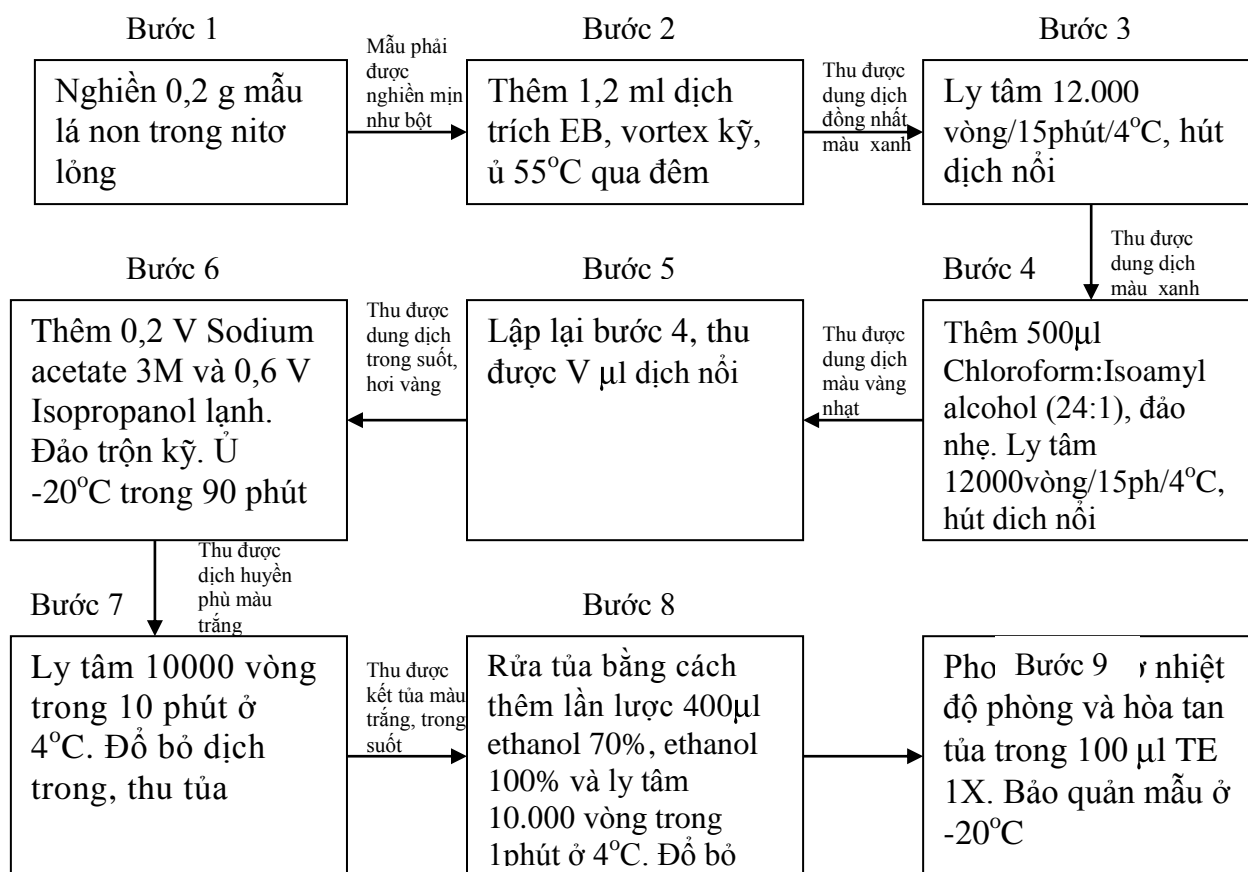
Hình 4.5: Sự khác biệt giữa DNA mẫu ly trích theo quy trình của Doyle (quy trình 1) và mẫu ly trích theo quy trình cải tiến (quy trình 2).



Hình 4.6: Các mẫu DNA ly trích được theo hai quy trình ly trích

Tuy nhiên kết quả đo OD cho thấy tỷ lệ mẫu đạt tiêu chuẩn còn thấp. Điều này là do những mẫu đó đã được ly trích lâu và trữ ở 4°C làm mất dần lượng DNA trong mẫu. Vì vậy chúng tôi quyết định trữ mẫu ở -20°C nhằm hạn chế sự mất dần lượng DNA trong mẫu.

