

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

Nguyễn Thị Thắm

ỨNG DỤNG CÁC CHỈ THỊ ADN TRONG BẢO TỒN MỘT SỐ
ĐỘNG VẬT HOANG DÃ TẠI VIỆT NAM

Chuyên ngành: Khoa học môi trường

Mã số: 9440301.01

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC MÔI TRƯỜNG

Hà Nội, 2024

Công trình được hoàn thành tại: Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. Lê Đức Minh

PGS. TS. Nguyễn Thị Hồng Vân

Phản biện: GS.TS. Vũ Đình Thống, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện HLKH&CN Việt Nam

Phản biện: PGS.TS. Lư Quang Vinh, Trường Đại học Lâm Nghiệp Việt Nam

Phản biện: PGS.TS. Hoàng Văn Ngọc, Trường Đại học khoa học, Đại học Thái Nguyên

Luận án đã được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ họp tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - ĐHQGHN vào hồi 9 giờ 00 ngày 10 tháng 12 năm 2024

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam;
- Trung tâm Thư viện và Tri thức số, Đại học Quốc gia Hà Nội

MỞ ĐẦU

1. Lý do lựa chọn đề tài

Nghiên cứu về các đặc điểm sinh thái của loài, hiện trạng quần thể giúp hỗ trợ đắc lực cho việc định hướng bảo tồn. Tuy nhiên, các phương pháp nghiên cứu truyền thống dựa vào các chỉ thị hình thái, đặc điểm sinh thái chưa thể cung cấp đầy đủ và chính xác những thông tin cần thiết. Việc kết hợp thông tin có từ các chỉ thị sinh học phân tử sẽ giúp đưa ra các chiến lược bảo tồn phù hợp hơn. Tuy nhiên các nghiên cứu bảo tồn tại Việt Nam hiện nay chưa khai thác hết được tiềm năng của các chỉ thị sinh học phân tử để ứng dụng vào thực tiễn bảo tồn. Do vậy đề tài: “**Ứng dụng các chỉ thị ADN trong bảo tồn một số động vật hoang dã tại Việt Nam**” được nghiên cứu. Các kết quả của luận án là cơ sở để đưa ra những kiến nghị trong công tác bảo tồn nguyên vị và chuyển vị. Nghiên cứu này cũng giúp xây dựng nền tảng cơ bản cho các nghiên cứu đa dạng di truyền và di truyền học bảo tồn của các loài động vật hoang dã tại Việt Nam trong tương lai.

2. Mục tiêu nghiên cứu

- Ứng dụng chỉ thị sinh học phân tử trong nghiên cứu bảo tồn đa dạng sinh học với một số đối tượng nghiên cứu điển hình
- Đề xuất biện pháp bảo tồn phù hợp với các đối tượng nghiên cứu dựa trên các kết quả thu được.

3. Nội dung nghiên cứu

(1) Ứng dụng các chỉ thị sinh học phân tử trong nghiên cứu bảo tồn đa dạng sinh học các nhóm thú nhỏ, Thằn lằn cá sấu và Voi châu á

(a) Nghiên cứu đa dạng khu hệ thú nhỏ tại khu vực núi vùng đá vôi Đông Bắc

- Lập danh lục thành phần thú nhỏ tại vùng núi đá vôi Đông Bắc dựa trên dữ liệu sinh học phân tử và đặc điểm hình thái nhận dạng.

- Xác định vị trí phân loại một số taxon dựa trên chỉ thị sinh học phân tử.

- Sử dụng chỉ thị sinh học phân tử kết hợp đặc điểm hình thái để định loại một số loài đồng hình, khó phân biệt bằng hình thái ngoài.

(b) Nghiên cứu di truyền quần thể Thằn lằn cá sấu tại Việt Nam

- Xác định quan hệ di truyền giữa các quần thể tại Việt Nam và Trung Quốc.

- Đánh giá đa dạng di truyền quần thể, hiện tượng nút cổ chai, giao phối cận huyết của quần thể Thằn lằn cá sấu tại Việt Nam.

- Xác định nguồn gốc phân bố mẫu Thằn lằn cá sấu trong buôn bán và tại các cơ sở nuôi nhốt.

(c) Đánh giá quần thể Voi châu á tại VQG Yok Đôn

- Xác định các cá thể voi nhà và voi hoang dã trong khu vực nghiên cứu.

- Xác định voi nhà và voi hoang dã từ mẫu phân thu thập.

- Đánh giá đa dạng di truyền, mức độ giao phối cận huyết trong các quần thể voi nhà, voi tự nhiên tại khu vực VQG Yok Đôn.

(2) Kiến nghị cho công tác bảo tồn các đối tượng nghiên cứu

- Kiến nghị cho công tác bảo tồn các loài thú nhỏ ở vùng núi Đông Bắc

- Kiến nghị cho công tác bảo tồn Thằn lằn cá sấu

- Kiến nghị cho công tác bảo tồn Voi châu á tại Yokdon

4. Những đóng góp mới của luận án

Việc sử dụng các chỉ thị sinh học phân tử kết hợp với các phương pháp nghiên cứu khác, luận án đã:

- Lập được danh lục cập nhật các loài thú nhỏ tại vùng núi đá vôi Đông Bắc, đưa ra dẫn liệu về sự khác biệt về mặt di truyền cho hai giống Tupaia và Euroscaptor tại khu vực nghiên cứu.

