

Sự tuyệt chủng của loài Tê giác Java (*Rhinoceros sondaicus*) ở Việt Nam

Báo cáo 2011 của WWF

Tác giả

Sarah Brook, WWF-Việt Nam

Peter Van Coeverden de Groot, Đại học Queen, Canada

Simon Mahood, WWF-Việt Nam

Barney Long, WWF-US

Nhóm tác giả, biên tập viên và WWF không chịu trách nhiệm về bất cứ sự thiếu chính xác nào trong bản dịch báo cáo sang các ngôn ngữ khác.

Từ viết tắt

AsRSG	Nhóm chuyên gia tê giác Châu Á (Asian Rhino Specialist Group)
CEPF	Quỹ Đối tác Hệ Sinh thái Trọng điểm (Critical Ecosystem Partnership Fund)
CITES	Công ước về Buôn bán Quốc tế các loài Nguy cấp (Convention on International Trade in Endangered Species)
CTNP	Vườn Quốc gia Cát Tiên (Cat Tien National Park)
CTNPCP	Dự án Bảo tồn Vườn Quốc gia Cát Tiên (WWF) (Cat Tien National Park Conservation Project (WWF))
DNA	ADN, Axit đê-oxi-ri-bô-nu-clê-ic
ETOH	Ê-ta-nol
EDTA	Axit Eetylen-đi-amin-têtra axê tic
FPD	Chi cục Kiểm lâm
GCR	Giảm phức tạp hệ gen
GPS	Hệ thống Định vị Toàn cầu
IRF	Quỹ Bảo tồn Tê giác Quốc tế
IUCN	Hiệp hội Quốc tế về Bảo tồn Thiên nhiên
MIKE	Giám sát việc săn bắn voi bất hợp pháp (Monitoring the Illegal Killing of Elephants)
MIST	Hệ thống Quản lý Thông tin

PCOA	Phân tích tọa độ chính
PCR	Phản ứng dây chuyền pôly-mê aza
RNA	Axít Ri-bô-nuclêic
RPM	Số vòng quay trên phút
UK	Vương Quốc Anh
USA	Hiệp Chúng quốc Hoa Kỳ
USFWS	Cục Cá và Động vật Hoang dã Hoa Kỳ
ZSL	Hiệp hội Động vật London
VQG	Vườn Quốc gia

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả chân thành cảm ơn các tổ chức sau đây đã tài trợ cho công tác khảo sát và tuân tra liên quan đến bảo tồn Tê giác Java: Quỹ Đối tác các Hệ Sinh thái Trọng điểm và tổ chức BirdLife Đông Dương, Cục Cá và Động vật Hoang dã Hoa Kỳ, Tổ chức Hermsen, WWF Quốc tế, WWF-Áo, WWF-Pháp, WWF-Hoa Kỳ, WWF-Hà Lan và dự án Tê giác Châu Á.

Chúng tôi chân thành cảm ơn các đối tác: Đại học Queen của Ca-na-đa, Viện Động Vật, Hiệp hội Động vật London và Hiệp hội Tê giác Quốc tế đã tiến hành phân tích các mẫu phân thu được trong các khảo sát. Chúng tôi xin đánh giá cao kiến thức chuyên môn của tổ chức Packleader LLC.

Cảm ơn Vườn Quốc gia Cát Tiên đã hỗ trợ chúng tôi trong thời gian tiến hành khảo sát và khám nghiệm; đặc biệt là ông Bạch Thanh Hải, Phó trưởng Phòng Kỹ thuật của Vườn. Nhóm tác giả cũng chân thành cảm ơn ông Nick Cox, ông Stuart Chapman, ông Văn Ngọc Thịnh, bà Trần Minh Hiền và ông Christy Williams về những đóng góp biên tập cho báo cáo này.

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN.....	4
TÓM TẮT BÁO CÁO.....	7
1. GIỚI THIỆU.....	8
1.1 Tên giác Javan	8
1.2 Sự tham gia của WWF	9
1.3 Các khảo sát về Tên giác Java và thực trạng quần thể ở Việt Nam.....	9
1.4 Mục tiêu dài hạn và ngắn hạn.....	12
2. PHƯƠNG PHÁP.....	12
2.1 Khu vực nghiên cứu.....	12
2.2 Chó nghiệp vụ.....	15
2.3 Phương pháp khảo sát.....	15
2.4 Quy trình lấy mẫu phân.....	16
2.5 Phân tích gen.....	17
2.6 Xác định giới tính bằng gen.....	19
2.7 Kiểm định đa dạng vi khuẩn.....	21
3. KẾT QUẢ.....	21
3.1 Các kết quả khảo sát.....	21
3.2 Xác định kiểu gen.....	28
3.3 Phân tích gen để xác định giới tính.....	31
3.4 Kiểm nghiệm đa dạng vi khuẩn.....	31
4. THẢO LUẬN.....	33
4.1 Sản bắn.....	35
4.2 Mất sinh cảnh.....	36
4.3 Một vấn đề chung đối với khu bảo tồn	37
4.4 Vai trò của WWF và các tổ chức bảo tồn khác ở Vườn Quốc gia Cát Tiên.....	39
5. KẾT LUẬN.....	40
6. TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	42

Phụ lục 1. Tên ổ gen, dạng lặp lại khuếch đại, môi xuôi và môi ngược, nhiệt độ nguội [Tm].....	46
Phụ lục 2. Hai chu kỳ PCR để khuếch đại DNA vi vệ tinh từ mẫu phân của Tê giác Java sử dụng máy Biomtera T-Gradient.....	46
Phụ lục 3. Các thành phần của một PCR điển hình được dùng trong nghiên cứu này:	47
Phụ lục 4. Ảnh khảo sát Tê giác Java.....	48
Phụ lục 5. Ảnh về các nguy cơ đối với Cát Lộc và quần thể Tê giác Java.....	50
Phụ lục 6. Các bản đồ tuần tra ở Cát Lộc do Kiểm lâm, Vườn Quốc gia Cát Tiên thực hiện.....	52

TÓM TẮT BÁO CÁO

Tê giác Java đã bị tuyệt chủng tại Việt Nam; cá thể cuối cùng đã bị săn bắn để lấy sừng vào cuối năm 2009, xác chết được tìm thấy vào năm 2010. Vì vậy, có thể kết luận phân loài *annamiticus* đã bị tuyệt chủng. Sự kiện này dẫn đến việc loài Tê giác Java chỉ còn lại một quần thể nhỏ ở Java, In-đô-nê-xi-a.

Hai mươi mẫu phân Tê giác đã được Vườn Quốc gia Cát Tiên và WWF thu thập trong thời gian từ năm 2003 đến năm 2006 và gửi sang Đại học Queen vào tháng Tư năm 2010 để phân tích. Thông tin về đa dạng vi khuẩn trong các mẫu phân cho thấy có ít nhất hai cá thể Tê giác đã tồn tại trong quần thể Tê giác vào giai đoạn này tại Vườn Quốc gia Cát Tiên.

WWF và Vườn Quốc gia Cát Tiên đã tiến hành một cuộc khảo sát toàn diện về quần thể Tê giác Java từ tháng 10/2009 đến tháng 4/2010, nhằm xác định hiện trạng của quần thể thông qua phân tích gen trong các mẫu phân thu thập được. Chó nghiệp vụ phát hiện mẫu phân Tê giác đã được sử dụng trong thời gian khảo sát để tăng khả năng phát hiện phân Tê giác. Nhóm khảo sát đã tiến hành 3 đợt tìm kiếm kỹ càng trên diện tích 6.500 ha là khu vực lõi phân bố Tê giác, sau đó mở rộng khảo sát thêm trên diện tích khoảng 3.500 ha, nơi không phát hiện thấy dấu hiệu nào của Tê giác kể từ năm 1993, nhằm đảm bảo rằng không một cá thể nào bị bỏ sót.

Nhóm khảo sát đã thu được hai mươi hai mẫu phân trong vùng lõi phân bố Tê giác Java giữa tháng 10/2009 và tháng 2/2010 và đã được gửi đến Đại học Queen, Ca-na-đa để tiến hành phân tích gen. Trong thời gian khảo sát, không có bất cứ dấu hiệu nào của Tê giác ở khu vực ngoài vùng lõi phân bố Tê giác. Từ ngày 5 tháng Hai đến giữa tháng Tư, nhóm khảo sát đã không tìm thấy một dấu chân hay mẫu phân nào của Tê giác ở Cát Lộc nữa.

Vào ngày 29 tháng Tư năm 2010, xác một cá thể Tê giác Java đã được phát hiện ở Cát Lộc; các mẫu da và răng đã được lấy từ xác chết và gửi sang Đại học Queen để tiến hành phân tích gen. Phân tích gen đã khẳng định rằng các mẫu phân thu được trong giai đoạn 2009 - 2010 thuộc về một cá thể, cũng chính là cá thể chết vào tháng 4/ 2010. Phân tích giới tính của gen cho thấy đây là một cá thể Tê giác cái. Phân tích thông tin đa dạng vi khuẩn của mẫu phân nhằm phân biệt các cá thể khác nhau, cũng khẳng định lại kết quả phân tích gen: chỉ có một cá thể tồn tại trong giai đoạn 2009-2010, và đây cũng là một trong hai cá thể đã tồn tại trong giai đoạn từ năm 2003 đến năm 2006.

Với diện tích khảo sát phân bố rộng, cùng với các quan sát thực địa, phân tích gen và phân tích thông tin đa dạng vi khuẩn mẫu phân, chúng ta có thể khẳng định quần thể Tê giác ở Việt

Nam, phân loài *annamiticus* Tê giác Java đã bị tuyệt chủng. Vì vậy, quần thể Tê giác Java chỉ còn lại ở Java, In-đô-nê-xi-a.

Săn bắt được xác định là nguyên nhân của sự tuyệt chủng của phân loài này; cá thể cuối cùng đã bị bắn vào chân, đây có thể là nguyên nhân dẫn đến cái chết của cá thể này, và sừng của Tê giác đã bị lấy đi (Streicher và cộng sự 2010). Việc mất sinh cảnh sống do chuyển đổi đất sang canh tác nông nghiệp đã được nhận định là một nguyên nhân đằng sau sự tuyệt chủng của quần thể Tê giác này. Sinh cảnh của loài này ở Việt Nam đã giảm từ 75.000 ha khi loài này được phát hiện lại vào năm 1988, xuống còn 30.000 ha ở thời điểm hiện tại. Hơn nữa, quần thể chỉ giới hạn trong sinh cảnh thực tế là 6.500 ha do sự xuất hiện của các tuyến đường đất dành cho xe mô tô nối liền các khu dân cư trong vườn làm hạn chế sự tiếp cận của khu vực này với các vùng khác của Cát Lộc. Sự lấn chiếm đất cho canh tác nông nghiệp trong khu vực lõi phân bố Tê giác cũng góp phần vào việc này.

Các vấn đề về săn bắt và mất sinh cảnh không chỉ là vấn đề của riêng Vườn Quốc gia Cát Tiên mà là vấn đề chung của Việt Nam, do tính thiếu hiệu quả trong công tác bảo vệ và thực thi pháp luật và việc quản lý khu bảo tồn. Hậu quả là nhiều sinh vật ở Việt Nam đứng trước nguy cơ tuyệt chủng bởi nạn săn bắt hợp pháp và mất sinh cảnh sống. Cần có những cải thiện mạnh mẽ về mặt thực thi pháp luật và quản lý khu bảo tồn tại Việt Nam, cũng như cách thức các tổ chức bảo tồn hợp tác với các khu bảo tồn, nhằm đảm bảo các loài khác không cùng chung số phận với loài Tê giác Java.

1. GIỚI THIỆU

1.1 Tê giác Java

Loài tê giác Java *Rhinoceros sondaicus* là loài cực kỳ nguy cấp (van Strien và cộng sự 2008), cho tới gần đây còn hai quần thể riêng biệt tồn tại ở In-đô-nê-xi-a và Việt Nam, đại diện cho hai trong số ba phân loài (Fernando và cộng sự 2006, van Strien và cộng sự 2008). *R. sondaicus inermis* Lesson 1838 trước đây có ở Đông Bắc Ấn Độ, Băng-la-đét và My-an-mar; phân loài này bị tuyệt chủng vào đầu những năm 1900. *R. sondaicus sondaicus* Desmarest 1922 trước đây có ở Thái Lan, Ma-lay-si-a, Java và Sumatra nhưng chỉ với khoảng 40-60 cá thể còn tồn tại, trong khu vực rộng 123.051 ha tại VQG Ujung Kulon, In-đô-nê-xi-a (van Strien và cộng sự 2008). *R. sondaicus annamiticus* Heude 1892 trước đây có ở Lào, Cam-pu-chia, Đông Thái Lan và Việt Nam. *R. sondaicus annamiticus* đã được người phương Tây cho là tuyệt chủng sau chiến tranh Việt Nam mãi cho đến năm 1988, khi nhận được báo cáo về một cá thể Tê giác bị săn bắt ở phía Nam Việt Nam (Santiapillai và cộng sự 1993).

Một khảo sát được tiến hành tại khu vực miền Nam Việt Nam vào năm 1989 xác định rằng có những cá thể Tê giác tồn tại trong một khu vực rộng khoảng 75.000 ha, đó là khu Cát Lộc, nằm ngay ở phía Bắc của VQG Cát Tiên hiện tại (Schaller và cộng sự 1990) (Hình 1). Khu Cát Lộc (diện tích 30.435ha) sau đó trở thành khu vực được bảo vệ vào năm 1992 và sau đó được sáp nhập vào VQG Cát Tiên năm 1998.

1.2 Sự tham gia của WWF

WWF hỗ trợ VQG Cát Tiên nâng cao khả năng quản lý Vườn và đặc biệt là bảo tồn loài Tê giác Java, từ giữa những năm 1990. Dự án qui mô lớn về Bảo tồn tại VQG Cát Tiên, được chính phủ Hà Lan tài trợ, được thực hiện bởi WWF và VQG Cát Tiên từ năm 1998 đến năm 2004, có các mục tiêu chính sau đây: i) Bảo vệ VQG Cát Tiên một cách có hiệu quả; ii) Tác động của con người được giảm thiểu tới mức độ bền vững; iii) Chiến lược cấp độ cảnh quan để phục vụ quản lý VQG Cát Tiên; iv) Khung thể chế hiệu quả và hỗ trợ quản lý hành chính. Từ năm 2005 đến năm 2007, WWF tiếp tục hỗ trợ ở qui mô nhỏ cho công tác bảo vệ và quan

trắc quần thể Tê giác. Vào năm 2009, ngân sách đã được vận động để hỗ trợ công tác tuần tra thực thi pháp luật ở Cát Lộc và tiến hành một khảo sát toàn diện về thực trạng quần thể Tê giác, được thực hiện trong giai đoạn 2009-2010.