Với kết quả như trên, chúng tôi quyết định ly trích DNA mẫu theo quy trình cải tiến (tóm tắt ở sơ đồ 4.1) để tiếp tục thực hiện kỹ thuật RAPD.



Sơ đồ 4.1 Quy trình cải tiến ly trích DNA từ lá đước

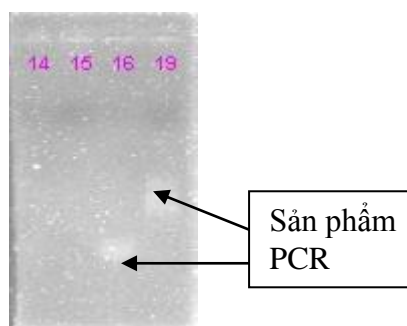
Quy trình ly trích sử dụng β -mercaptoethanol có tác dụng phá hủy mạnh thành tế bào giúp cho việc giải phóng DNA hiệu quả hơn, muối sodium acetate làm bất hoạt enzyme phân hủy DNA và cho chloroform isoamyl alcohol 2 lần với việc ly tâm tốc độ cao giúp loại bỏ được tạp chất như protein, polysaccharide...qua đó chất lượng DNA thu được tốt hơn. Nhìn chung quy trình ly trích khá ổn định và hiệu quả, vấn đề là tìm cách hạn chế sự đứt gãy của DNA, điều này phụ thuộc nhiều vào các tác nhân cơ học như nghiền mẫu, vortex mẫu.

Chúng tôi tiến hành ly trích trên 45 mẫu, kết quả thu được DNA trên 30 mẫu. Những mẫu ly trích không thành công là những mẫu lá đã trưởng thành. Điều này là do lá trưởng thành chứa nhiều chất thứ cấp như phenol, polysaccharide ... làm ảnh hưởng đến hoạt tính của hóa chất ly trích và làm mất một lượng lớn DNA trong quá trình loại bỏ tạp chất. Ngoài ra, việc bảo quản mẫu không tốt cũng là nguyên nhân làm cho lượng DNA trong mẫu bị mất đi.

4.3 Kết quả chạy RAPD.

4.3.1 Thí nghiệm 1: Sử dụng primer 11 với chu kỳ nhiệt 1

Qua thí nghiệm 1, chúng tôi thu được kết quả được thể hiện ở hình 4.7



Hình 4.7 Sản phẩm PCR ở thí nghiệm 1

Kết quả điện di cho thấy chu kỳ nhiệt và thành phần hóa chất trong phản ứng RAPD trong thí nghiệm 1 không phù hợp cho cây đước. Chúng tôi không thu được sản phẩm PCR trên hầu hết các mẫu. Chỉ có hai mẫu có đoạn DNA được khuếch đại nhưng rất mờ. Do không thể phân biệt được các band nên kết quả này chưa thể có ý nghĩa trong việc nghiên cứu đa dạng di truyền.

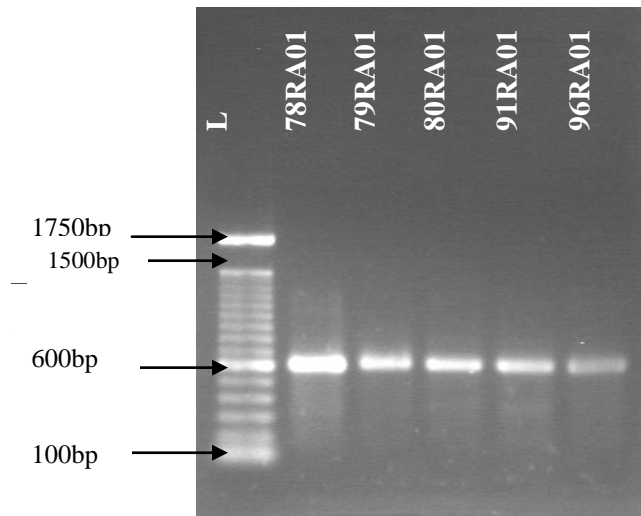
Điều này có thể do một số nguyên nhân như:

- Chất lượng mẫu chưa tốt, còn lẫn nhiều tạp chất làm ảnh hưởng đến phản ứng PCR.
- Lượng DNA mẫu chưa đủ.
- Lượng *Taq* polymerase sử dụng chưa đủ hoạt tính.
- Lượng primer chưa đủ.
- Chu kỳ nhiệt chưa tốt, thời gian kéo dài chưa đủ dẫn đến sản phẩm PCR không hoàn thiện.