- Đánh giá được hiện trạng di truyền quần thể của loài Thằn lằn cá sấu và quần thể Voi châu á tại Việt Nam.

- Bổ sung cơ sở dữ liệu ADN về gen ty thể, microsatellite của các loài nghiên cứu để sử dụng trong phân tích xác định nguồn gốc các cá thể thu được từ buôn bán và các nghiên cứu bảo tồn trong tương lai.

- Đưa ra được những khuyến nghị trong công tác bảo tồn các loài động vật hoang dã trong nghiên cứu, đặc biệt là với những loài còn ít nhận được sự quan tâm trong bảo tồn dựa trên kết quả nghiên cứu của luận án.

5. Ý nghĩa khoa học và khoa học thực tiễn

(a) Ý nghĩa khoa học

- Nghiên cứu này đã thử nghiệm các chỉ thị phân tử để giải quyết các vấn đề về đa dạng, bảo tồn khu hệ thú nhỏ, Thằn lằn cá sấu và Voi châu á ở Việt Nam.

(b) Ý nghĩa thực tiễn

Các kết quả của luận án là cơ sở khoa học đáng tin cậy cho những định hướng trong việc bảo tồn các loài động vật hoang dã được

nghiên cứu và định hướng ứng dụng di truyền học bảo tồn trong tương lai tại Việt Nam.

Cấu trúc của luận án

Nội dung chính của luận án gồm 3 chương, ngoài phần mở đầu, kết luận, tài liệu tham khảo và phụ lục.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU

1.1. Ứng dụng các chỉ thị sinh học phân tử trong nghiên cứu bảo tồn động vật hoang dã trên thế giới

**** Lược sử ra đời chỉ thị sinh học phân tử và ứng dụng trong nghiên cứu bảo tồn đa dạng động vật hoang dã thế giới***

Phương pháp sinh học phân tử với cách lấy mẫu ít gây hại đến cá thể và không xâm lấn có tiềm năng lớn để nghiên cứu bảo tồn các loài động vật hoang dã, đánh giá hiện trạng quần thể giúp giải quyết sự khó áp dụng của các phương pháp cũ.

Dự án hệ gen người được bắt đầu thực hiện mở ra thời kỳ nghiên cứu là cơ sở dữ liệu để ứng dụng nghiên cứu các chỉ thị sinh học phân tử trong di truyền bảo tồn.

**** Một số chỉ thị sinh học phân tử sử dụng trong nghiên cứu bảo tồn động vật hoang dã***

Phân tích đoạn (Fragment analysis), mã vạch di truyền, microsatellite AND, đa hình nucleotide đơn (SNP), nghiên cứu hệ gen (genome), gen biểu hiện là một số là các chỉ thị và phương pháp đã và được sử dụng trong nghiên cứu bảo tồn được thực hiện thế giới. Mã vạch di truyền đang dần được sử dụng khá phổ biến tại Việt Nam

trong khi các chỉ thị khác ít được sử dụng do chi phí và mức độ phức tạp của kỹ thuật.

Trên thế giới, việc sử dụng các cơ sở dữ liệu trên nền web để truy xuất số liệu trực tuyến ngày càng trở nên phổ biến với đa dạng loại thông tin về cả hình thái và dữ liệu sinh học phân tử. Các cơ sở dữ liệu tạo điều kiện thuận lợi để truy xuất thông tin phục vụ bảo tồn.

1.2. Ứng dụng chỉ thị sinh học trong nghiên cứu bảo tồn đa dạng động vật hoang dã ở Việt Nam

1.2.1. Ứng dụng chỉ thị sinh học phân tử trong phân loại học

Phân loại học đóng vai trò quan trọng trong việc bảo tồn các loài động vật đặc biệt là các loài nguy cấp với các ứng dụng: xác định các nhóm loài khác nhau, hỗ trợ tái thả về đúng khu vực phân bố, hỗ trợ định danh trong thực thi pháp luật. Hiện nay chỉ thị được ứng dụng chủ yếu là mã vạch di truyền.

1.2.2. Các nghiên cứu ứng dụng xác định con lai, hiện trạng quần thể, bệnh động vật hoang dã

Xác định con lai đóng vai trò trong việc hỗ trợ thực thi pháp luật và các chương trình tái thả và đang dần được ứng dụng tại Việt Nam.

Để thực hiện các chương trình tái thả, các phương pháp xét nghiệm bệnh đã và đang được ứng dụng.

Các phương pháp sinh học phân tử giúp cho việc đánh giá hiện trạng quần thể được thực hiện dễ dàng hơn so với các phương pháp nghiên cứu truyền thống

Nhận xét

Các phương pháp SHPT đã giúp giải quyết nhiều vấn đề khó khăn trong việc nghiên cứu với đối tượng động vật như khó khăn trong việc lấy mẫu, bảo quản mẫu đồng thời giải quyết các vấn đề liên quan đến bảo tồn:

+ Trong phân loại học, phương pháp sinh học phân tử giúp đưa ra các thông tin về khác biệt di truyền có tính chính xác và hiệu quả cao ở cấp độ loài hoặc dưới loài.

+ Nghiên cứu di truyền quần thể giúp đánh giá chính xác hiện trạng đa dạng di truyền trong quần thể, đánh giá giao phối cận huyết, thất cổ chai từ đó xây dựng kế hoạch bảo tồn hiệu quả đến cấp độ quần thể.