1.3 Các khảo sát về Tê giác Java và thực trạng quần thể ở Việt Nam

Tê giác Java đã có thời khá phổ biến trên toàn bộ khu vực địa hình thấp ở Việt Nam và số lượng cá thể tương đối cao trong cuộc kháng chiến chống Pháp (1859-1956). Trước đó, việc săn bắn Tê giác diễn ra phổ biến đối với người dân địa phương và đối với cả người Pháp thời gian sau này. Súng đạn được phổ biến trong và sau thời gian kháng chiến chống Pháp (1946-1954) và chống Mỹ (1955-1975) làm cho việc săn bắn Tê giác trở nên dễ dàng hơn, khiến cho quần thể Tê giác Java bị suy giảm nhanh chóng. Báo cáo không chính thức của Polet và cộng sự (1999) cho biết ít nhất 39 cá thể Tê giác Java bị giết hại tại VQG Cát Tiên từ trước năm 1957 đến năm 1991. Người phương Tây đã cho rằng phân loài Tê giác Java tại Việt Nam đã bị tuyệt chủng do bị săn bắn và mất sinh cảnh bởi việc rải chất độc hóa học trong chiến tranh, cho đến tận năm 1988 mới có thông tin về một cá thể Tê giác bị săn bắt ở khu vực Cát Lộc (Polet và cộng sự 1999).

Mặc dù một số cuộc khảo sát đã được tiến hành sau sự kiện phát hiện trở lại của phân loài Tê giác ở Việt Nam, nhưng vẫn không thu thập được thông tin đáng tin cậy nào về ước lượng quần thể. Vào năm 1989, các nhà nghiên cứu ước tính có tối đa 10-15 cá thể Tê giác sinh sống tại khu vực VQG Cát Tiên (dưới 75.000 ha), trên cơ sở quan sát thực địa về dấu chân và thông qua phỏng vấn người dân và các ban ngành trong các cộng đồng địa phương (Schaller và cộng sự 1990). Đây là cuộc khảo sát cuối cùng về Tê giác Java ở phía Nam của VQG Cát Tiên (được nhìn thấy lần cuối cùng vào năm 1988) và ở tỉnh Bình Phước (Sông Bé) (Hình 1). Qua các cuộc khảo sát, các dấu hiệu Tê giác chỉ được tìm thấy trong khu vực Cát Lộc. Không thấy có dấu hiệu của Tê giác trong đất lâm trường phía Bắc và Nam Cát Lộc trong vòng ít nhất là 20 năm (Nguyễn Xuân Đăng và Osborn 2004; Nguyễn Xuân Đăng và cộng sự 2004).

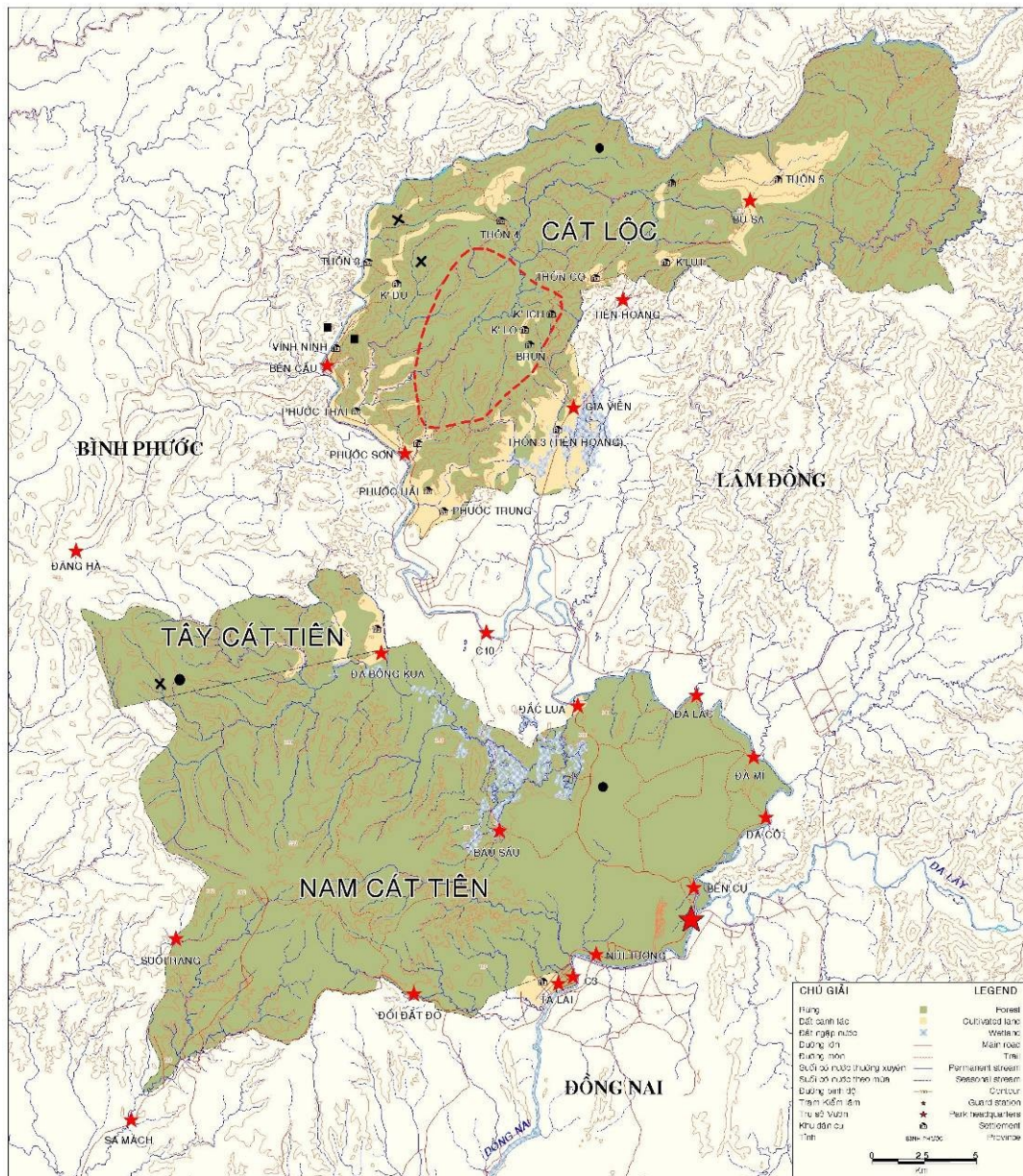
Vào năm 1993 (trên cơ sở của một khảo sát được thực hiện năm 1991), Santiapillai và cộng sự ước tính có ít nhất 8 cá thể Tê giác, hoặc từ 8 đến 12 cá thể tồn tại ở Cát Lộc, dựa trên quan sát về các dấu đường đi và các dấu hiệu không chính thống được người đồng bào thiểu số ở Cát Lộc cung cấp. Các dấu hiệu đã được tìm thấy tại phía Đông Bắc của Cát Lộc và khu vực phân bố của Tê giác Java được ước tính là 35.000 ha (toàn bộ Cát Lộc).

Đến năm 1999, các cuộc khảo sát thực địa và phân tích 111 dấu vết (dấu chân đúc thạch cao) được WWF và VQG Cát Tiên tiến hành, đưa đến kết luận cho rằng có ít nhất là 07 và nhiều nhất là 08 cá thể Tê giác ở Cát Lộc, sinh sống trên 6.500 ha diện tích lõi phân bố Tê giác (Polet và cộng sự 1999). Khu vực phân bố quần thể Tê giác đã bị thu hẹp lại còn 28.500 ha trong vòng 6 năm mặc dù Cát Lộc vẫn có diện tích khoảng 27.850 ha. Tốc độ phát triển dân số nhanh và sự phát triển kinh tế-xã hội đã dẫn đến tình trạng lấn chiếm đất đai vào khu vực quản lý của VQG Cát Tiên; nhiều khu vực sinh cảnh tốt nhất cho động vật hoang dã như các vùng phù sa bằng phẳng dọc theo triền sông và đầm lầy đã bị chuyển đổi sang ruộng lúa, và những cánh rừng lá rộng còn lại cũng đã bị chuyển sang trồng điều.

Khu vực dân cư rộng lớn ở Đông Bắc Cát Lộc (Thôn 5) và con đường mới được xây dựng nối khu vực này với bên ngoài Vườn rõ ràng đã chia cắt phần phía Đông và phía Tây của Cát Lộc (Hình 2). Không phát hiện thấy Tê giác ở phía Đông Bắc Cát Lộc kể từ năm 1993 (đây là phần phía Đông của một xã nằm bên trong VQG).

Việc tiếp cận với nguồn nước vào mùa khô rõ ràng là bị giới hạn; Tê giác thường đi qua sông Đồng Nai vào tỉnh Sông Bé (hiện nay là tỉnh Bình Phước), đánh dấu phần biên giới phía Bắc của Cát Lộc. Tuy nhiên, phần lớn diện tích rừng tại khu vực ven sông ở Bình Phước đã chuyển thành đất nông nghiệp, và một dải đất thổ cư về phía bên kia sông thuộc tỉnh Lâm Đồng, gần biên giới Cát Lộc đã giới hạn khả năng tiếp cận đến sông dọc theo đường biên của

phần lớn vùng lõi phân bố Tê giác. Hơn nữa, sự phát triển các tuyến đường đất cho xe máy nối liền giữa các khu dân cư trong và ngoài Cát Lộc đã cắt đứt sự tiếp cận của Tê giác với phía Đông của Cát Lộc, giới hạn quần thể Tê giác chủ yếu trong diện tích lõi 6.500 ha (Polet và cộng sự 1999).



Hình 1. Sự xuất hiện của Tê giác trong và xung quanh VQG Cát Tiên từ những năm 1980, trích từ Schaller và cộng sự (1989). Tê giác bị giết hại (dấu chữ thập đen), Tê giác được nhìn thấy (vòng tròn đen), dấu vết Tê giác (ô vuông đen). Tất cả các thông tin về Tê giác từ sau năm 1993 đều quan sát được trong khu vực lõi Tê giác (đường nét đứt màu đỏ).

Các khảo sát về sau cho thấy số lượng Tê giác liên tục giảm, với số lượng ước tính từ 5-8 cá thể vào năm 2004 (Polet và Ling 2004); và dưới 5 cá thể vào năm 2006 (Fernando và cộng sự 2006), và tất cả đều được phát hiện trong khu vực lõi phân bố Tê giác. Phân tích ADN do đại học Colombia tiến hành năm 2004 trên các mẫu phân được VQG Cát Tiên và WWF thu được trong giai đoạn 2001- 2002, kết luận rằng có từ 5 đến 6 con Tê giác ở cả hai giới đực và cái (Vương Duy Lập và đồng sự 2004). Tuy nhiên, tính chính xác của các báo cáo trên còn gây

nhiều tranh cãi. Vì các báo cáo trên được thực hiện không dựa trên các phương pháp chuẩn xác về ước tính số lượng quần thể trên cơ sở phân tích dấu chân, và phải sử dụng đến môi của Tê giác Ấn Độ (*Rhinoceros unicornis*) để phân tích ADN, nên kết quả có phần không chắc chắn.

Môi cho Tê giác Java đã được Đại học Queen, Ca-na-đa phát triển trong năm 2009. Tiếp theo, WWF (với sự tài trợ từ WWF, USFWS, CEPF và tổ chức Hermsen Foundation) đã tiến hành một khảo sát thực địa toàn diện đối với quần thể Tê giác Java ở Việt Nam, nhằm xác định một cách chính xác hiện trạng của quần thể. Khảo sát đã tiến hành thu mẫu phân để phân tích gen nhằm xác định số lượng cá thể và giới tính của các cá thể Tê giác. Chó nghiệp vụ đã được sử dụng để cải thiện khả năng phát hiện mẫu phân Tê giác. Sử dụng chó nghiệp vụ là một phương pháp hiệu quả để phát hiện phân của loài muốn khảo sát (Smith và cộng sự 2003) và đã được chứng minh là hiệu quả gấp bốn lần so với các phương pháp khảo sát khác (Rolland và cộng sự 2006).

1.4 Mục tiêu dài hạn và ngắn hạn

Mặc dù các nhu cầu bảo tồn trước mắt đối với loài Tê giác Java ở Việt Nam là khá rõ ràng: bảo vệ loài Tê giác Java và sinh cảnh của chúng (AsRSG 2000), thông tin chính xác về hiện trạng quần thể của loài là một thông tin cấp thiết tối quan trọng, nhằm mục đích: i) xác định xem việc đầu tư cho VQG Cát Tiên để bảo tồn loài Tê giác Java đã phù hợp chưa (loài này đã được WWF xác định vẫn tồn tại các cá thể thuộc cả hai giới đực và cái trong quần thể); ii) cung cấp thông tin cần thiết tạo động lực cho chính phủ Việt Nam có những nỗ lực trong vấn đề thực hiện các biện pháp nghiêm ngặt thực thi pháp luật và các hoạt động bảo tồn.