Với những nhận định trên, chúng tôi đã có những thay đổi trong thành phần hóa chất cũng như chu kỳ nhiệt để có thể tối ưu hóa phản ứng PCR ở các thí nghiệm sau.

4.3.2 Thí nghiệm 2: Sử dụng primer 5 với chu kỳ nhiệt ở bảng 3.4

Qua thí nghiệm 2, chúng tôi thu được kết quả được thể hiện ở hình 4.8

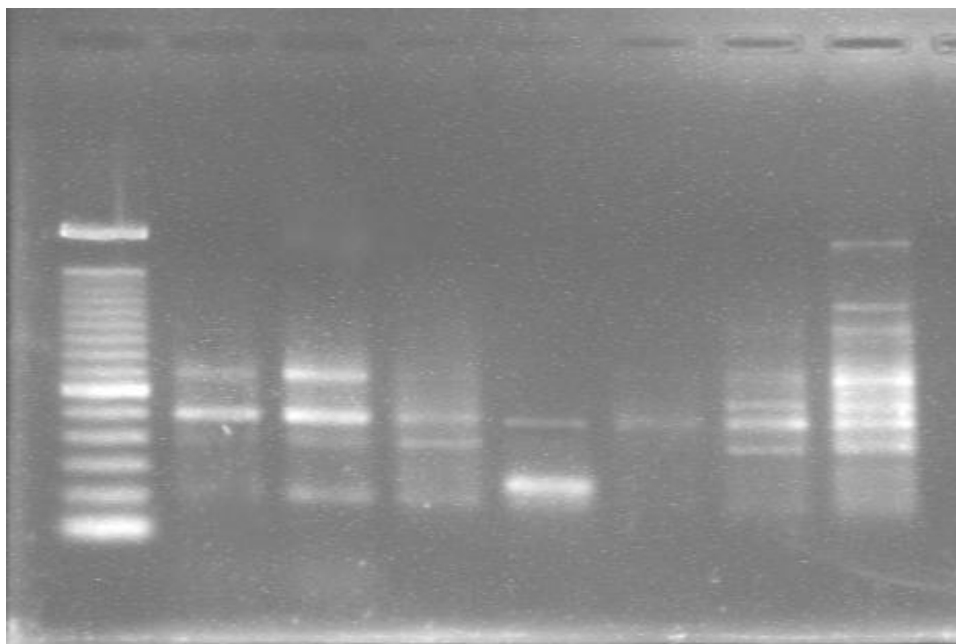


Hình 4.8: Sản phẩm PCR thí nghiệm 2

Kết quả điện di cho thấy sản phẩm PCR tốt nhưng chỉ cho 1 band đồng hình kích thước 600 bp. Mặc dù có những vệt smear có vẻ như là có thêm band nhưng qua phân tích trên công cụ “Detected band” của phần mềm Quality One cho kết quả là sản phẩm PCR với primer 5 chỉ có 1 band. Do chỉ có 1 band đồng hình nên kết quả ở thí nghiệm 2 không có ý nghĩa trong việc nghiên cứu đa dạng di truyền ở cây đước đôi. Tuy nhiên có thể band 600 bp là band đặc trưng cho cây đước đôi (*Rhizophora apiculata* Blume) và có thể là marker để phân biệt loài đước với các loài khác trong họ Rhizophoraceae. Do đó nên tách band này để giải trình tự nhằm phục vụ cho công tác nghiên cứu đặc thù cây đước ở rừng Cần Giờ.