+ Các cơ sở dữ liệu sinh học phân tử đang ngày càng phát triển và lượng thông tin lưu trữ rất lớn từ nghiên cứu hệ gen là nguồn thông tin hữu ích cho các nghiên cứu trong tương lai ứng dụng trong bảo tồn.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Tổng quan về đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Các nghiên cứu Khu hệ thú nhỏ tại vùng núi đá vôi Đông Bắc

Các nghiên cứu trước đây về khu hệ thú nhỏ ở vùng núi đá vôi Đông Bắc chưa nghiên cứu tình trạng phân loại và tình trạng bảo tồn của nhiều loài thú nhỏ trong khu vực này cần được nghiên cứu thêm.

2.1.2. Quần thể thằn lằn cá sấu (*Shinisaurus crocodilurus*)

Nghiên cứu gần đây cho thấy và quần thể tại Việt Nam là một loài phụ riêng biệt, *Shinisaurus crocodilurus vietnamensis*. Dữ liệu từ chỉ thị microsatellite và ty thể cho ra kết quả khác nhau khi dữ liệu microsatellite tách được một nhóm quần thể tại Trung Quốc thành hai nhóm.

Do đó, để xây dựng được kế hoạch bảo tồn cho quần thể Việt Nam cần áp dụng phân tích quần thể thêm với dữ liệu microsatellite và dữ liệu ty thể đoạn dài.

2.1.3. Quần thể Voi châu á tại vườn quốc gia Yok Đôn

Các phương pháp khác về cơ bản giúp định dạng các cá thể khác nhau nhưng không cung cấp thông tin về dạng di truyền, mức độ giao phối cận huyết của quần thể được nghiên cứu.

Mặc dù Gray và cộng sự, 2014 đã nghiên cứu về di truyền quần thể đối với đàn voi ở Campuchia, tuy nhiên nghiên cứu về voi tại Yok Đôn hiện vẫn chưa được thực hiện.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu thập mẫu vật

Thu mẫu thú nhỏ tại vùng núi đá vôi Đông Bắc

Thu mẫu Thằn lằn cá sấu

Thu mẫu phân Voi châu á tại Vườn quốc gia Yok Đôn

2.2.2. Nghiên cứu trong phòng thí nghiệm

2.2.2.1. Phân tích đặc điểm hình thái nhóm thú nhỏ

Các mẫu vật được đo các đặc điểm hình thái theo Driesch (1976), Lunde và Nguyen (2001), Endo và cộng sự 1999, 2000 với độ chính

xác đến 0,01 mm hoặc 0,01 g, bao gồm: dữ liệu hình thái ngoài và đo số.

2.2.2.2. Phân tích sinh học phân tử

*** Các chỉ thị sử dụng trong nghiên cứu**

Gen ty thể

Đối với mẫu thằn lằn cá sấu là một đoạn gen ty thể gồm đoạn cytb, một phần tRNA-Glu, và một phần D-loop theo của Huang và cộng sự (2014).

Đoạn gen ty thể được khuếch đại với mẫu voi là một phần D-loop theo nghiên cứu của Kaden và cộng sự (2018)

Các đoạn gen dùng để định danh và sử dụng trong nhóm thú nhỏ là các đoạn cyt b, COI, 12S được tham khảo trong nghiên cứu của Irwin 1991, Mindel và cộng sự 1991, Kocher và cộng sự 1989, Geller và cộng sự 2013. Đoạn cytb dùng cho các nhóm gặm nhấm và Bộ nhiều răng. Đoạn 12S, Rag1, cytb cho nhóm Chuột chũi. Đoạn COI được sử dụng trong phân tích nhóm dơi.

Gen nhân

Đoạn Rag 1 được sử dụng trong phân tích phân loại học với nhóm chuột chũi.

Micosatellite

Các môi để khuếch đại các đoạn micosatellite với Thằn lằn cá sấu được gắn huỳnh quang và tham khảo từ Huang và cộng sự 2012.

Các môi để khuếch đại các đoạn micosatellite với Voi châu á được gắn huỳnh quang với 4 màu là HEX, FAM, TAMRA, và ATTO565 ở một chiều xuôi (Bảng 2.3).

* Quy trình thí nghiệm

Hóa chất và thiết bị

Quy trình

Tách chiết sử dụng các bộ Kit tùy thuộc vào bản chất mẫu: *GeneJET Genomic DNA Purification Kit QIAamp DNA Stool Mini Kit* (Quiagen):

PCR

Tinh sạch sản phẩm PCR

2.3. Phân tích dữ liệu

2.3.1. Xử lý dữ liệu thô

Dữ liệu trình tự gen ty thể, gen nhân

ClustalX v2.1 [7]: đóng hàng các trình tự.

Sequencher v5.4: ghép nối hai chiều trình tự các trình tự ADN

Dữ liệu *microsatellite*

Geneious v.7.1.8 [4]: phân tích dữ liệu genotyping.

2.3.2. Phân tích tin sinh

- *Phân tích thống kê*:

Chỉ số Sorensen–Dice được sử dụng để so sánh sự tương đồng về thành phần loài giữa hai vùng. Chỉ số này được tính dựa theo công thức:

$$d_{jk} = 2M / (2M + N)$$

Trong đó M là số loài xuất hiện ở cả hai vùng và N là tổng số loài chỉ xuất hiện ở một vùng.