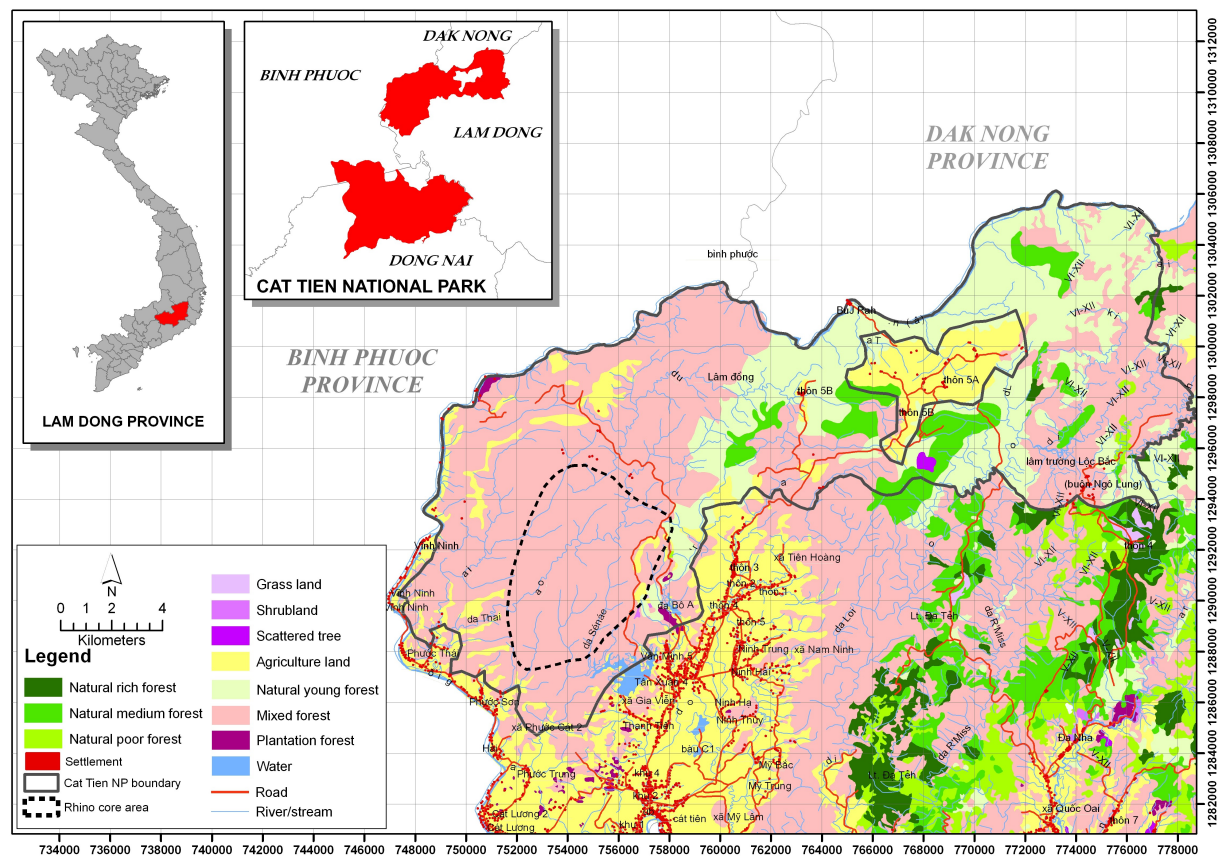
Một thời gian ngắn sau khi đợt khảo sát này hoàn thành, xác chết của một cá thể Tê giác đã được phát hiện tại VQG Cát Tiên vào ngày 29 tháng Tư năm 2010.

2. PHƯƠNG PHÁP

2.1 Khu vực nghiên cứu

Cát Lộc, một phần của VQG Cát Tiên thuộc tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam được coi là nơi cuối cùng của đất liền Châu Á có sự hiện diện của loài Tê giác Java. Cát Lộc trước đây là rừng nửa rụng lá đất thấp nhiệt đới, nay đã chuyển thành rừng hỗn giao giữa tre nửa và các cây nửa rụng lá theo mùa, với những sườn đồi tre nửa chiếm ưu thế, do kết quả của việc sử dụng chất hóa học gây rụng lá trong chiến tranh. Các khu vực còn rừng nửa rụng lá theo mùa phân bố trên các đồng cao với các cây ưu thế thuộc họ Dipterocarpaceae hay các loài *Lagerstroemia* spp. Khu vực lõi phân bố Tê giác bao gồm nhiều đồi nhỏ với độ dốc lớn, với cao độ địa hình từ 300m đến 600m, và nhiều suối chảy qua trong khu vực, trước khi chảy ra sông Đồng Nai. Thành phần đất là phù sa sét nặng, tạo thành các khu vực bùn và đầm lầy (Polet và đồng sự 1999).

Diện tích 6.500 ha được biết đến là “khu vực lõi phân bố của Tê giác Java” là nơi được tập trung khảo sát, nơi các dấu hiệu của Tê giác được liên tục tìm thấy cho đến năm 2010. Ngoài ra, cuộc khảo sát cũng được mở rộng trên diện tích 3.500ha là nơi thỉnh thoảng tìm thấy dấu hiệu của Tê giác kể từ năm 1993 (Polet và đồng sự 1999). Khu vực lõi và khu vực mở rộng đã bị chia cắt bởi một tuyến đường đất chạy theo hướng Nam - Tây Bắc. Xe máy di chuyển thường xuyên giữa các khu vực dân cư và việc trồng cây điều trong khu vực VQG đã tạo ra sự xáo trộn và cản trở sự di chuyển của Tê giác trong khu vực Cát Lộc (Hình 2). Phần còn lại của Cát Lộc không được khảo sát vì tại vùng này không tìm thấy bất cứ dấu hiệu nào của Tê giác trong ít nhất hai mươi năm qua (Khảo sát của Santiapillai 1991)



Hình 2. Vị trí của VQG Cát Tiên; Nam Cát Tiên và Cát Lộc, và sinh cảnh & sử dụng đất tại Cát Lộc. Phần màu hồng (rừng hỗn giao) trong giới hạn của VQG về phía Đông là gần như là giới hạn của khu vực khảo sát.

2.2 Chó nghiệp vụ

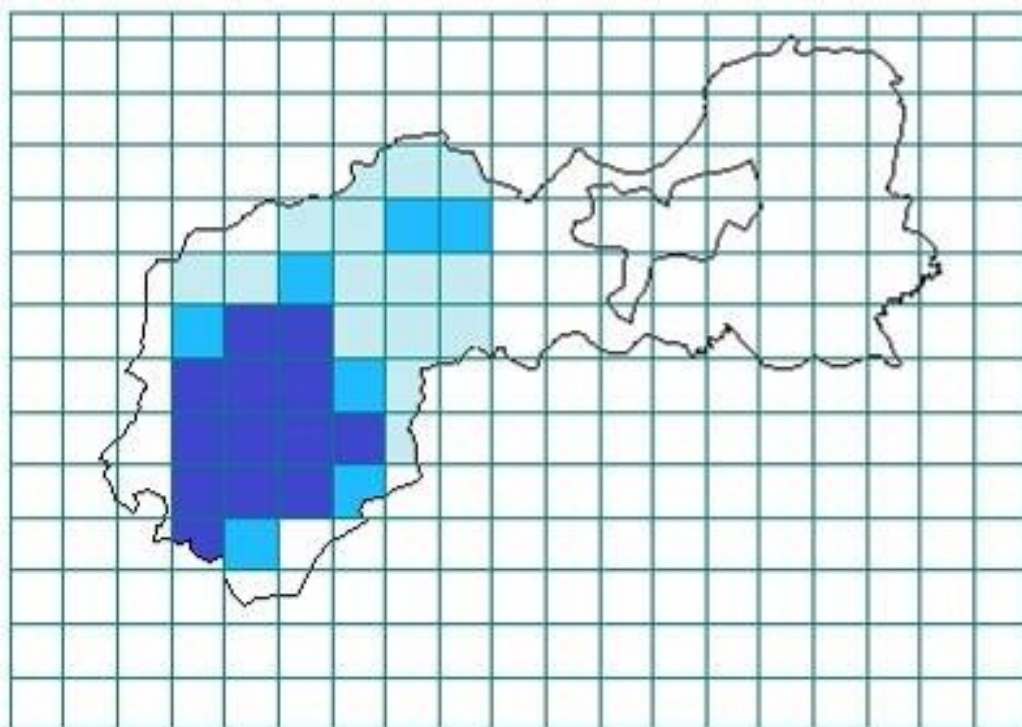
Chó nghiệp vụ phát hiện mẫu phân đã được hợp đồng với Packleader LLC, USA để sử dụng cho mục đích khảo sát. Hai con chó nghiệp vụ đã được lựa chọn và huấn luyện cách nhận và báo thông tin. Hoạt động huấn luyện được thực hiện trước chuyến đi tới Việt nam thông qua mẫu phân của tất cả các loài Tê giác nuôi nhốt, ngoại trừ Tê giác Java (vì không có cá thể Tê giác Java nào được nuôi nhốt). Chó và chuyên viên huấn luyện đều đến Việt Nam vào ngày 4 tháng Mười năm 2009. Các nhà sinh thái học quốc tế tham gia khảo sát đã được đào tạo ba tuần về cách sử dụng chó nghiệp vụ. Chó cũng đã được huấn luyện trên mẫu phân của Tê giác Java thu được ở Cát Lộc.

2.3 Phương pháp khảo sát

Khảo sát được tiến hành trong mùa khô, từ ngày 27 tháng 10 năm 2009 đến ngày 08 tháng 4 năm 2010. Vào mùa mưa, phân sẽ bị phân rã nhanh và khu vực thường trở nên không thể tiếp cận được sau mỗi cơn mưa lớn. Chuyến khảo sát đã được thực hiện theo ba giai đoạn; giai đoạn 1 từ ngày 27 tháng 10 đến ngày 13 tháng 12, giai đoạn 2 từ ngày 26 tháng 1 đến ngày 25 tháng 2, giai đoạn 3 từ ngày 3 tháng 3 đến ngày 8 tháng 4 năm 2010.

Khu vực khảo sát (gần 10.000 ha) được chia làm các ô vuông nhỏ 2km x 2km (400 ha) (Hình 2), dựa trên kích thước di chuyển ước lượng của loài Tê giác Java cái (500 ha), con đực thường di chuyển trên diện tích rộng hơn (van Strien và cộng sự 2008). Mỗi ô vuông có sinh cảnh phù hợp với Tê giác Java được khảo sát (toàn bộ hay một phần của 18 ô vuông trong phần lõi và toàn bộ hay một phần của 17 ô vuông trong phần mở rộng). Nhóm khảo sát nhằm vào mục tiêu khảo sát kỹ khu vực lõi phân bố Tê giác trong cả ba giai đoạn và ít nhất một lần trong khu vực mở rộng (Hình 3). Trong mỗi ô vuông, các điểm quan trọng đối với Tê giác như khu vực đầm lầy, hồ bùn, các lối đi và suối là những nơi tập trung tìm kiếm, nhằm tối đa hóa khả năng tìm thấy mẫu phân của Tê giác. Tất cả các hồ bùn và khu vực đầm lầy trước đây, được VQG Cát Tiên xác định và lập bản đồ, đã được tập trung khảo sát ít nhất là ba lần nếu khu vực vẫn có nước (chỉ có một số ít các hồ bùn vẫn có nước vào cuối mùa khô). Nếu dấu chân của Tê giác được phát hiện trong quá trình khảo sát, nhóm khảo sát sẽ đi theo vết chân theo cả hai hướng ít nhất là 1 km để tìm mẫu phân.

Cuộc khảo sát được hai nhóm công tác thực hiện trên những ô vuông cạnh nhau, mỗi nhóm bao gồm một nhà sinh thái quốc tế/người sử dụng chó nghiệp vụ, một con chó nghiệp vụ, một cán bộ kỹ thuật của VQG Cát Tiên, một cán bộ kiểm lâm và một người dẫn đường địa phương. Trung bình, mỗi đội sẽ khảo sát được một ô mẫu trong vòng một ngày, đi được khoảng từ 3 - 8 km với tốc độ của người đi bộ nhỏ hơn hoặc bằng 1km/giờ. Tốc độ 3 - 5 km/ngày là tối ưu đối với chó nghiệp vụ trong điều kiện rừng mưa nhiệt đới (pers. Comm. Steven Weigley). Nhóm khảo sát làm việc theo từng đợt từ 4 đến 5 ngày liên tục, sau đó nghỉ từ 2 đến 3 ngày, để đảm bảo chó có thời gian nghỉ (khả năng đánh hơi phát hiện mùi của chó có thể bị ảnh hưởng nếu chúng bị mệt mỏi). Khả năng ước tính được chính xác khoảng cách phát hiện của chó đánh hơi phát hiện mùi khi mà điều này phụ thuộc rất nhiều vào các yếu tố địa phương, bao gồm nhiệt độ, thời điểm trong ngày, tốc độ và hướng gió, điều kiện địa hình, loại sinh cảnh và tuổi của mẫu phân. Thông tin thêm về huấn luyện chó nghiệp vụ và khả năng đánh hơi phát hiện mùi, xem Wasser và cộng sự (2004).



Hình 3. Khu vực khảo sát và số lần khảo sát. Ô vuông được khảo sát 3 lần (màu xanh đậm), hai lần (màu trung gian), một lần (màu xanh nhạt), không khảo sát (màu trắng).

2.4 Quy trình lấy mẫu phân

Khi tìm thấy mẫu phân Tê giác, ba mẫu phân được lấy từ mỗi đồng, thực hiện theo phương pháp MIKE (Hedges và Lawson 2006) để nghiên cứu chính xác các loại mẫu thu được theo các phương pháp phân tích gen.

Các mẫu dùng để phân tích ADN sẽ được giữ trong các ống mẫu dung tích 50 ml với: a) dịch đệm ETOH; b) dịch đệm EDTA; c) bao hút ẩm silica gel. Mỗi mẫu được đun đến 72°C trong 30 phút, theo hướng dẫn của Tổ chức Điều tra Thực phẩm Ca-na-đa (Canadian Food Inspection Agency, CFIA). Mẫu a) và c) được lưu trữ trong tủ lạnh ở nhiệt độ 0°C và mẫu b) được lưu trữ ở nhiệt độ phòng (khoảng 32°C) trước khi gửi sang Đại học Queen, Canada, vào ngày 12 tháng Tư năm 2010.

Các thông tin sau đây được ghi lại cùng với mỗi mẫu phân phát hiện tại thực địa: ngày tháng, vị trí GPS (hướng Bắc và hướng Đông), loại sinh cảnh, cao độ địa hình, đồng phân còn nguyên vẹn (có/không), đường kính của đồng phân (nếu vẫn còn nguyên), có nấm trong phân hay không (có/không). Mỗi đồng phân được đánh dấu bằng băng màu trên cây cỏ lân cận để tránh trùng lặp trong các khảo sát tiếp theo.