4.3.3 Thí nghiệm 3: Sử dụng primer 11 với chu kỳ nhiệt ở bảng 3.6

Qua thí nghiệm 3, chúng tôi thu được kết quả được thể hiện ở hình 4.9



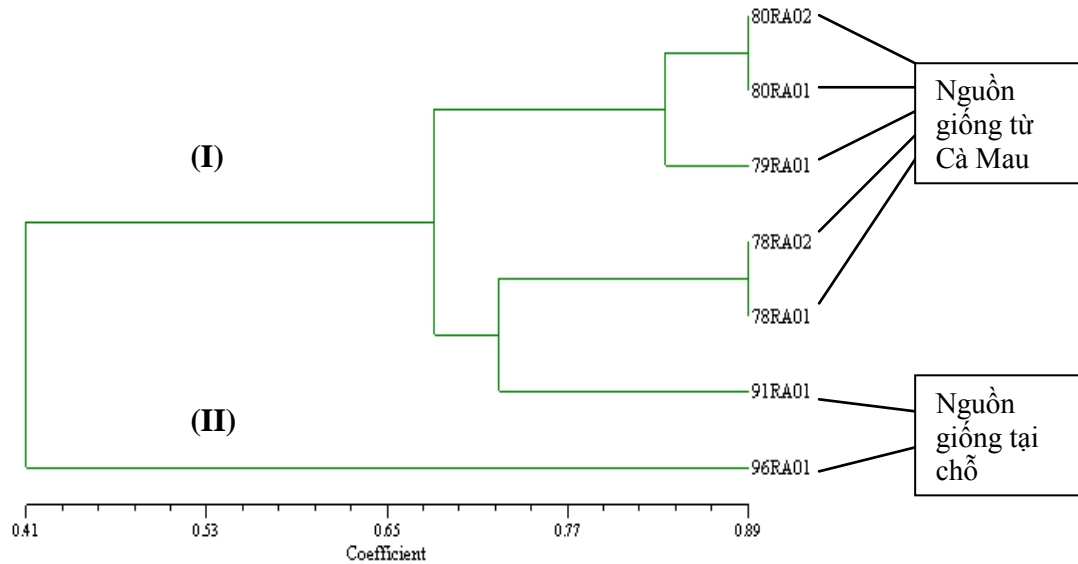
Hình 4.9: Sản phẩm PCR của thí nghiệm 3

Kết quả điện di cho thấy sản phẩm PCR tốt, cho độ đa hình cao.

Chúng tôi thực hiện chạy RAPD với primer 11 trên 7 mẫu kết quả thu được trung bình 3,5 band/mẫu. Số lượng band/mẫu không cao nhưng lại thể hiện rõ sự đa hình giữa các mẫu. Chúng tôi thu được 8 band đa hình chiếm tỷ lệ 88,9% và 1 band đồng hình chiếm tỷ lệ 11,1% (kích thước khoảng 500 bp), kích cỡ của các band khoảng từ 200 bp – 1700 bp (hình 4.9). Band đồng hình có mặt trong tất cả các mẫu còn band đa hình có ở mẫu này nhưng không có ở mẫu kia. Các band đa hình là cơ sở phân biệt giữa các mẫu có tính trạng khác nhau từ đó làm nền tảng để phân chia và xác định giống. Có band đa hình chỉ xuất hiện ở một vài mẫu như các band có kích thước khoảng 200 bp (mẫu 80RA01, 78RA01, 78RA02), 400 bp (mẫu 80RA01, 78RA01, 78RA02, 91RA01, 96RA01), 700 bp (mẫu 80RA01, 78RA02, 91RA01, 96RA01).

Tuy lượng mẫu nghiên cứu không lớn nhưng trong tất cả các mẫu nghiên cứu, band đồng hình 500 bp luôn xuất hiện. Band này có thể là band đặc biệt dùng để phân biệt loài đước (*Rhizophora apiculata* Blume) với các loài khác thuộc họ Rhizophoraceae. Do đó nên tách band này để giải trình tự nhằm giải đáp cho sự chênh lệch và phục vụ cho công tác phân biệt và chọn giống.

Từ kết quả thu được trên gel điện di chúng tôi mã hóa thành dạng nhị phân 0 và 1 để phân tích mối tương quan di truyền giữa các mẫu nghiên cứu bằng phần mềm NTSYS phiên bản 2.1.