- *Phân tích dữ liệu quần thể*:

STRUCTURE v2.3.4 [2]: xác định cấu trúc của toàn bộ dữ liệu và phân nhóm các cá thể thành các nhóm riêng biệt bằng phương pháp phân nhóm Bayesian. Kết quả sẽ được hiển thị bằng website STRUCTURE HARVESTER [1].

Arlequin v3.5.2.2 [3]: phân tích giá trị thống kê F.

BOTTLENECK 1.2.02 [5]: phân tích hiện tượng thắt cổ chai xảy ra khi quần thể sinh sản

Phân tích dữ liệu trình tự liên quan đến phân loại, xác định phân bố

Dữ liệu được phân tích bằng phương pháp Bayes (BI) trong phần mềm **MrBayes v3.2.1**. Mô hình tiến hóa nucleotide phù hợp được xác định bằng phần mềm **Jmodeltest v2.1.4** với các tham số được ước tính bởi MrBayes v3.2.1.

Phân tích tiết kiệm tối đa (Maximum Parsimony - MP) được thực hiện trong phần mềm **PAUP * 4.0b10** [6], phương pháp hợp lý tối đa (Maximum Likelihood - ML) trong phần mềm **IQ-TREE v1.6.7.1**.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ứng dụng chỉ thị SHPT trong nghiên cứu đa dạng loài thú nhỏ ở khu vực núi đá vôi vùng Đông Bắc

3.1.1. Thành phần các loài thú nhỏ tại khu vực núi đá vôi Đông Bắc

Kết quả đã ghi nhận được 64 loài thuộc 4 bộ, 14 họ, 37 giống. Trong đó, Khu bảo tồn loài và sinh cảnh Nam Xuân Lạc ghi nhận 27 loài thuộc 4 bộ, 10 họ, 21 giống; KBTTN Bắc Mê ghi nhận 28

loài thuộc 4 bộ, 10 họ, 19 giống; KBTTN Chạm Chu ghi nhận 34 loài thuộc 4 bộ, 12 họ, 25 giống và VQG Phia Oắc – Phia Đén ghi nhận 39 loài thuộc 4 bộ, 11 họ, 21 giống.

** Đánh giá mối quan hệ thành phần loài giữa các địa điểm nghiên cứu*

Giữa các khu vực nghiên cứu có mức độ tương đồng trên trung bình về thành phần loài ($d_{jk} = 0,52055 - 0,6774$). Trong đó KBTTN Bắc Mê và KBTTN Chạm Chu có mức độ tương đồng lớn nhất ($d_{jk} = 0,67742$) và mức độ tương đồng thấp nhất là giữa KBTTN Chạm Chu và VQG Phia Oắc - Phia đén

Về cơ bản, các khu vực khảo sát vẫn có sự tương đồng về thành phần loài bởi sự tương đồng về địa hình và một số sinh cảnh đặc trưng của vùng núi đá vôi phía Bắc, sự khác biệt về thành phần loài giữa các khu vực này có thể do ảnh hưởng của nỗ lực điều tra, sự đa dạng về hệ sinh thái, tác động con người và lịch sử tiến hóa.

3.1.2 Các các phát hiện mới

Quần thể đồi *Tupaia* sp. Cát Bà (Hải Phòng), Hữu Liên (Lạng Sơn), Bắc Mê (Hà Giang) có khả năng là loài mới.

Quần thể chuột chũi *Euroscaptor* sp. tại KBTTN Chạm Chu có khả năng là một đơn vị phân loại mới.

So sánh với thống kê của Nguyễn Trường Sơn và cộng sự 2011, nghiên cứu này chỉ ghi nhận lại 62/122 loài thú nhỏ (50,81%). So sánh số lượng loài trong từng bộ, số lượng loài ghi nhận lại hầu như đều thấp hơn: bộ nhieu răng (100%), bộ ăn sâu bọ (25%), bộ dơi 52,23%, bộ gặm nhấm (55,26%). Nghiên cứu này đã ghi nhận vùng

phân bố mới của loài Chuột thomas (*Chiromyscus thomasi*), ghi nhận ở KBTTN Chạm Chu.

3.1.3. Các loài có giá trị bảo tồn

Kết quả nghiên cứu chỉ ghi nhận trong phạm vi nghiên cứu 01 loài nguy cấp (EN) là Dơi nếp mũi xinh (*Hipposideros pomona*), 01 loài gần nguy cấp (NT), 01 loài dễ bị tổn thương (VU) là Dơi gập cánh dài (*Miniopterus schreibersii*) theo IUCN là Sóc đen (*Ratufa bicolor*), không có loài có tên trong Nghị định 84/2021/NĐ-CP, Nghị định 64/2019/NĐ-CP, danh lục CITES (2023) và Sách Đỏ Việt Nam (2007).

Nghiên cứu không ghi nhận sự có mặt của loài Chuột núi đào văn tiến Đào Văn Tiến *Tonkinomys daovantieni* hiện đang có phân bố khá hẹp tại Đông Bắc.

3.1.4. Ứng dụng chỉ thị SHPT trong xác định các taxon mới

* Đồi - *Tupaia*

Nhóm cá thể có khả năng là loài mới phân bố tại khu vực Đông Bắc, cụ thể là KBT Thiên nhiên Bắc Mê (Hà Giang), KBT Thiên nhiên Hữu Liên (Lạng Sơn), VQG Cát Bà.