Hơn nữa, các vị trí dấu chân Tê giác cũng được đánh dấu bằng GPS để xác định sự phân bố của Tê giác ở Cát Lộc. Các tuyến khảo sát ghi nhận bằng máy định vị GPS được tải xuống và dùng để lập bản đồ bằng MapInfo Professional 8.0.

Hai cái răng và ba mẫu mô từ xác chết Tê giác Java được bà Sarah Brook đại diện cho VQG Cát Tiên lấy mẫu vào tháng 5/2010; mẫu răng được giữ trong hộp kín có chất hút ẩm silica gel và mẫu mô được giữ trong ống mẫu dung tích 50 ml với a) dung dịch đệm ETOH, b) dung dịch đệm EDTA (như trên) và c) không có. Giấy phép xuất nhập cảnh CITES đã được cấp và mẫu đã được chuyển đến Đại học Queen vào ngày 22 tháng Mười Một năm 2010.

Hai mươi mẫu phân Tê giác Java thu được bởi cán bộ của VQG Cát Tiên và Dự án Bảo tồn VQG Cát Tiên giữa năm 2003 - 2006 cũng đã được gửi đến Đại học Queen để phân tích, nhằm ước đoán số lượng cá thể tối thiểu trong quần thể trong giai đoạn này (không thể ước tính số lượng tối đa của số cá thể trong quần thể trong giai đoạn này vì công tác khảo sát và lấy mẫu không được thực hiện một cách có hệ thống và toàn diện).

2.5 Phân tích gen

Việc chiết tách ADN từ mẫu phân Tê giác để khuếch đại các vi vệ tinh từ ADN biểu mô được tối ưu hóa. Đối với tất cả các mẫu, quá trình chiết tách được thực hiện theo chi tiết hướng dẫn trong QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAgen cat# 51504), với một ít thay đổi để xử lý mẫu với thể tích lớn với bước xử lý trước khi chiết tách cho mẫu được giữ trong dung dịch ETOH. Khoảng 2.5g được sấy khô trong nón vô trùng dung tích 15mL, đầy bằng Kimwipe (để tránh nhiễm khuẩn) trong hai ngày trong tủ thông gió. Tất cả các mẫu được đồng nhất trong 2-5mL dung dịch đệm ASL (phụ thuộc vào lượng mẫu có trong ống, lượng dung dịch được dùng vừa đủ) bằng cách lắc nhẹ trong vòng một phút. Các mẫu sau đó được quay ly tâm với tốc độ 12.000 vòng/phút trong máy ly tâm Model MB, phần vật chất nổi trên mặt được loại bỏ chỉ còn lại 15mL trong nón. Một viên Inhibitex đã được thêm vào trong mỗi phần nổi trên mặt, để loại bỏ chất ức chế PCR. Viên thuốc thử được làm lơ lửng trong mẫu bằng cách lắc cho đến khi thuốc thử tan hoàn toàn, tiếp theo là lắc nhẹ ống trong vòng một phút.

Mỗi mẫu được ly tâm với tốc độ 8.000 vòng/phút trong máy ly tâm IEC. Phần nổi bên trên sau đó được chuyển sang ống dung tích 15ml; 200 μ L dung dịch men Proteinase K cùng với một lượng dung dịch đệm AL tương đương được thêm vào phần dịch nổi còn lại và được ủ qua đêm trong một máy lắc ở nhiệt độ 37°C. Một thể tích ethanol được thêm vào mỗi mẫu sau đó đảo đều. Các mẫu sau đó được quay qua một cột QIAamp, mỗi lần 700 μ L. Cột sau đó được rửa sạch bằng 500 μ L dịch đệm rửa 1 và 2 và được pha loãng hai lần bằng 200 μ L đệm tách rửa sang một ống ly tâm đơn dung tích 1.5mL (cho tổng dung tích 400 μ L). Khi ADN đã được chiết tách từ mẫu phân, các mẫu được cô đặc trong một máy LABCONCO Centrivac bằng nhiệt, để thu được một thể tích khoảng 200 μ L. Để đảm bảo ADN có mặt trong dung môi rửa giải hấp cuối cùng này, 20 μ L từ mỗi mẫu được chạy trên một gel 0.8% agarose tỷ lệ pha loãng 1:100 dịch chiết từ mẫu phân dùng để phân tích ADN thì khuếch đại tốt hơn khi dùng dịch chiết 1:1. Từ mỗi được lấy từ các cá thể Tê giác khác, điều kiện khuếch đại cho 12 vi vệ tinh có thể thực hiện được đối với mẫu mô và phân Tê giác Java (Bảng 1 & 3) đã được tối ưu hóa. Thông tin chi tiết về các chuỗi cặp môi và tính chất của các lặp được khuếch đại, xem phụ lục 1. Đối với điều kiện tuần hoàn PCR của mỗi vi vệ tinh được tối ưu hóa cho Tê giác Java, xem phụ lục 2. Đối với dịch trộn PCR đã dùng cho tất cả các PCR xem phụ lục 3.

Từ 09 mẫu môi gốc, 01 môi (JR159) có chứa một giả hình PCR từ GCR-PCR và đã bị loại không dùng. Các chuỗi sao của bốn trong số tám môi đủ tốt nên không có thêm môi nào có thể được thiết kế (JR 002A, JR 006, JR 016 & JR 029). Đối với bốn môi còn lại – JR003, JR049, JR088 và JR106 – các môi được thiết kế lại có thể cho kết quả tốt hơn các môi gốc. Các đặc tính trên bộ kiểm soát được trình bày chi tiết trong phụ lục 1 và bảng 3 (bộ kiểm soát bao gồm 7 mẫu xương và mô của Tê giác, năm mẫu được lấy từ các bảo tàng có thời gian hơn 100 năm tuổi và hai mẫu được lấy từ hai cá thể chết gần đây tại Việt Nam và In-đô-nê-xi-a). Các đoạn mẫu mới này không được tối ưu hóa đầy đủ để khuếch đại ADN trong mẫu phân của Tê giác Java.

Phương pháp của Borthakur và cộng sự (2010) được sử dụng để khuếch đại PCR ba bản sao từ trích đoạn của mỗi mẫu phân được lấy trong các khảo sát từ năm 2009-2010 qua tất cả các môi vi vệ tinh đã được tối ưu hóa.

Nếu không có sự thống nhất trong các mẫu (nghĩa là hai trong số ba mẫu sao của cùng một mẫu phân), ba mẫu sao khác sẽ được khuếch đại tiếp. (Nếu không có mẫu sao nào đồng nhất

thì vi vệ tinh không được tối ưu hóa hoàn toàn cho trích đoạn từ mẫu phân của Tê giác Java và vì vậy sẽ không được tiếp tục phân tích).

Để cẩn thận, tất cả các kết quả lấy mẫu theo diêm của ô gen cho các ô gen đã được tối ưu hóa hoàn toàn trong đó tất cả ba bản sao hoặc hai trong số ba bản sao có cùng một kiểu gen đã được ghi lại (Bảng 3). Trong trường hợp cả ba mẫu sao cho biết thuộc ba hệ gen khác nhau, thì mẫu sẽ được khuếch đại lại một lần và nếu cũng thu được kết quả như vậy thì mẫu vị trí x được ghi là 0:0. Trong trường hợp này ADN biểu mô đích của Tê giác Java không cho kết quả đúng. Trong một số trường hợp khi ô gen x mẫu có tối đa hai bản sao được khuếch đại sau nhiều lần thực hiện thì sẽ ghi là 0:0. Có thể trong trường hợp này không có biểu mô đích của Tê giác Java ADN và không thu được sản phẩm. Nếu không thì kiểu gen đồng thuận của tế bào ô gen mẫu x sẽ được đưa vào.

2.6 Xác định giới tính bằng gen

Phản ứng đa phức phân sử dụng hai cặp mồi được tối ưu hóa để xác định giới tính của Tê giác Ấn Độ (Stoop 2009, Borthakur và cộng sự 2010) và phương pháp sử dụng cặp mồi đơn Zinc Finger đã được sử dụng thử (Pepin và cộng sự 2009). Mặc dù phản ứng đa phức cho hầu hết các loài Tê giác khác sử dụng cá thể đã biết giới tính đã được tối ưu hóa, giới tính của Tê giác Java trong các mẫu trong thử nghiệm này là không rõ. Hơn nữa, sự khuếch đại của sản phẩm ZFy lớn hơn trong mẫu phân của Tê giác là không mong đợi, vì vậy phương pháp này đã bị loại bỏ.

Các mồi theo Peppin và cộng sự (2010) được đánh giá để xác định giới tính của Tê giác cho cả nền ABI và Licor. Các cặp mồi này được chọn vì chúng khuếch đại các phân đoạn nhỏ ADN ~ 95-107bp, và vì vậy thích hợp cho việc khuếch đại ADN biểu mô của Tê giác đã bị phân hủy tìm được trong mẫu phân. Các mẫu mồi trước tiên được đánh giá trên ADN từ các bộ kiểm soát (mẫu xương và mô) và sau đó là trên ADN được lấy từ mẫu phân và mô được lấy từ xác chết của Tê giác Java Vườn Quốc gia Cát Tiên, được so sánh với kết quả từ tất cả các loài Tê giác hiện có trong điều kiện giới tính đã được xác định. Tất cả các khuếch đại bao gồm một đoạn kiểm soát âm tính không có ADN mẫu. Các sản phẩm khuếch đại được pha loãng 10 lần trong dung dịch ABI Hi-Di Formamide trước khi điện di mao dẫn trên máy phân tích gen Applied Biosystems Inc. 3130xl Genetic Analyzer (ABI) hoặc chạy trực tiếp trên Licor 4200. Các alen được xác định cỡ dựa theo một chuẩn nội vi (xem hình 9 về Licor).

Bảng 1. Thông tin chi tiết về 12 vị trí vi vệ tinh của Tê giá khác Java khuếch đại ADN vi vệ tinh của Tê giá Java trong bộ kiểm soát JR và trong mẫu phân tại VQG Cát Tiên từ 2009 đến 2010. Hầu hết các vị trí đều thể hiện kiểu gen đồng hợp tử trong bộ kiểm soát ngoại trừ SR 54, WR32A và WR32F, có nhiều hơn 2 alen. Một số mẫu khuếch đại tốt hơn các mẫu khác. Một số ADN di truyền trong tất cả các mẫu không có. Ví dụ số 146717 (một mẫu da từ viện bảo tàng) không có để xét nghiệm bộ kiểm soát của DB44, IR10, IR11, SR 262, SR 281, WR 32A, WR 32F và WR 35A. Điều này được ghi 'NA' trong vị trí tương ứng của mẫu x trong bảng. Các mẫu được khuếch đại ít nhất ba lần đối với mỗi vị trí (ngoại trừ WR32A và WR32F chỉ được khuếch đại một lần) ở nhiệt độ nguội tối ưu 58⁰ hoặc với một vòng Touch Up (TU) PCR (Phụ lục 2). CA 1/10 là mẫu từ VQG Cát Tiên. DNA từ xương 150 năm tuổi khuếch đại tốt nhất.

	DB44		IR10		IR11		SR262		SR281		WR32A		WR32F		WR35A									
CA 1/10 (SR262)	131	131	126	126	191	191	0	0	115	115	0	0	159	159	111	111	0	0	0	0	228	228	202	202
5169 (DB44)	131	131	126	126	191	191	200	200	115	115	187	187	157	157	111	111	220	220	236	232	242	228	202	202
5170 (DB44)	131	131	126	126	191	191	0	0	115	115	187	187	159	159	111	111	0	0	0	0	228	228	202	202
6212 (SR262)	131	131	126	126	191	191	0	0	0	0	187	187	0	0	0	0	220	220	0	0	0	0	202	202
NA 1/10 (SR262)	131	131	126	126	191	191	200	200	0	0	0	0	159	159	111	111	220	220	0	0	242	242	202	202
146717 (DB44)	131	131	126	126	NA	NA	NA	NA	NA	NA	187	187	159	159	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA 1/10 (SR262)	131	131	126	126	191	191	200	200	115	115	187	187	0	0	111	111	220	220	236	232	228	228	202	202

1/10 = mẫu làm việc tốt nhất ở mức độ pha loãng 1/10 từ nồng độ dịch chiết gốc.

2.7 Kiểm định đa dạng vi khuẩn

Các mẫu thu được từ năm 2003 đến năm 2006 và từ năm 2009 đến năm 2010 thu được trong các khảo sát gần đây đã được dùng để đánh giá mức độ đa dạng vi khuẩn của phân để phân biệt các cá thể Tê giác khác nhau. Kiểm nghiệm này đã được tiến hành với người (*Ley và cộng sự* 2008). Sử dụng các môi ADN vi khuẩn 16s, các đoạn sao của ADN từ vi khuẩn trong phân đã được khuếch đại bằng PCR. Một số lượng lớn các ADN đã được khuếch đại đã được giải mã cho mỗi mẫu chiết sử dụng phương pháp giải mã 454. Bằng UNIFRAC, thông tin giải mã được phân tích để đưa ra ma trận khoảng cách không và có trọng số, sau đó được phân tích bằng các phương pháp phân tích tọa độ chính. Tất cả các mẫu phân chiết của Tê giác Java (N= 104) được phân tích bằng phương pháp này.