Hình 4.10: Cây phân loài một số cây được đôi tại Khu Dự trữ sinh quyển ngập mặn Cần Giờ

Việc phân tích kết quả PCR trên phần mềm NTSYS cho kết quả như sau:

- 7 mẫu được khảo sát được chia làm 2 nhóm chính với khoảng cách phân nhóm là 0,41. Nhóm I gồm 6 mẫu: 78RA01, 78RA02, 79RA01, 80RA01, 80RA02, 91RA01. Đây là những mẫu được lấy từ những cây trồng từ nguồn giống tại Cà Mau. Các cây này có hệ số đồng dạng di truyền cao từ 0,66 – 0,89. Các cây trồng cùng năm có hệ số đồng dạng di truyền là 0,89. Nhóm II chỉ có 1 mẫu 96RA01 được trồng từ nguồn giống tại Cần Giờ.
- Những cây được đôi cùng năm tuổi (78RA01 và 78RA02; 80RA01 và 80RA02) có hệ số đồng dạng di truyền khá cao vào khoảng 89%. Điều này là hợp lý vì nguồn cây con để tái tạo rừng ngập mặn Cần Giờ từ năm 1978 đến 1990 đều lấy từ rừng ngập mặn Cà Mau.
- Những cây được đôi trồng từ nguồn giống tại chỗ và trồng từ nguồn giống từ Cà Mau có hệ số đồng dạng di truyền khá thấp. Đây là kết quả của quá trình lai tạo và thụ phấn chéo giữa các cây được đôi. Càng về sau thì hệ số đồng dạng di truyền giữa các cây được đôi sẽ giảm và sẽ tạo được sự đa dạng sinh học cần thiết để tái tạo rừng.

PHẦN 5: KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1 Kết luận.

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

- ❖ Quá trình bảo quản mẫu lâu dài ở -20°C , -80°C có ảnh hưởng đến chất lượng DNA mẫu thu được khi ly trích.
- ❖ Sử dụng lá được non để ly trích sẽ thu được lượng DNA mẫu tốt nhất.
- ❖ Mẫu lá khi vừa nghiền xong nên ủ ngay với dịch trích EB.
- ❖ Quy trình ly trích DNA của lá được khá ổn định. Ly trích được 35 mẫu (trên tổng số 45 mẫu) đạt DNA tiêu chuẩn dùng trong các kỹ thuật sinh học phân tử.
- ❖ Quá trình bảo quản DNA mẫu rất quan trọng. Một số mẫu DNA được ly trích đã bị mất dần lượng DNA khi bảo quản ở 4°C .
- ❖ Quy trình RAPD vẫn chưa hoàn thiện. Có thể là do sử dụng những mẫu DNA được đã ly trích lâu hoặc quy trình nhiệt chưa ổn định. Chúng tôi đã không thành công trong việc chạy RAPD trên mẫu được có trái màu đỏ và mẫu được *Rhizophora x lamarckii* (được 4 bông).
- ❖ Primer 11 dùng trong kỹ thuật RAPD cho 9 band đối với các mẫu thí nghiệm, trong đó có 1 band đồng hình và 8 band đa hình. Primer 11 có tính đa hình đối với quần thể được đôi (*Rhizophora apiculata* Blume) tại Khu Dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ. Độ đa hình dạng giữa các mẫu thấp ngoại trừ mẫu 96RA01.
- ❖ Primer 5 dùng trong kỹ thuật RAPD chỉ cho 1 band đồng hình. Primer 5 có độ đa hình thấp đối với quần thể được đôi (*Rhizophora apiculata* Blume) tại Khu Dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ.
- ❖ Với việc phân tích RAPD sử dụng primer 11 thì quần thể được tại Khu Dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ có hệ số đồng dạng di truyền trên cây phát sinh chủng loại dao động trong khoảng 0,41 – 0,89.

5.2 Đề nghị.

- ❖ Tối ưu hóa quy trình RAPD trên cây đước đôi.
- ❖ Tiếp tục sử dụng primer 11 để đánh giá tính đa dạng di truyền với một lượng mẫu lớn hơn đối với quần thể đước.
- ❖ Khảo sát thêm các primer khác nhằm có được kết quả đa dạng di truyền chính xác nhất.
- ❖ Tách riêng band 600 bp khi chạy RAPD với primer 5 và band 500 bp khi chạy RAPD với primer 11 để giải trình tự nhằm phục vụ cho việc phân biệt giữa loài đước (*Rhizophora apiculata* Blume) với các loài khác thuộc họ Rhizophoraceae trong rừng ngập mặn.
- ❖ Phải có chính sách làm giàu nguồn tài nguyên di truyền, nâng cao tính đa dạng và bảo đảm sự phát triển bền vững của Khu Dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ nói chung và của quần thể đước đôi (*Rhizophora apiculata* Blume) nói riêng.
- ❖ Nghiên cứu thêm về những cây đước đôi có hình thái khác lạ trong Khu Dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ. Tại Khu Dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ còn có một loài có tên địa phương là đước râu với những đặc điểm hình thái rất khác so với giống đước (*Rhizophora apiculata* Blume.). Do vị trí phân bố của đước râu khá xa (thuộc tiểu khu 14) nên chúng tôi chưa có điều kiện lấy mẫu nghiên cứu. Hiện nay vẫn chưa xác định được tên khoa học chính xác của loài này. Vì vậy chúng tôi đề nghị nghiên cứu trên cây đước râu để có khả năng phát hiện ra được một loài mới tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TÀI LIỆU TIẾNG VIỆT:

1. Bùi Trang Việt, 2002. *Bài giảng Sinh học phân tử*. Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh.
2. Hồ Huỳnh Thuỳ Dương, 2002. *Sinh học phân tử*. Nhà xuất bản giáo dục.
3. Nguyễn Đức Thành, 2004. *Một số kỹ thuật chỉ thị phân tử*. Nhà xuất bản viện khoa học và công nghệ Việt Nam – Viện Công nghệ Sinh học Hà Nội.
4. Nguyễn Ngọc Bình, 2004. *Cẩm nang ngành Lâm nghiệp*. Nhà xuất bản Giao thông vận tải.
5. Nguyễn Thị Lang, Bùi Chí Bửu, 2005. *Sinh học phân tử giới thiệu phương pháp và ứng dụng*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp.
6. 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*. Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh.
7. Phạm Thành Hồ, 1998. *Di truyền học*. Nhà xuất bản giáo dục TP. Hồ Chí Minh.

TÀI LIỆU TIẾNG NƯỚC NGOÀI:

1. Akira Komiyamaa, 1998. *Mortality and growth of cut pieces of viviparous mangrove (Rhizophora apiculata and R. mucronata) seedlings in the field condition*. Forest Ecology and Management, 112 (1998) p 227 – 231.
2. Bo Christensen, 1978. *Biomass and primary production of Rhizophora apiculata Bl. In a mangrove in Southern Thailand*. Aquatic Botany, 4 (1978) p. 43 – 52.
3. F. Blasco, 1996. *Mangroves as indicators of coastal change*. Catena, 27 (1996) p. 167 – 178.
4. Iika C. Feller and Marsha Sitnik, 1996. *Mangrove ecology workshop manual*. Smithsonian Institution, Washington. DC.
5. J. Terrados, 1997. *The Effect of Increased Sediment Accretion on the Survival and Growth of Rhizophora apiculata Seedlings*. Estuarine, Coastal and Shelf Science (1997) 45, p 697 – 701.

6. Kazutoshi Okuno and Shuichi Fukuoka, 1998. Manual for DNA extraction in plants. Japan international cooperation agency.
7. Madasamy Parani, 1997. *Molecular Phylogeny of mangroves III Parentage analysis of a Rhizophora hybrid using Random Amplified Polymorphic DNA and Restriction Fragment Length Polymorphism markers*. Aquatic Botany 58 (1997) p 165-172.
8. Mukkamala Lakshmi, 2002. *Molecular phylogeny of mangroves IX Molecular marker assisted intra-specific variation and species relationships in the Indian mangrove tribe Rhizophoreae*. Aquatic Botany, 74 (2002) p. 201 – 217.

TRANG WEB:

1. <http://www.nea.gov.vn/nIndex.asp?ID=22275>
2. <http://www.weihenstephan.de/pbpz/bambara/html/rapd.html>

PHỤ LỤC

Bảng thống kê các mẫu đước đôi thu thập được tại Khu Dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ.