Phân tích sơ bộ hình thái

Các mẫu này có thể được phân biệt với các loài khác trong giống *Tupaia* (*T. be. belangeri*, *T. be. chinensis* và các một số loài *Tupaia* phân bố ở Đông Nam Á) bởi kích thước hộp sọ nhỏ hơn nhưng có vòm cao, răng khá nhỏ tạo khoảng trống rang và kích thước cơ thể nhỏ hơn đáng kể.

Về mối quan hệ di truyền

Ba phân tích riêng biệt cyt *b*, COI và dữ liệu kết hợp (bốn gen CYT B, COI, 12S và 16S) được thực hiện.

Cây quan hệ di truyền với 3 phân tích các đoạn gen khác nhau cho thấy nhóm quần thể tại Đông Bắc Việt Nam tạo thành một nhóm riêng biệt với các nhóm *Tupaia belangeri* và các loài khác trong giống *Tupaia*. Các mẫu được coi là *Tupaia belangeri* tại Việt Nam cần được nghiên cứu lại để xác định những nhánh tiến hóa có tiềm năng là loài phụ, loài mới.

* Chuột chũi – chi *Euroscaptor*

Phân tích sơ bộ hình thái

Bốn mẫu vật bao gồm 3 mẫu thu tại KBTTN Chạm Chu và 1 mẫu tại KBTTN Tây Côn Lĩnh có cùng kích thước cơ thể và hình dạng đuôi giống nhau với hai loài trên trong khi khác nhau về cấu trúc răng và màu xám đen của bộ lông. Một số mẫu vật được thu thập ở Phù Lưu cho thấy có màu cam sẫm đặc biệt ở cổ và cẳng tay. Các mẫu vật thu tại Chạm Chu ở các độ cao khác nhau trái với lý thuyết đưa ra trước đó là các loài chuột chũi có độ cao phân bố khác nhau.

Mối quan hệ di truyền

Cây quan hệ di truyền cho thấy các mẫu chuột chũi thu được tại KBTTN Chạm Chu và KBTTN Tây Côn Lĩnh thuộc giống *Euroscaptor* và giống này tách thành một nhánh tiến hóa riêng biệt so với các loài chuột chũi khác.

3.1.5. Ứng dụng chỉ thị SHPT trong định danh các loài khó phân biệt bằng đặc điểm hình thái

Dựa trên 35 mẫu ADN đã được phân tích của các nhóm loài đồng hình đã giải quyết một số trường hợp liên quan đến nghiên cứu khu hệ bao gồm:

- Xác định tên phân loại những cá thể có đặc điểm hình thái khác biệt với loài (ví dụ: Dúi mốc lớn *Rhizomys pruinosus*).
- Phân biệt những loài đã có đặc điểm nhận dạng tuy nhiên khó phân biệt với các loài đồng hình khác (ví dụ: Dơi nếp mũi ba lá *Aselliscus dongbacanus*).
- Hỗ trợ phát hiện khu vực phân bố của loài (ví dụ: Chuột thomas *Chiromyscus thomasi*).

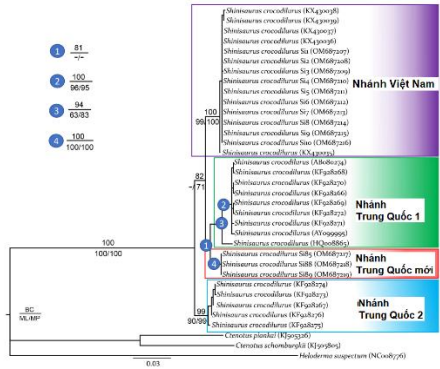
Kết quả nghiên cứu sử dụng chỉ thị sinh học phân tử kết hợp các đặc điểm hình thái ngoài và hình thái hộp sọ cũng đã làm rõ hơn và chỉ ra được các sai khác so với các nghiên cứu trước đó.

3.2. Ứng dụng chỉ thị SHPT trong nghiên cứu di truyền quần thể loài Thằn lằn cá sấu

3.2.1. Quan hệ di truyền giữa quần thể thằn lằn cá sấu Việt Nam và Trung Quốc

Phân tích phân loại học được thực hiện với các mẫu tại các Khu bảo tồn Tây Yên Tử (thuộc hai tỉnh Quảng Ninh và Bắc Giang), Đồng Sơn Kỳ Thượng (Quảng Ninh); huyện Hải Hà, Quảng Ninh và 3 mẫu được phát hiện trong buôn bán tại vườn thú tại CHLB Đức.

Phân tích phát sinh loài cho thấy ít nhất bốn nhóm đơn ngành với một nhóm từ Việt Nam và ba nhóm từ Trung Quốc.

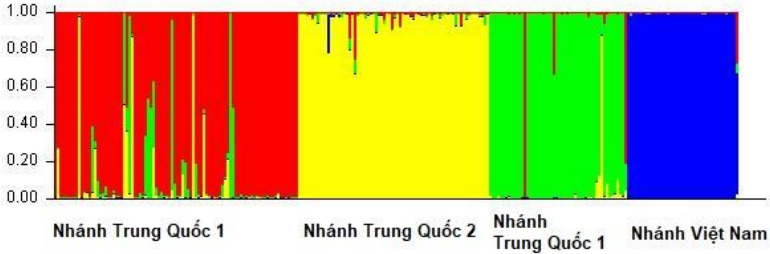


Hình 3.1. Cây quan hệ di truyền nhóm thằn lằn cá sấu

Sự khác biệt di truyền giữa các trình tự lấy từ mẫu Việt Nam và các mẫu có nguồn gốc từ Trung Quốc là khoảng 2,2-3,4

3.2.2. Đánh giá đa dạng di truyền quần thể, nút cổ chai, giao phối cận huyết của quần thể thằn lằn cá sấu tại Việt Nam

Không có sự phân nhóm trong cá thể Việt Nam thu tại Quảng Ninh và Bắc Giang. Kết quả này cũng ủng hộ kết quả của nghiên cứu phát sinh chủng loại trên nhóm gen ty thể.