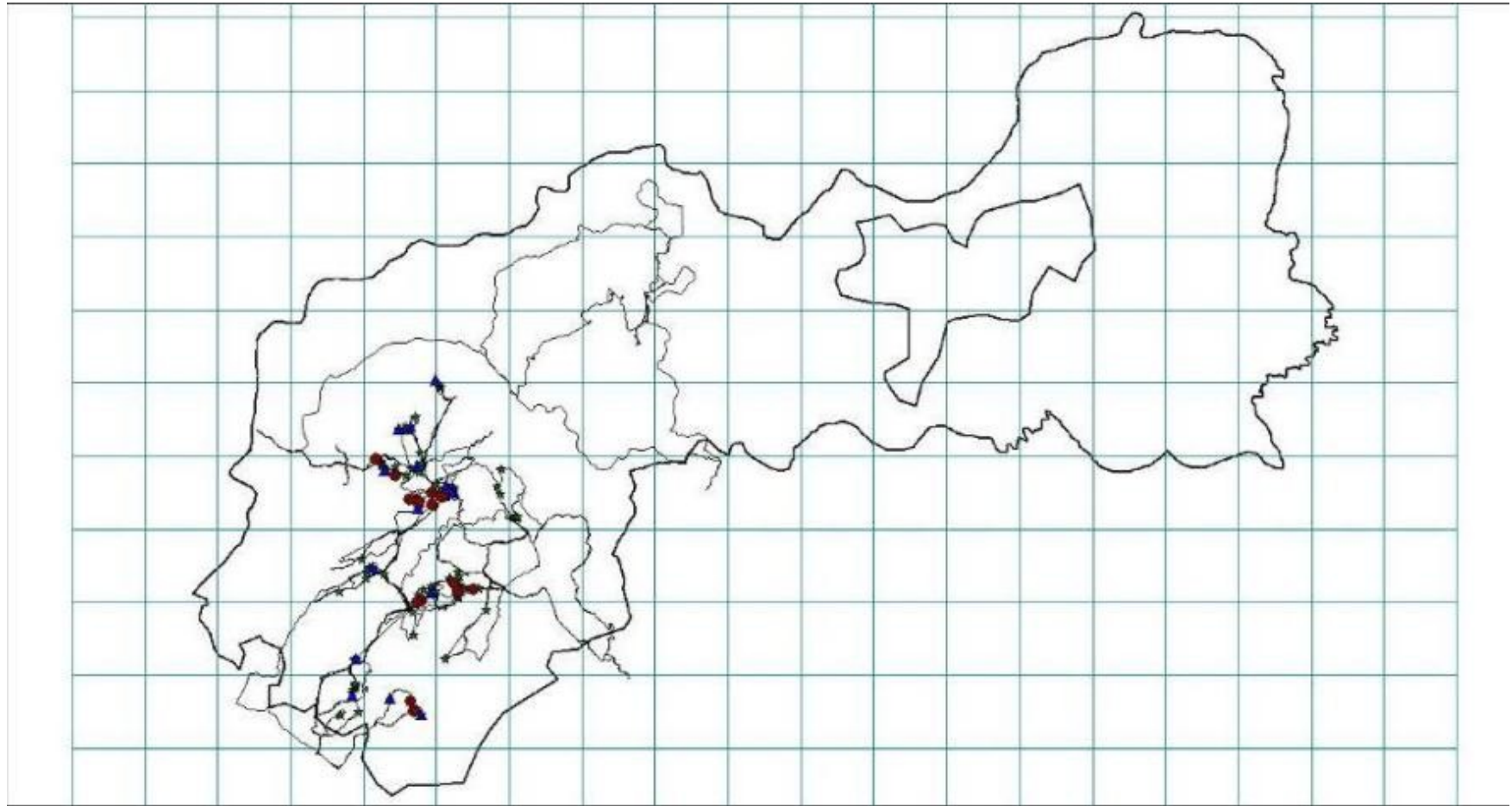
Trong một số trường hợp chỉ tạo được 170 trình tự RNA 16s của vi khuẩn từ mỗi mẫu dịch chiết từ phân, vì vậy chỉ có 170 trình tự được chọn từ mỗi mẫu phân để thực hiện phân tích thêm (làm loãng).

3. KẾT QUẢ

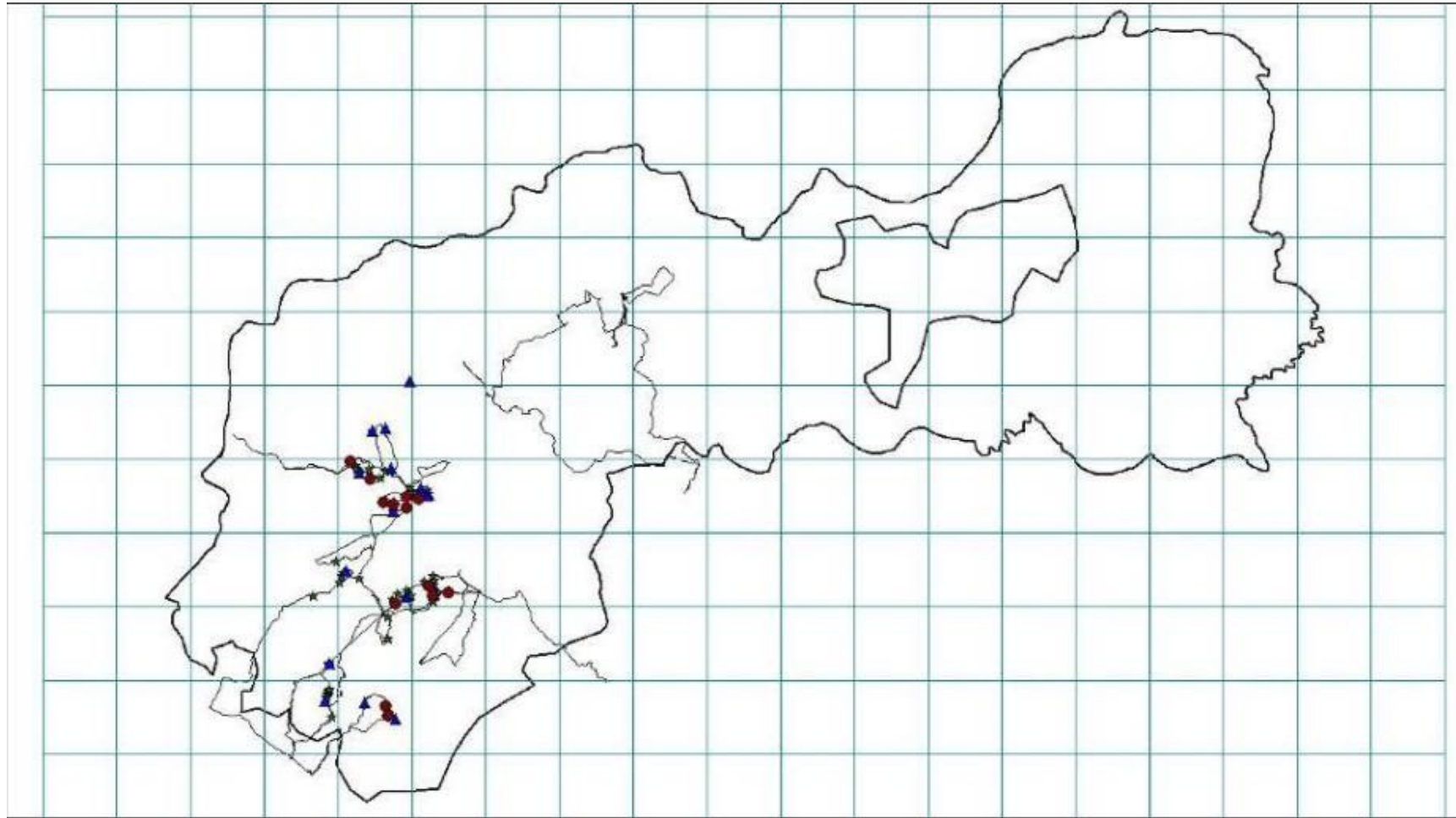
3.1 Các kết quả khảo sát

Tổng số 118 ngày khảo sát đã được thực hiện bởi hai nhóm khảo sát, với tổng số đoạn đường đi ít nhất là 429 km (Hình 4). Giai đoạn đầu thực hiện được 18 ô vuông trong khu vực lõi Tê giác, và 17 ô trong khu vực mở rộng (Hình 5). Giai đoạn 2 chỉ tập trung vào khu vực lõi Tê giác, thực hiện một khảo sát lặp lại trên 14 ô vuông (Hình 6). Giai đoạn 3 thực hiện khảo sát lặp lại trong 16 ô vuông thuộc khu vực lõi Tê giác và 10 ô thuộc khu vực mở rộng (Hình 7).

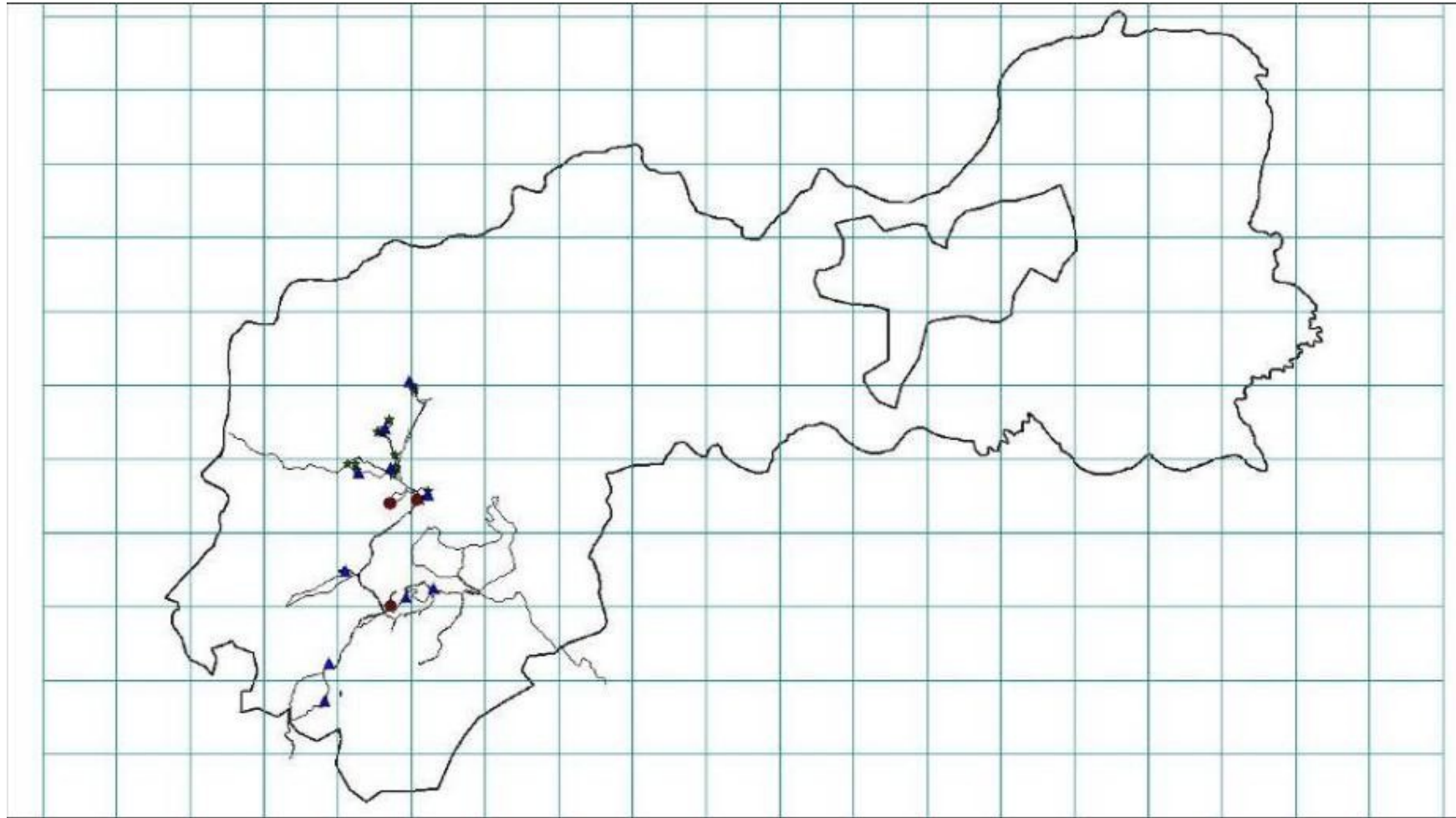
Thông tin có liên quan tại 18 hố bùn/ đầm lầy đã được ghi lại. Mười tám địa điểm này đã được xác định trong các khảo sát trước đây, đều có dấu vết của Tê giác trong quá trình khảo sát ngoại trừ hai vị trí không tìm thấy (Hình 4).



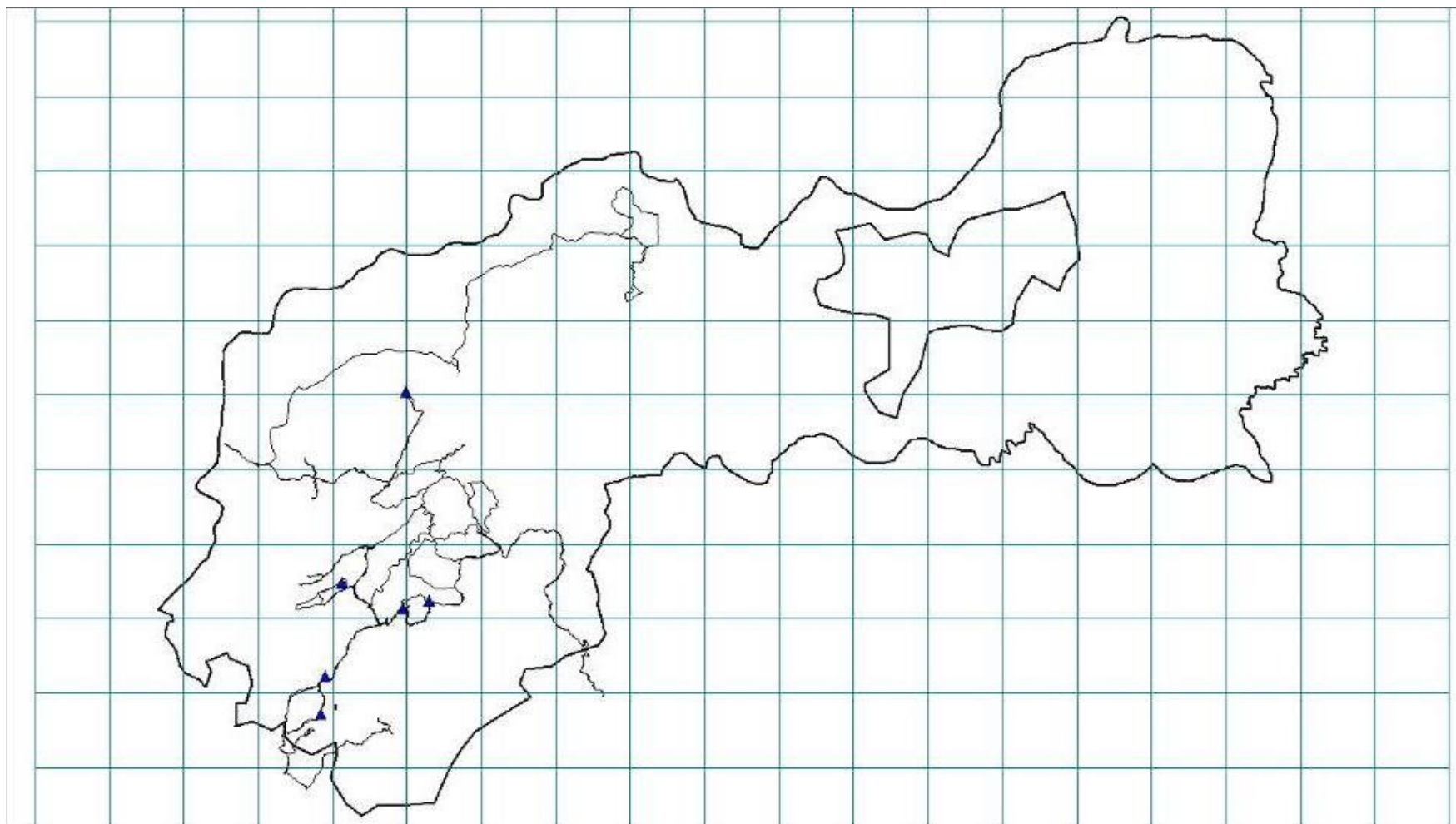
Hình 4. Bản đồ tất cả các tuyến khảo sát (đường màu đen), vị trí mẫu phân của Tê giác Java (vòng tròn đỏ), dấu chân (dấu chữ thập xanh) và hổ bùn (tam giác xanh).