STT	TÊN MẪU	VỊ TRÍ LẤY MẪU	ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI
1	80RA01	Tiểu khu 11	Cây to, mọc tốt, chia làm 3 thân chính.
2	80RA02	Tiểu khu 11	Cây ốm yếu, bị mối ăn.
3	80RA03	Tiểu khu 11	Cây mọc tốt.
4	80RA04	Tiểu khu 11	Cây mọc tốt.
5	80RA05	Tiểu khu 11	Lá cây có màu xanh đậm.
6	80RA06	Tiểu khu 11	Cây mọc yếu ớt.
7	80RA07	Tiểu khu 12	Cây mọc yếu, gốc bị sạt lở.
8	80RA08	Tiểu khu 12	Cây mọc yếu, gốc bị sạt lở.
9	80RA09	Tiểu khu 12	Cây mọc yếu, gốc bị sạt lở.
10	80RA10	Tiểu khu 12	Cây mọc yếu, gốc bị sạt lở.
11	80RA11	Tiểu khu 11	Cây mọc yếu, bị dây leo quấn.
12	80RA12	Tiểu khu 11	Cây mọc yếu, bị dây leo quấn.
13	80RA13	Tiểu khu 11	Cây mọc yếu, thân bị u.
14	80RA14	Tiểu khu 11	Cây mọc yếu, thân bị u.
15	80RA15	Tiểu khu 11	Cây mọc yếu, bị mối ăn.
16	79RA01	Tiểu khu 11	Cây mọc tốt.
17	79RA02	Tiểu khu 11	Cây mọc tốt.
18	79RA03	Tiểu khu 11	Cây mọc tốt.
19	79RA04	Tiểu khu 12	Cây mọc yếu, gốc bị sạt lở.
20	79RA05	Tiểu khu 12	Cây mọc yếu, gốc bị sạt lở.
21	78RA01	Tiểu khu 11	Cây mọc yếu, gốc bị sạt lở.
22	78RA02	Tiểu khu 11	Cây mọc yếu, gốc bị sạt lở.

23	78RA03	Tiểu khu 11	Cây mọc yếu, gốc bị sạt lở.
24	78RA04	Tiểu khu 12	Cây mọc yếu, gốc bị sạt lở.
25	78RA05	Tiểu khu 12	Cây mọc yếu, gốc bị sạt lở.
26	92RA01	Khu An Hòa, An Phước	Cây to, phát triển tốt.
27	92RA02	Khu An Hòa, An Phước	Cây to, phát triển tốt, cây có 3 thân chính.
28	91RA01	Tiểu khu 6b	Cây nhỏ, phát triển kém.
29	91RA02	Tiểu khu 6b	Cây nhỏ, phát triển kém.
30	91RA03	Tiểu khu 6b	Cây nhỏ, phát triển kém.
31	91RA04	Tiểu khu 6b	Cây nhỏ, phát triển kém.
32	96RA01	Khu An Hòa, An Phước	Cây to, phát triển tốt.
33	96RA02	Khu An Hòa, An Phước	Cây to, phát triển tốt.
34	96RA03	Khu An Hòa, An Phước	Cây to, phát triển tốt.
35	96RA04	Khu An Hòa, An Phước	Cây to, phát triển tốt.
36	96RA05	Khu An Hòa, An Phước	Cây to, phát triển tốt.
37	96RA06	Khu An Hòa, An Phước	Cây to, phát triển tốt.
38	74RA01	Tiểu khu 4b	Cây cao, mọc yếu ớt.
39	74RA02	Tiểu khu 4b	Cây cao, mọc yếu ớt.
40	74RA03	Tiểu khu 4b	Cây cao, mọc yếu ớt.
41	74RA04	Tiểu khu 4b	Cây cao, mọc yếu ớt.
42	74RA05	Tiểu khu 4b	Cây cao, mọc yếu ớt.
43	80TĐ01	Tiểu khu 11	Cây có cả trái đỏ và xanh.
44	80TĐ02	Tiểu khu 11	Cây có cả trái đỏ và xanh.
45	RL01	Tiểu khu 15	Cây đước lai, có 4 bông.

Ghi chú:

- 80RA01: Cây đước đôi trồng năm 1980, thứ tự lấy mẫu là 01.
- 80TĐ01: Cây đước đôi trồng năm 1980, có cả trái đỏ và trái xanh, thứ tự lấy mẫu là 01.
- RL: Cây đước lai *Rhizophora x lamarckii* (đước 4 bông).