Hình 3.2. Xác định cấu trúc quần thể thằn lằn cá sấu dựa trên phần mềm STRUCTURE v2.3.4

So sánh với phân tích dựa trên hệ gen của Xie và cộng sự 2022 cũng cho kết quả tương tự đều cho kết quả tương tự. Do đó chỉ thị microsatellite thể hiện ưu điểm rõ ràng hơn do chi phí thực hiện và thời gian thấp và hiệu quả hơn nhiều lần so với phân tích hệ gen.

Bảng 3.1. Kết quả phân tích hiện tượng thắt cổ chai với các quần thể thằn lằn cá sấu

Mô hình đột biến	Kiểm tra đối chứng	Kiểm tra khác biệt chuẩn	Kiểm tra đối chứng Wilcoxon
IAM	P: 0.05738	T2: 1.342 P: 0.08988	GTK: 0.97559 đôi: 0.06445 P2: 0.12891
TPM (70% SMM)	P: 0.45878	T2: -0.065 P: 0.47471*	GTK: 0.84961 đôi: 0.17969 P2: 0.35938
SMM	P: 0.00031	T2: -2.703 P: 0.00344*	GTK: 0.00098 đôi: 1.0 P2: 0.00195

Kết quả phân tích sử dụng phần mềm BOTTLENECK 1.2.02 (Bảng 3.11) không phát hiện thấy hiện tượng thắt cổ chai ($P > 0.05$).

Phân tích thống kê F cho thấy có sự khác biệt giữa các quần thể và có hiện tượng nội phối

3.2.3. Xác định nguồn gốc phân bố mẫu thằn lằn cá sấu trong buôn bán

103/123 mẫu thằn lằn công trong việc khuếch đại đoạn gen ty thể,

Trong đó có 91 mẫu từ Trung Quốc, trong đó có 3 mẫu đến từ nhánh mới. Mười hai mẫu còn lại đến từ Việt Nam

3.3. Ứng dụng chỉ thị sinh học phân tử trong nghiên cứu quần thể Voi châu á tại Vườn quốc gia Yok Đôn

3.3.1. Định danh các cá thể voi nhà và voi hoang dã trong khu vực nghiên cứu

Kết quả BLAST cho thấy các mẫu thu được tương đồng 99.50 – 100% với các trình tự của Voi châu á có trên GenBank và xác nhận rằng DNA thu được từ các mẫu là xác thực và có nguồn gốc từ loài mục tiêu.

3.3.2. Xác định sự hiện diện của voi nhà trong khu vực hoạt động của voi hoang dã

Kết quả phân tích microsatellite cho thấy:

- Không có cá thể voi nuôi nhốt nào hiện diện trong khu vực chuyển vùng của voi hoang dã.

- Có ít nhất 28 cá thể voi rừng trong khu vực nghiên cứu

3.3.3. Đánh giá đa dạng di truyền, giao phối cận huyết trong các quần thể voi nhà, voi tự nhiên tại khu vực VQG Yok Đôn

Kết quả phân nhóm bằng phần mềm STRUCTURE v2.3.4 được tổng hợp bằng phần Structure Harvester cho thấy không có sự phân nhóm trong bộ dữ liệu thu được.

Bảng 3.2. Phân tích phương sai phân tử (AMOVA) với dữ liệu quần thể voi tại Yok Đôn

Mức độ khác biệt	Tổng bình phương	Phương sai	Phần trăm khác biệt
Giữa các quần thể	10,292	0,36581	13,33457
Giữa các cá thể trong các quần thể	88,232	0,37346	13,61327
Bên trong các cá thể	70,500	2,00408	73,05217
Tổng	169,024	2,74335	

Phân tích phương sai phân tử (AMOVA) (Bảng 3.15) cho sự khác biệt không đáng kể giữa các quần thể và các cá nhân trong các quần thể lần lượt là 13,33 và 13,61. Sự khác biệt trong các cá thể khá lớn là 73,05.

Bảng 3.3. Kết quả phân tích dữ liệu kiểu gen với quần thể Voi châu á tại Yok Đôn

Giá trị thống kê F	Trung bình giá trị thống kê F trên toàn bộ các locus	P-value
FIS	0,15708	0,00000
FST	0,13335	0,00196
FIT	0,26948	0,00000

Từ Bảng 3.16 có thể thấy các giá trị thống kê F đều lớn hơn 0 chứng tỏ vẫn tồn tại sự giao phối gần trong quần thể, tuy nhiên chưa quá lớn. Sự khác biệt là có ý nghĩa bởi P-value đều nhỏ hơn 0,05.