Hình 5. Bản đồ khảo sát giai đoạn 1 (29/10/09 – 13/12/09); tuyến khảo sát (đường đen), mẫu phân tê giác Java (vòng tròn đỏ), dấu chân (dấu sao xanh) và hổ bùn lầy (tam giác xanh).



Hình 6. Bản đồ khảo sát giai đoạn 2 (26/01/10 – 25/02/10); tuyến khảo sát (đường màu đen), mẫu phân của Tê giác Java (dấu tròn đỏ), dấu chân (sao xanh lá cây) và hồ bùn lầy vẫn còn ẩm ướt (tam giác màu nước biển).



Hình 7. Bản đồ khảo sát giai đoạn 3 (03/03/10 – 08/04/10); tuyến khảo sát (đường màu đen), hố bùn lầy vẫn còn ẩm ướt (tam giác màu nước biển).

Bảng 2. Chi tiết về mẫu phân Tế giác Java.

Ngày	Số hiệu mẫu	Tọa độ-E	Tọa độ-N	Sinh cảnh	Nằm tồn tại trong mẫu phân	Đóng phân còn nguyên	Khuếch đại
27/10/2009	D-1	753396	1287043	Giông núi, bụi mây	Có	Bị phân hủy	Có
27/10/2009	D-2	753289	1287292	Giông núi, tre	Có	Bị phân hủy	Có
27/10/2009	D-3	753369	1287042	Giông núi, bụi mây	Có	Bị phân hủy	Có
27/10/2009	D-4	753365	1287043	Giông núi, bụi mây	Có	Bị phân hủy	Không
27/10/2009	D-5	753367	1287041	Giông núi, bụi mây	Có	Bị phân hủy	Không
12/11/2009	D001	753559	1290070	Giông núi, bụi mây, tre	Có	Không	Có
13/11/2009	D003	753857	1292664	Đốc, tre	Không	Không	Không
18/11/2009	D002	752333	1293920	Giông núi, bụi mây, tre	Không	Không	Có
19/11/2009	D004	752873	1293464	Giông núi, tre	Không	Không	Có
20/11/2009	D006	754188	1292918	Giông núi, tre	Không	Bị phân hủy	Có
20/11/2009	D008	754186	1292919	Giông núi, tre	Không	Bị phân hủy	Có
20/11/2009	D010	753876	1292990	Giông núi, tre	Không	Không	Có
20/11/2009	D012	753866	1292988	Giông núi, tre	Không	Không	Có
20/11/2009	D014	753501	1292770	Đốc, tre	Không	Không	Có
20/11/2009	D016	753237	1292831	Đốc, tre, bụi mây	Không	Không	Có

13/12/2009	D018	755001	1290368	Giông núi, bụi mây, tre	Không	Bị phân hủy	Có
13/12/2009	D020	754464	1290546	Giông núi, bụi mây, tre	Không	Không	Có
13/12/2009	D022	754587	1290296	Đầm lầy dương xỉ	Có	Còn nguyên	Không
28/01/2010	D005	753454	1290017	Giông núi, tre	Có	Bị phân hủy	Có
28/01/2010	D024	754150	1292890	Giông núi, tre	Không	Còn nguyên	Không
04/02/2010	D007	753425	1292791	Đốc, tre	Không	Còn nguyên	Có

NB. Bảng này không bao gồm các mẫu phân được thu thập bởi vườn Quốc gia Cát Tiên từ một mẫu phân khác của Tê giác Java trước chuyến khảo sát năm 2009.

Dấu chân phần lớn được tìm thấy trong các vùng nước nông và đầm lầy tuy nhiên thông tin này có thể sai lạc theo mùa vì thực tế trong mùa khô, dấu chân chỉ có thể lưu lại tại các khu vực bùn lầy.

Trong khoảng thời gian từ ngày 27 tháng 10 năm 2009 đến ngày 4 tháng 2 năm 2010, tổng cộng 22 đồng phân Tê giác Java đã được định vị và lấy mẫu và gửi đi phân tích ADN (Hình 4, Bảng 2). Đáng chú ý là không phát hiện thêm được đồng phân nào kể từ sau ngày 4 tháng Hai, trong vòng 9 tuần cuối cùng của chuyến khảo sát và không tìm thấy thêm được dấu chân mới nào (dấu chân không được tìm thấy trong khảo sát trước đây) kể từ sau giữa tháng Hai (Hình 7).

3.2 Xác định kiểu gen

Vật liệu thu được trong năm 2003-2006 khó có thể thực hiện phân tích được vì thời gian sau thu mẫu quá dài; tỷ lệ khuếch đại thành công thấp sau nhiều lần pha loãng và nhiều lần phải chiết lại mẫu từ mẫu phân. Vì vậy phân tích kiểu gen từ mẫu phân thu được trong giai đoạn 2003-2006 đã bị dừng lại, để tập trung thực hiện cho các mẫu phân từ Tê giác Java thu được trong giai đoạn 2009-2010.

Chỉ có một cá thể Tê giác Java được xác định trong các mẫu phân thu được trong giai đoạn 2009-2010 (Bảng 3). Kiểu gen này phù hợp với kiểu gen trong mẫu da thu được từ Tê giác Java chết được tìm thấy trong VQG Cát Tiên.

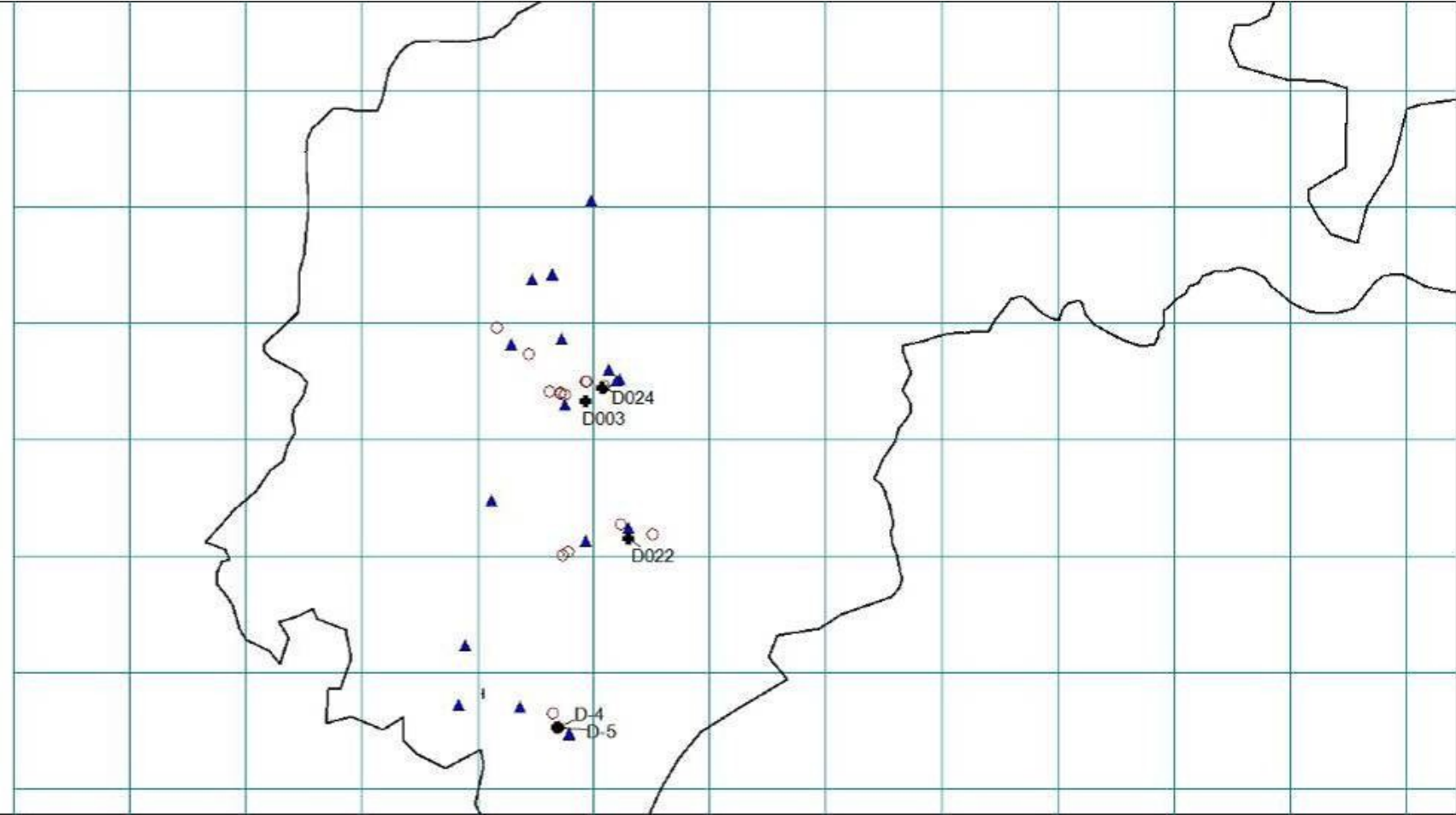
Các mẫu phân Tê giác Java có chất lượng ADN biểu mô khác nhau và vì vậy khả năng thành công khi khuếch đại cũng khác nhau qua các vị trí vi vệ tinh. Năm mẫu không cho được kết quả nào dù đã được thực hiện lặp lại việc chiết tách mẫu và khuếch đại và vì vậy các mẫu này không được tiếp tục phân tích. Năm mẫu không khuếch đại là các mẫu được thu thập từ bốn vị trí khác nhau. Hai mẫu được lấy cùng thời điểm và vị trí, vào lúc mới bắt đầu chuyến khảo sát: tháng 10 năm 2009 (D-4, D-5), đã bị phân rã tương đối. Mẫu thứ ba bị phân hủy mạnh (D003); không thấy phân mà chủ yếu là thành phần sợi. Mẫu thứ tư được tìm thấy ở một vị trí đầm lầy (D022), một phần ngập trong nước đã làm trôi đi các tế bào biểu mô. Mẫu thứ năm bị phân hủy một phần, thu được cuối tháng Một năm 2010 (D024). Tất cả các mẫu không khuếch đại được tìm thấy gần các mẫu khác đã được khuếch đại (Hình 8).

Trong số dữ liệu từ 17 mẫu phân, có 01 mẫu phân có 57% khuếch đại qua tất cả 12 ổ gen. Khi chỉ có các mẫu khuếch đại ở 50% hoặc nhiều ổ gen hơn được xem xét (sáu mẫu đã bị bỏ) xác suất này tăng đến 69%. Không phải tất cả các ổ gen đều có mức độ tin cậy như nhau vì bình quân mỗi ổ gen khuếch đại 53% của các mẫu. Khi 4 ổ gen bị loại bỏ - IR12, WR32A, WR32F và WR35A – tỷ lệ này tăng lên 67%.

Bảng 3. Kiểu gen của 17 mẫu phân Tê giác Java 2009-2010 khuếch đại vi vệ tinh sau khi lặp lại thử nghiệm với tất cả 12 ổ gen được liệt kê trong bảng 1. Dữ liệu này cho thấy rằng chỉ có một cá thể Tê giác VQG gia Cát Tiên trong thời gian từ 2009-2010, kết luận này cũng phù hợp với khảo sát đa dạng vi khuẩn của mẫu phân Tê giác Java. Quy luật cho mỗi tế bào ổ gen mẫu x được mô tả trong tài liệu. Năm trong số 22 mẫu phân thu được trong thời gian 2009-2010 không thực hiện kiểm nghiệm kiểu gen vi vệ tinh được. Cột cuối cùng của bảng thể hiện tỷ lệ thành công trung bình cho một mẫu qua 12 vị trí và dòng cuối cùng thể hiện tỷ lệ thành công trung bình cho một vị trí qua 17 mẫu (xem thêm phần nội dung mô tả để biết thêm chi tiết).