Danh mục các loài thuộc họ đước Rhizophoraceae

TÊN KHOA HỌC	TÊN VIỆT NAM
<i>Bruguiera cylindrical</i> (L.) Blume	Vẹt trụ
<i>Bruguiera gymnorhize</i> (L.) Lamk	Vẹt dù
<i>Bruguiera parviflora</i> (Roxb.) W. & Arn. Ex. Griff	Vẹt tách, Vẹt kang
<i>Bruguiera sexangula</i> (Lour.) Poir. In Lamk	Vẹt đen
<i>Ceriops decandra</i> (Griff.) Ding Hou	Dà quánh
<i>Ceriops tagal</i> (Pers) C.B. Rob	Dà vôi
<i>Kandelia candel</i> (L.) Druce	Trang
<i>Rhizophora apiculata</i> Bl.	Đước đôi
<i>Rhizophora mucronata</i> Poir. in Lamk.	Đưng, Đước xanh
<i>Rhizophora stylosa</i> Griff.	Đước vôi

(Nguồn : Viên Ngọc Nam (1993))

Danh mục các loài sinh vật quý hiếm ở Khu Dự trữ sinh quyển rừng ngập mặn Cần Giờ

Tên khoa học	Tên địa phương
Reptilia	Lớp bò sát
<i>Gekko gekko</i>	Tắc kè
<i>Varanus salvator</i>	Kỳ đà nước
<i>Python molurus</i>	Trăn đất
<i>Pythonreticulatus</i>	Trăn gấm
<i>Bugaris fasciculatus</i>	Rắn cạp nong
<i>Naja naja</i> SĐVN xếp T	Rắn hổ mang
<i>Ophiophagus hannah</i>	Rắn hổ chúa
<i>Chelonia mydas</i>	Vích
<i>Eretmochelis imbricata</i>	Đồi mồi
<i>Lepidochelus olivacea</i>	Quân đồng
<i>Crocodylus porosus</i>	Cá sấu hoa cà
Aves	Lớp chim
<i>Pelecanus philppensis</i>	Bộ nông chân xám
<i>Mycteria leucocephala</i>	Giang sen
<i>Mycteria cinerea</i>	Cò lạo xám
<i>Leptoptilos Javanicus</i>	Già đẫy nhỏ
<i>Tringa guttifer</i>	Choắt lớn mỏ vàng
<i>Pica pica</i>	Ác là
Mammalia	Lớp thú
<i>Lutra lutra</i>	Rái cá thường
<i>Aouyx cinerea</i>	Rái cá vuốt bé
<i>Felis viverrina</i>	Mèo cá
<i>Felis bengulensis</i>	Mèo rừng

Nguồn: Bùi Lai và cộng sự. 1996, (MAB Vietnam, 1998. Proposed Biosphere Reserve of Can Gio Mangroves. HCM City)

Thống kê hiện trạng rừng – đất của 24 tiểu khu thuộc Khu Bảo tồn thiên nhiên rừng ngập mặn Cần Giờ

Tiểu khu	Rừng trồng (ha)	Rừng tự nhiên (ha)	Đất trống	Đất khác	Tổng diện tích (ha)
1	890,41	309,14		29,65	1.229,20
2	1.236,41	355,04	34,03	232,16	1.857,64
3	719,09	449,85		81,22	1.250,16
4	1.200,39	369,20	34,14	137,50	1.741,23
5	772,17	252,15	21,21	99,42	1.144,95
6	980,40	397,79	29,45	125,25	1.532,89
7	624,71	230,83		265,68	1.121,22
8	960,49	133,17	157,84	268,72	1.520,22
9	923,34	440,43	86,06	129,97	1.579,80
10	1.236,58	298,89	5,63	62,53	1.603,63
11	667,28	314,47	5,55	249,52	1.236,82
12	775,53	141,59		261,52	1.178,64
13	898,42	243,55		373,61	1.515,58
14	740,17	299,43		486,33	1.525,93
15	1.024,04	539,97	212,09	414,16	2.190,26
16	782,36	325,82	13,80	492,33	1.614,31
17	1.252,85	569,35		172,77	1.994,97
18	746,54	468,82		466,85	1.682,21
19	518,49	354,16		421,15	1.293,80
20	762,90	618,33	80,04	448,73	1.910,00
21	722,62	322,85	5,90	778,16	1.829,53
22	300,83	246,09	2,80	229,93	779,65
23	1.434,00	416,86		1.093,18	2.944,04
24	1.257,42	860,28	57,56	212,04	3.387,30
Tổng	21.427,44	8.958,06	746,10	7.532,38	38.663,98

(Nguồn: Ban quản lý Khu Bảo tồn thiên nhiên rừng ngập mặn Cần Giờ)