3.4. Kiến nghị cho công tác bảo tồn

3.4.1. Các kiến nghị bảo tồn khu hệ thú nhỏ tại khu vực núi đá vôi Đông Bắc

Đánh giá tình trạng bảo tồn

- Cần thực hiện thêm nghiên cứu để xác định hiện trạng các loài thú nhỏ và xác định các loài thú ưu tiên cho bảo tồn và đề xuất bổ sung vào Danh mục IUCN và Sách đỏ Việt Nam.
- Ưu tiên bảo vệ một số loài hiếm hoặc nguy cấp sau Dơi nếp mũi xinh (*Hipposideros pomona*), Chuột núi đá đông bắc (*Tokinomys daovantieni*). Dơi tai nam á (*Myotis chinensis*).

Bảo tồn nguyên vị

- Cần bảo vệ tốt các diện tích rừng tự nhiên hiện có và đảm bảo khả năng phục hồi cho các khoảnh rừng tái sinh:

Các lực lượng kiểm lâm, quản lý rừng cần tăng cường giám sát, tuần tra, đặc biệt chú trọng những khu vực thuộc phân khu bảo vệ nghiêm ngặt.

Hỗ trợ các phương tiện, nâng cao năng lực cho kiểm lâm.

Tăng cường hơn nữa công tác trồng và phục hồi rừng.

Cần thay đổi phương thức canh tác.

Cần kiểm soát săn bắt

Tuyên truyền nâng cao nhận thức cho người dân về hiểu biết pháp luật, chính sách của nhà nước, các giá trị lâu dài của rừng

Bảo tồn chuyển vị

Nghiên cứu các đặc điểm sinh thái học, mô hình nhân nuôi sinh sản phục vụ bảo tồn với các loài có khả năng suy giảm mạnh như Dơi tai nam á, Chuột núi đá đông bắc.

Cần tách biệt các loài trong các nhóm quần thể có vị trí phân loại khác nhau trên cây phát sinh trong luận án như nhóm *Tupaia*, *Euroscaptor*. Phân tích định loại bằng phương pháp sinh học phân tử cần được thực hiện trước khi phân nhóm để gây nuôi sinh sản bởi chỉ sử dụng hình thái ngoài khó phân biệt giữa các nhóm thú nhỏ này.

3.4.2. Các kiến nghị bảo tồn quần thể thằn lằn cá sấu tại Việt Nam

Kiến nghị nâng hạng bảo tồn

-Nâng cấp tình trạng bảo tồn của loài này lên mức Cực kỳ nguy cấp (CR) và đặc biệt là với quần thể Việt Nam bởi sự khác biệt lớn so với quần thể Trung Quốc.

Bảo tồn nguyên vị

Các mẫu thằn lằn cá sấu tại các vườn thú châu Âu đã được xác định nguồn gốc và sẽ là nguồn tái thả quan trọng cho các khu vực phân bố ngoài tự nhiên khi điều kiện cho phép.

Do có sự đa dạng di truyền thấp và giảm số lượng đột ngột tại Việt Nam, cần có những biện pháp tăng cường tuần tra nhằm phát hiện các vi phạm tại vùng phân bố quan trọng của loài. Ngoài ra, mất và suy giảm sinh cảnh sống cũng cần được quan tâm và giảm thiểu.

Bảo tồn chuyển vị

Do giữa quần thể Việt Nam và Trung Quốc có sự khác biệt về mặt di truyền nên quá trình nuôi nhốt hay các chương trình nhân nuôi sinh sản cần tách biệt các nhóm cá thể của từng nhánh trong cây quan hệ di truyền để tránh lai tạo giữa các nhóm cá thể.

Thông tin nguồn gốc phân bố của các cá thể nuôi nhốt tại các vườn thú châu Âu là nguồn hữu ích để xây dựng kế hoạch nuôi tại đây.

3.4.3. Kiến nghị bảo quần thể voi châu á tại Yok Đôn

Bảo tồn nguyên vị

Nguyên nhân của hiện tượng voi về VQG Yok Đôn có thể do sự mất dần các sinh cảnh cung cấp thức ăn trên đường di chuyển của đàn voi khiến chúng phải mở rộng hướng di chuyển sang các khu vực khác. Hướng di chuyển mới của đàn voi cần được đề có phương án bảo tồn kịp thời tránh các xung đột giữa voi và con người. Các biện pháp duy trì sinh cảnh sống của loài trong khu vực vườn quốc gia là cần thiết, đặc biệt là quan tâm đến thức ăn vào mùa khô.

Bảo tồn chuyển vị

Nghiên cứu xác định các cá thể voi nhà quanh khu vực Vườn quốc gia Yok Đôn là Voi châu á và có sự giao phối cận huyết do đa dạng di truyền thấp trong nhóm voi nhà. Cần xây dựng kế hoạch vận động, chương trình tái thả cho các cá thể voi nuôi nhốt. Bên cạnh đó, cần xây dựng kế hoạch di chuyển các quần thể voi nhỏ chỉ còn một vài cá thể sang quần thể voi lớn hơn để tăng đa dạng di truyền và tránh sự tuyệt chủng của các quần thể voi nhỏ.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. Việc áp dụng các thử nghiệm sinh học phân tử trong nghiên cứu đã đưa ra các kết quả như sau:

- Đối với khu hệ thú nhỏ vùng núi Đông Bắc:

+ Lập được danh mục cập nhật các loài thú nhỏ vùng Đông Bắc, trong đó ghi nhận 64 loài ở các khu vực nghiên cứu, phát hiện phân bố mới của 01 loài.

+ Xác nhận 2 taxon mới khác biệt với các loài hiện có tại Việt Nam và trên thế giới.

+ Hỗ trợ định loại chính xác 15 loài đồng hình.