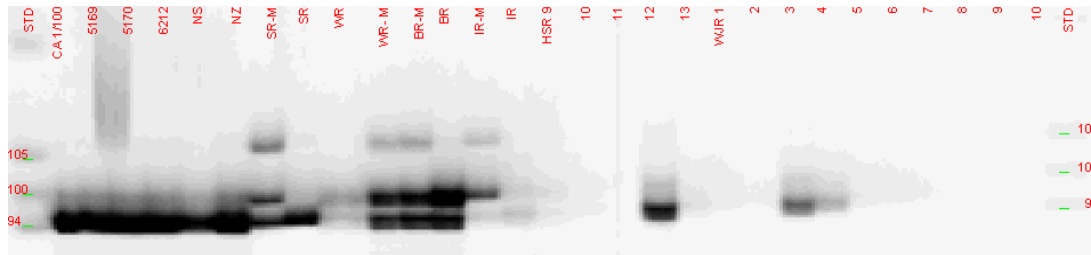
Final Sample	DB0	DB1	DB2	DB3	DB4	DB5	DB6	DB7	DB8	DB9	DB10	DB11	DB12	DB13	DB14	DB15	DB16	DB17	DB18	DB19	DB20	DB21	DB22	Average Samples	
001[Full]	131	131	126	126	191	191	200	200	132	132	187	187	157	157	111	111	220	220	0	0	0	0	202	202	0.85
002[Full]	131	131	126	126	191	191	0	0	132	132	187	187	157	157	111	111	0	0	0	0	212	228	202	202	0.77
001[Full]	131	131	126	126	191	191	0	0	132	132	187	187	0	0	111	111	228	220	236	232	212	228	202	202	0.85
005[1/10]	0	0	0	0	191	191	200	200	0	0	0	0	0	0	111	111	0	0	0	0	0	0	0	0	0.31
006[1/10]	131	131	0	0	191	191	0	0	132	132	187	187	157	157	111	111	220	220	236	232	0	0	0	0	0.65
007[1/100]	131	131	0	0	0	0	200	200	132	132	187	187	157	157	0	0	0	0	0	0	0	0	202	202	0.51
008[1/10]	0	0	0	0	191	191	0	0	0	0	0	0	157	157	111	111	0	0	0	0	0	0	0	0	0.31
009[1/100]	131	131	126	126	0	0	200	200	132	132	0	0	157	157	0	0	220	220	0	0	0	0	202	202	0.62
010[1/100]	131	131	126	126	191	191	200	200	132	132	0	0	157	157	0	0	0	0	236	232	212	228	0	0	0.65
012[1/100]	131	131	126	126	191	191	200	200	132	132	0	0	157	157	111	111	220	220	0	0	0	0	202	202	0.77
014[1/100]	131	131	126	126	0	0	200	200	132	132	0	0	157	157	0	0	220	220	0	0	0	0	0	0	0.51
016[1/10]	131	131	126	126	0	0	0	0	132	132	0	0	157	157	0	0	220	220	0	0	0	0	0	0	0.46
018[1/100]	131	131	126	126	191	191	200	200	132	132	0	0	157	157	111	111	220	220	0	0	0	0	0	0	0.65
020[Conc.]	131	131	126	126	0	0	0	0	132	132	0	0	157	157	111	111	220	220	0	0	0	0	202	202	0.62
A[1/10]	0	0	0	0	191	191	200	200	0	0	0	0	0	0	111	111	0	0	0	0	0	0	0	0	0.31
B[1/100]	0	0	0	0	0	0	200	200	132	132	0	0	157	157	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.31
B[1/100]	0	0	0	0	191	191	200	200	0	0	0	0	157	157	111	111	0	0	0	0	0	0	0	0	0.38
Average Sici			0.71	0.59	0.65	0.65	0.76	0.29	0.82	0.65	0.53	0.18	0.18	0.41											

Hình 8. Vị trí mẫu phân có (vòng tròn) và không khuếch đại (dấu thập đen) khuếch đại ADN để phân tích, và các hố đầm lầy (tam giác xanh).



3.3 Phân tích gen để xác định giới tính

Theo phương pháp xác định giới tính của Peppin và cộng sự (2010), giới tính cái được thể hiện qua một hay cả hai dải thấp ở 95/99 trong khi sự hiện diện của giới tính đực sẽ bao gồm hai dải này và thêm một dải khác ở 107bp. Trong tất cả sáu mẫu kiểm soát đối với Tê giác Java, hai sản phẩm 95/99 đã được tạo ra giống hệt dải của cá thể cái Tê giác đen (*Diceros bicornis*) và tê giác của Ấn Độ, Sumatra (*Dicerorhinus sumatrensis*) và Tê giác trắng. Không phát hiện thấy dải trên 107 như nhìn thấy ở cá thể đực của các loài Tê giác khác. Kết quả này cho thấy rằng tất cả các mẫu Tê giác Java đều mang giới tính cái (kể cả mẫu mô lấy từ cơ thể chết của Tê giác tại Việt Nam). Tất cả các dịch chiết từ mẫu phân đã khuếch đại chỉ thể hiện dải của cá thể cái. Có lẽ tất cả các mẫu phân đó là từ cùng một cá thể, nên kiểu gen đã chỉ ra đó là một cá thể cái.



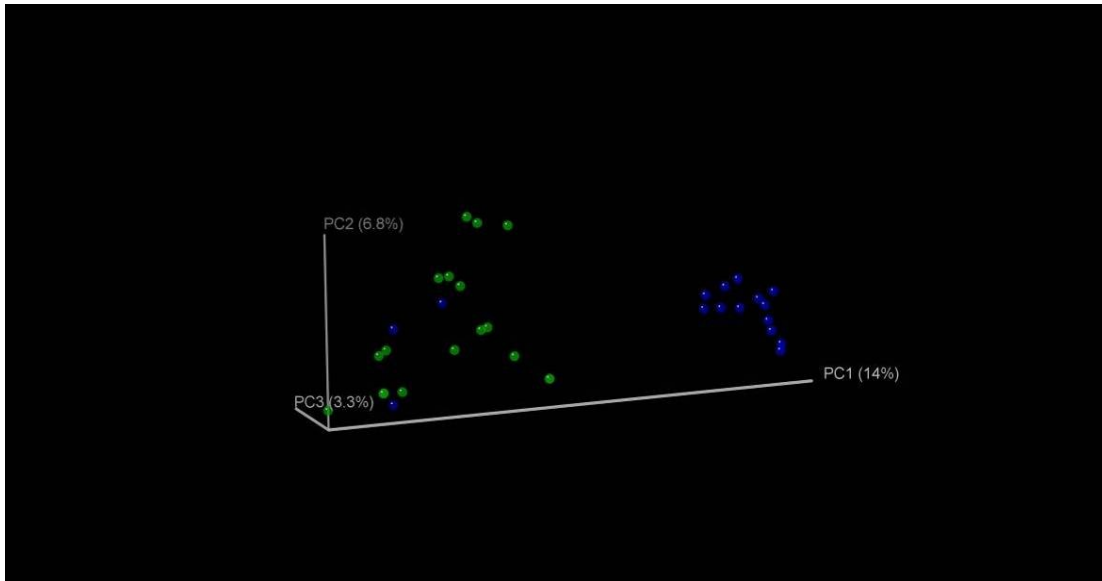
Hình 9. Xác định giới tính của các mẫu từ Tê giác Java sử dụng các phương pháp của Peppin và cộng sự (2010). Phân tích này cho thấy cá thể Tê giác Java chết gần đây tại VQG Cát Tiên (CA 1/100) mang giới tính cái. Các chuẩn kích thước cặp cơ sở 94, 100 và 105 đã được chỉ rõ. Sáu mẫu đầu tiên là mẫu của 7 bộ kiểm soát đối với Tê giác Java, sau đó là 2 Tê giác Sumatra, 2 trắng, 2 đen và 2 Ấn Độ. Sau đó là Tê giác 5 Sumatran (HSR9 đến 13) và 10 mẫu phân Tê giác Java (WJUR1 đến 10). Giới tính của Tê giác, nếu đã biết, được biểu thị bằng (-M). Cá thể đực Tê giác đen (BR-M), Ấn Độ (IR-M), Sumatra (SR-M) và Tê giác trắng (WR-M) đã thấy rõ ràng. Phân tích giới tính của kiểu gen trong phân Tê giác Java sử dụng dịch chiết tươi 1:10 từ mười mẫu phân thu được trong giai đoạn 2009-2010. Hai trong số các dịch chiết khuếch đại thành công chỉ qua một lần thao tác này. Để thu được một tập dữ liệu hoàn chỉnh, các PCR đã được hoàn thành bằng cả dịch chiết ADN không pha loãng và pha loãng tỷ lệ 1:100.

3.4 Kiểm nghiệm đa dạng vi khuẩn

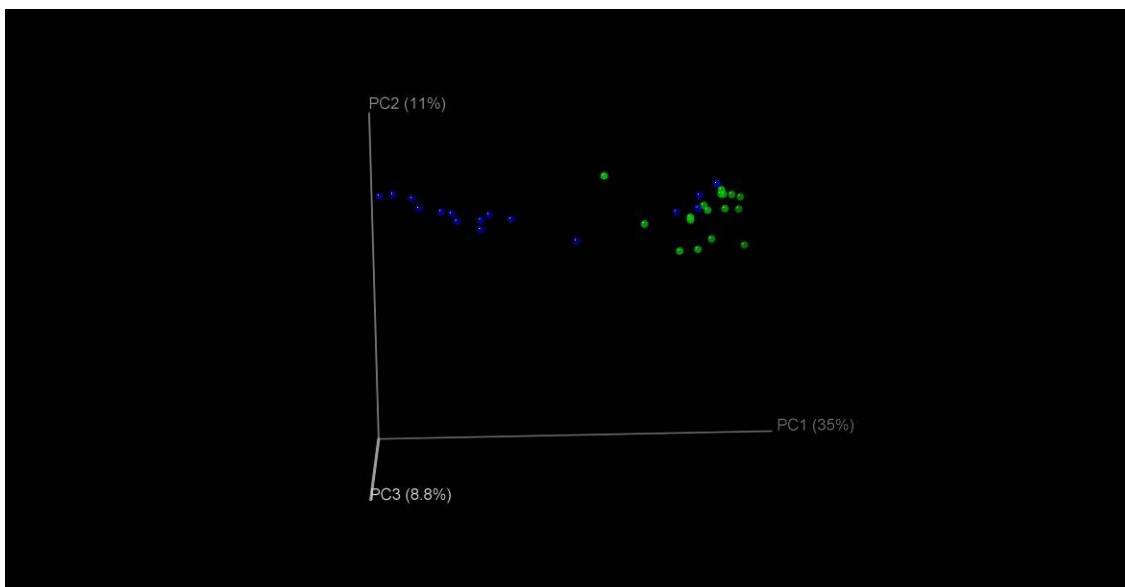
Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng chỉ có một cá thể Tê giác Java cho các mẫu thuộc giai đoạn 2009-2010 và hai cá thể cho các mẫu trong giai đoạn 2003-2006. Hầu hết các mẫu duy nhất thuộc giai đoạn 2003-2006 hình thành đám mây (màu xanh) ngoại trừ ba mẫu trong vùng phân tích không có trọng số (Hình 10) và 04 mẫu trong vùng phân tích có trọng số (Hình 11), nhưng trong vùng mẫu duy nhất thuộc giai đoạn 2009-2010 (màu xanh lá cây). Điều này cho thấy rằng có từ 03 đến 04 mẫu thu được trong giai đoạn 2003-2006 là từ một cá thể sống trong giai đoạn 2009-2010.

Kết quả này cần được xem xét một cách cẩn thận vì chỉ được phân tích dựa trên một số lượng tương đối nhỏ các trình tự. Tuy nhiên, các nghiên cứu khác cho thấy việc tăng các trình tự không làm ảnh hưởng đến kết quả chính (Ley và cộng sự 2008). Thực tế sự tương tự của các phân tích có trọng số (Hình 11) và không có trọng số (Hình 10) cho thấy việc sử dụng mẫu của chỉ 170 trình tự có lẽ đã không dẫn đến những kết quả thiên vị vì ma trận khoảng cách có trọng số không bị ảnh hưởng bởi tỷ lệ tương đối lớn của các trình tự.

Việc lưu trữ ba mẫu sao của mỗi mẫu phân Tê giác Java để phân tích ADN và kiểm nghiệm đa dạng vi khuẩn được tối ưu trong ethanol 95%.



Hình 10. Phân tích tọa độ nguyên tắc của sự đa dạng vi khuẩn của các mẫu phân Tê giác Java thu được trong giai đoạn 2003-2006 (chấm màu xanh nước biển) và 2009-2010 (chấm màu xanh lá cây). Pcoa được tiến hành trên một ma trận không trọng số. Ba mẫu phân thuộc năm 2004 có liên hệ chặt chẽ với các mẫu thuộc 2009 cho thấy rằng có hơn một cá thể Tê giác sống trong năm 2004 và một cá thể sống trong năm 2009.



Hình 11. Phân tích tọa độ nguyên tắc cho đa dạng vi khuẩn trong mẫu phân thuộc giai đoạn 2003-2006 (chấm màu xanh biển) và 2009-2010 (chấm xanh lá cây). Pcoa được thực hiện trên một ma trận khoảng cách có trọng số là tỷ lệ tương đối của mỗi trình tự. Bốn trong số các mẫu phân thuộc năm 2004 có liên hệ chặt chẽ với các mẫu phân thuộc 2009 cho thấy rằng có hơn một cá thể Tê giác sống trong giai đoạn 2003-2006 và một cá thể Tê giác sống trong giai đoạn 2009-2010. Sự phân tán nhiều trong ma trận khoảng cách này được giải thích do có sự giãn tọa độ so với trường hợp ma trận không có trọng số.

4. THẢO LUẬN

Khảo sát này đã bao phủ trên diện tích được biết đến là sinh cảnh của Tê giác và có khả năng là sinh cảnh của Tê giác Java tại Cát Lộc. Khảo sát được tiến hành lặp lại trong khu vực lõi phân bố Tê giác để đảm bảo có thể thu thập được đầy đủ các mẫu phân trên một diện tích đáng kể ở Cát Lộc. Diện tích mở rộng cũng đã được khảo sát để đảm bảo rằng không có cá thể nào bị bỏ qua. Không tìm thấy dấu hiệu nào về Tê giác Java ngoài khu vực lõi phân bố Tê giác tại bất kỳ thời điểm nào của quá trình khảo sát.