- Đối với quần thể Thằn lằn cá sấu tại Việt Nam:

+ Xác định sự tách biệt về mặt di truyền giữa hai nhóm Việt Nam và Trung Quốc.

+ Phát hiện ra một nhánh di truyền chưa rõ khu vực phân bố có quan hệ gần gũi với nhóm cá thể Trung Quốc.

+ Kết quả nghiên cứu phản ánh mức độ đa dạng di truyền thấp, có hiện tượng giao phối cận huyết và hiện tượng nút cổ chai đối với nhóm quần thể tại Việt Nam.

+ Nghiên cứu cũng hỗ trợ xác định nguồn gốc của các cá thể nuôi nhốt tại CHLB Đức phục vụ công tác bảo tồn chuyển vị.

- Đối với quần thể Voi châu á tại VQG Yok Đôn:

+ Đã định danh các cá thể voi nhà trong khu vực VQG đều là Voi châu á (*Elephas maximus*).

+ Nghiên cứu xác định không có cá thể voi nhà vào khu vực hoạt động của voi tự nhiên trong thời gian nghiên cứu.

+ Nghiên cứu xác định có ít nhất 28 cá thể voi tự nhiên trong khu vực VQG Yok Đôn.

+ Trong nhóm các cá thể voi nhà, có khả năng giao phối cận huyết do đa dạng di truyền thấp. Do đó, đây cũng là một nguồn tái thả phù hợp cho các dự án bảo tồn voi tại khu vực.

2. Dựa trên kết quả ứng dụng chỉ thị sinh học phân tử luận án đã đưa ra kiến nghị bảo tồn.

- Đối với khu hệ thú nhỏ vùng núi Đông Bắc:

+ Cần đánh giá hiện trạng bảo tồn các nhóm loài thú nhỏ; ưu tiên nghiên cứu vào bảo vệ một số loài như Dơi nếp mũi xinh (*Hipposideros gentilis*), Chuột núi đá đông bắc (*Tokinomys daovantieni*), Dơi tai nam á (*Myotis chinensis*).

+ Cần bảo vệ sinh cảnh sống tự nhiên của các loài thú nhỏ. Đối với các loài nguy cấp cần nghiên cứu các phương pháp nhân nuôi để kịp thời thực hiện.

+ Cần tiếp tục nghiên cứu để làm rõ vị trí phân loại của hai nhóm *Tupaia* sp. và *Euroscaptor* sp.

- Quần thể Thần lằn cá sấu tại Việt Nam:

+ Nghiên cứu đã đề nghị nâng hạng bảo tồn với quần thể Thần lằn cá sấu.

+ Đề xuất bảo vệ sinh cảnh và liên kết các khu vực phân bố loài để giảm thiểu giao phối cận huyết trong những nhóm cá thể nhỏ.

+ Khuyến cáo nuôi riêng biệt các cá thể sau khi xác định nguồn gốc.

- Quần thể Voi châu á tại VQG Yok Đôn:

+ Đề xuất xác định hướng di chuyển của đàn voi vào mùa khô để có các biện pháp tăng cường bảo vệ các điểm thức ăn và hạn chế xung đột với người dân.

+ Nghiên cứu kiến nghị nên có các chương trình vận động tái thả đàn voi tự nhiên vào môi trường tự nhiên nhằm tăng đa dạng di truyền trong quần thể.

Kiến nghị

Ưu tiên sử dụng chỉ thị sinh học phân tử trong nghiên cứu và bảo tồn:

(1) Hỗ trợ định danh và xác định vị trí phân loại của các nhóm quần thể nguy cấp quý hiếm để ưu tiên bảo tồn.

(2) Mở rộng nghiên cứu quần thể để đánh giá chính xác mức độ đa dạng di truyền ở mức quần thể, tỷ lệ giới tính, giao phối cận huyết, nút cổ chai

(3) Tiến hành các nghiên cứu về ADN môi trường, thu mẫu gián tiếp để xác định vùng phân bố và đa dạng di truyền trong các nhóm khó bắt gặp, thu mẫu trực tiếp

(4) Nghiên cứu hệ gen các loài động vật hoang dã để làm cơ sở dữ liệu cho các nghiên cứu bảo tồn trong tương lai

**DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC LIÊN QUAN ĐẾN
LUẬN ÁN**

1. **Nguyen, T.T.**, N.T. Ly, T.D. Vu, T.H. Bui, D.D. Nguyen, A.V. Abramov, S.V. Kruskop, D.M. Le, & T.S. Nguyen "The first studies of small mammals of the Cham Chu and Bac Me Nature Reserves, north-eastern Vietnam", *Russian Journal of Theriology* 19(2), pp. 193-209.
2. Ngo, H.T., **T.T. Nguyen**, M.D. Le, M. van Schingen, Q. Nguyen, A. Rauhaus, M. Vences, & T. Ziegler (2020), "Genetic screening of captive crocodile lizards (*Shinisaurus crocodilurus*) in Europe", *Der Zoologische Garten*. 88, pp. 17-30.
3. **Nguyen, T.T.**, H.T. Ngo, Q.Q. Ha, T.Q. Nguyen, T.Q. Le, S.H. Nguyen, T. Ziegler, M. van Schingen-Khan, & M.D. Le (2022), "Molecular phylogenetic analyses and ecological niche modeling provide new insights into threats to the endangered Crocodile Lizard (*Shinisaurus crocodilurus*)", *Frontiers of Biogeography*. 14(1).