Các phân tích kiểu gen, kiểm định đa dạng vi khuẩn, dữ liệu thực địa đã được tổng hợp, xác nhận sự tuyệt chủng của Tê giác Java tại Việt Nam. Dữ liệu về gen được trích lọc từ 17 và 22 mẫu phân (77%) được các nhóm khảo sát thu thập; số còn lại có khả năng là quá cũ và đã bị phân hủy mạnh nên không thể phân tích DNA. Các nghiên cứu về gen xác nhận rằng tất cả 17 mẫu phân có cùng kiểu gen và trùng hợp với kiểu gen mẫu da lấy từ cá thể Tê giác chết tại VQG Cát Tiên phát hiện vào tháng 4/2010. Do những nỗ lực khảo sát và diện tích khảo sát đáng kể, tất cả các mẫu khuếch đại cho kết quả từ một cá thể, và kiểu gen phù hợp với cá thể Tê giác chết phát hiện vào tháng 4/2010, chúng tôi xác nhận không còn cá thể Tê giác nào tồn tại ở VQG Cát Tiên.

Thông tin đa dạng vi khuẩn thống nhất với kết luận trên, qua phân tích tọa độ nguyên tắc xác nhận chỉ có một cá thể Tê giác Java sống trong giai đoạn 2009-2010. Từ nghiên cứu này, có thể thấy rằng, còn ít nhất một cá thể tê giác khác cùng tồn tại với cá thể tê giác này trong thời gian thu thập mẫu từ 2003 – 2006 trong VQG Cát Tiên. Điều này cho thấy rằng, một cá thể Tê giác khác đã bị mất khỏi VQG Cát Tiên trong thời điểm đó và trước thời điểm bắt đầu chuyến khảo sát của WWF trong năm 2009. Xác của cá thể này không được tìm thấy.

Dữ liệu khảo sát thực địa còn cung cấp các bằng chứng khẳng định tất cả các mẫu đều của cùng một cá thể Tê giác, là cá thể chết đã được tìm thấy tại VQG Cát Tiên vào tháng 4/2010. Các nhóm đã khảo sát lặp lại các điểm thường xuyên lui tới của Tê giác như các hồ bùn, đầm lầy, suối trong suốt 6 tháng. Tất cả 22 mẫu phân đều thu được trong giai đoạn 4 tháng đầu của chuyến khảo sát và không tìm thấy thêm mẫu phân hay dấu chân sau thời điểm ngày 4 tháng 2/2010, mặc dù trước đó các thông tin này được ghi lại một cách thường xuyên. Mặc dù nghiên cứu bệnh học có thể giúp xác định chính xác thời điểm con vật chết (Streicher và cộng sự 2010), nhưng do không thu được mẫu da hoặc mô mềm do đã bị phân hủy, nên dựa trên cơ sở dữ liệu thực địa có thể đoán rằng cá thể tê giác cuối cùng đã chết vào khoảng từ cuối tháng 01 tới đầu tháng 2/2010.

Để đảm bảo không bỏ sót nếu Tê giác chỉ đơn thuần di chuyển ra ngoài khu vực lõi, các nhóm khảo sát đã mở rộng khu vực để tìm kiếm đường đi và dấu vết nhằm vào các điểm nóng, nhưng đã không tìm thấy dấu hiệu nào của Tê giác Java. Vào thời điểm đó, hầu hết các hồ bùn đầm lầy trong khu vực mở rộng khảo sát đang trong tình trạng khô cạn. Do Tê giác Java cần có các khu vực đầm lầy có nước, nên có vẻ như chúng không có khả năng sống trong vùng mở rộng vào mùa khô. Trước đó, Tê giác Java được ghi nhận là có xuất hiện trong khu vực này, nhưng không có thêm ghi nhận nào sau khi việc tiếp cận sông Đồng Nai bị hạn chế và rừng trên bờ bên kia sông đã bị chuyển đổi thành đất nông nghiệp. Hơn nữa, các thông tin không chính thức của người dân địa phương cho thấy quần thể Tê giác ở Cát Lộc hiếm khi rời khu vực phân bố lõi, chỉ có vài người xác nhận Tê giác ra khỏi vùng phân bố lõi từ năm 1999. Tê giác Java đã không được ghi nhận xuất hiện ngoài khu vực Cát Lộc kể từ hơn 20 năm qua; ít có khả năng Tê giác sinh sống tại các khu vực khác, vì hầu hết đất ở phía Bắc, Nam và Tây của Vườn Quốc gia đã bị chuyển đổi thành đất canh tác nông nghiệp và đô thị.

Vi vậy có thể khẳng định rằng cái chết của cá thể Tê giác Java vào năm 2010 đánh dấu sự tuyệt chủng của Tê giác Java ở Việt Nam và của **phân loài annamiticus**. Quần thể duy nhất còn lại trên thế giới là quần thể ở đảo Java, In-đô-nê-xi-a. Sự bảo vệ và mở rộng quần thể này cần được ưu tiên hàng đầu đối với loài động vật cực kỳ nguy cấp này.

Sự tuyệt chủng của loài Tê giác Java ở Việt Nam là một thất bại của công tác bảo tồn. Khi phân loài này được phát hiện trở lại vào năm 1988, quần thể được ước tính là từ 10-15 cá thể (có thể sự ước lượng này là hơi lớn), với một diện tích sinh cảnh phù hợp. Diện tích khu vực di chuyển của Tê giác Java được ước tính là không quá 500 ha đối với con cái và rộng hơn đối với con đực (van Strien và

cộng sự 2008). Cát Lộc không được coi là một sinh cảnh tối ưu cho loài này, và vì vậy diện tích khu vực di chuyển nói trên có thể là hơi thấp, tuy nhiên, 75.000 ha sinh cảnh của năm 1988 có thể đủ đối với một quần thể tương đối. Nếu Tê giác và sinh cảnh của chúng được bảo vệ, sự phục hồi quần thể có thể đã thay đổi theo như kiểu phục hồi quần thể ở Ấn Độ (*Rhinoceros unicornis*) và Nam Phi thông qua chương trình quản lý tập trung. Tê giác trắng miền Nam (*Ceratotherium simum simum*) đã đứng trên bờ tuyệt chủng vào cuối thế kỷ 19, với một quần thể nhỏ khoảng 20 cá thể. Tuy nhiên, hơn 10 năm sau, nhờ có sự nỗ lực bảo vệ và di chuyển các cá thể để thành lập các quần thể mới, số lượng Tê giác trắng phía Nam bây giờ gần 20.000 cá thể (IUCN 2010).

Trong năm 2009 và 2010, chỉ với một cá thể tê giác tồn tại ở VQG Cát Tiên, và đã bị săn bắn, nên đã quá trễ để thực hiện các chương trình quản lý quần thể tập trung để bảo tồn phân loài này. Các kết quả của nghiên cứu này cho thấy có ít nhất hai cá thể đã tồn tại trong giai đoạn từ 2003-2006 và không nghi ngờ gì, đã có hơn hai cá thể tồn tại trong giai đoạn trước đó, từ 1988 đến 2003. Bất kể kích thước quần thể lớn thế nào, kiến nghị của các nhóm bảo tồn từ năm 1998 về bảo vệ quần thể hiện có và tiến hành quản lý sinh cảnh tập trung vẫn có giá trị, nhưng lại chưa được tiến hành một cách đầy đủ ở VQG Cát Tiên. Các nỗ lực bảo tồn chưa đủ hiệu quả để ngăn cản sự tuyệt chủng của loài Tê giác Java ở Việt Nam; dưới đây chúng tôi sẽ thảo luận 02 động lực căn bản dẫn đến sự tuyệt chủng của phân loài này.

4.1 Săn bắn

Cái chết của cá thể Tê giác Java cuối cùng ở Việt Nam có lẽ là do bị bắn (Streicher và *cộng sự* 2010), cho thấy sự kém hiệu quả trong công tác bảo vệ tại VQG Cát Tiên. VQG Cát Tiên nhận được nhiều nguồn tài trợ với số lượng lớn cán bộ làm việc tại đây; về lý thuyết hệ thống bảo vệ ở đây phải là hợp chuẩn từ góc độ nhân sự. WWF và các tổ chức khác đã hỗ trợ xây dựng năng lực cho cán bộ của Vườn trong vấn đề thực thi pháp luật, và thiết lập một hệ thống giám sát tốt đối với loài Tê giác Java và các loài quan trọng khác.

Dự án Bảo tồn VQG Cát Tiên trước đây đã hỗ trợ đáng kể trong việc cải thiện công tác thực thi pháp luật, tuần tra, bao gồm một khóa đào tạo toàn diện đối với tất cả các cán bộ trong vườn vào năm 2003 để thực hiện công tác tuần tra một cách có hiệu quả hơn, một khóa đào tạo tương tự cũng được tổ chức lại vào năm 2004. Tư vấn tham gia đào tạo cho hai khóa này đã kết luận rằng mặc dù cán bộ vẫn còn nhớ các kiến thức học được từ khóa học trước, nhưng trên thực tế một số các kiến nghị đã không được thực hiện (chẳng hạn như tăng cường công tác tuần tra trên diện tích rộng hơn tại Cát Lộc). Sự thiếu năng lực quản lý thực thi pháp luật và thiếu phân công trách nhiệm cụ thể có lẽ đã cản trở tính hiệu quả trong công tác tuần tra bảo vệ ở VQG Cát Tiên (Havemann 2004).

WWF đã hỗ trợ công tác tuần tra thực thi pháp luật và giám sát ở Cát Lộc cho cán bộ của Vườn trong các năm 2005 và 2006 theo đề xuất của Dự án Bảo tồn VQG Cát Tiên, tuy nhiên mức độ tuần tra giảm khi Dự án Bảo tồn VQG Cát Tiên kết thúc. WWF lại một lần nữa nỗ lực bảo tồn loài Tê giác từ tháng 6/2009, hỗ trợ VQG Cát Tiên thực hiện tuần tra hàng tháng cho ba trạm bảo vệ trong vườn trong khu vực lõi phân bố Tê giác ở Cát Lộc. Phương pháp tuần tra đã được thống nhất với VQG Cát Tiên, hỗ trợ tài chính đã được thực hiện và kết quả giám sát tuần tra, được thực hiện qua tracklog từ máy định vị GPS, của mỗi lần tuần tra được gửi về cho WWF.

Tuy nhiên, việc tuần tra trong VQG Cát Tiên đã không được thực hiện theo như yêu cầu. Tracklog từ máy định vị GPS không được gửi về cho WWF hàng tháng, thường được gửi muộn sau vài tháng, làm cho công tác giám sát của dự án bị cản trở. Các thông tin dữ liệu nhận được cho thấy các đội tuần tra đã không đạt được mức độ tuần tra như mong muốn và không tuần tra đủ thời gian đòi hỏi tối thiểu và thậm chí có vài tháng không tuần tra (phụ lục 6). Đây là hậu quả của việc quản lý và giám sát thiếu hiệu quả của cán bộ quản lý Vườn đối với cán bộ tuần tra. Cán bộ tuần tra không phải chịu trách nhiệm gì về việc không duy trì tuần tra hoặc không bảo vệ được quần thể Tê giác Java. Cá thể Tê giác Java chết được người dân địa phương phát hiện chỉ sau đó vài tuần.

Những nỗ lực thực thi pháp luật thiếu hiệu quả trong giai đoạn 2009 – đầu năm 2010 tất nhiên không phải là nguyên nhân duy nhất dẫn tới sự suy giảm quần thể loài trong những năm vừa qua và gây ra sự tuyệt chủng của Tê giác tại Việt Nam, tuy nhiên, điều này cũng cho thấy những thách thức để đạt được mức độ bảo tồn cần thiết tại VQG Cát Tiên trong nhiều năm qua. Sự thiếu liên tục trong công tác bảo vệ loài Tê giác và các loài khác ở Cát Lộc, nơi áp lực săn bắn khá cao, cuối cùng đã dẫn đến sự tuyệt chủng của loài Tê giác Java tại Việt Nam. Đây không phải là vấn đề của riêng ở VQG Cát Tiên. Từ đây cho thấy, cần phải có các tiêu chuẩn tối thiểu (ví dụ như diện tích tuần tra, độ dài của tuyến tuần tra và tần suất tuần tra, vv.) áp dụng cho các Vườn quốc gia hay khu bảo tồn nơi có các loài có giá trị cao như Tê giác, hổ, voi, rùa biển sinh sống. Mức độ đe dọa cao đối với các loài sinh vật hoang dã tại Việt Nam đã không được các cơ quan chức trách về bảo tồn ứng phó một cách thích đáng.

4.2 Mất sinh cảnh

Từ khi loài tê giác được tái phát hiện ở Việt Nam vào năm 1988, vùng phân bố của loài này đã giảm đi một cách đáng kể từ khoảng 75.000 ha (bao gồm Nam Cát Tiên) vào năm 1988, xuống còn khoảng 6.500 ha ở Cát Lộc vào năm 2010. Một diện tích đáng kể của Cát Lộc đã bị tách ra khỏi VQG Cát Tiên sau đó được chuyển đổi thành đất canh tác nông nghiệp và đô thị. Mặc dù còn hơn 6.500 ha sinh cảnh ở Cát Lộc, quần thể Tê giác Java lại bị bó hẹp trong diện tích nhỏ này do các tác động của con người như sử dụng các đường mòn, phát triển khu dân cư và nông nghiệp xung quanh khu vực lõi phân bố tê giác.

Mục tiêu trước mắt của kế hoạch hành động quốc gia của Việt Nam về việc “Mở rộng sinh cảnh cho Tê giác lên tối thiểu là 15.000 ha trong vòng 5 năm và tương ứng tăng số lượng cá thể Tê giác trong giai đoạn 2000-2010” đã không đạt được (IUCN AsRSG 2000). Việc mở rộng canh tác nông nghiệp xung quanh và xâm phạm vào VQG Cát Tiên là một vấn đề đang diễn ra và chưa được giải quyết một cách hiệu quả. Mặc dù việc tái định cư của hai thôn trong khu vực lõi phân bố Tê giác ra ngoài VQG đã được thực hiện thành công giúp giảm áp lực và sự gây nhiễu cho loài tê giác, nhưng người dân vẫn tiếp tục thu hoạch điều ở khu vực này và vẫn còn hai thôn tiếp tục phụ thuộc vào Cát Lộc để khai thác tài nguyên thiên nhiên. Thêm vào đó, gần 200.000 người dân đang sống trong vùng đệm của Vườn, một số lượng lớn trong số này đã khai thác tài nguyên thiên nhiên từ Vườn ở mức độ nào đó (Polet và cộng sự 2003).

Mặc dù VQG Cát Tiên có kế hoạch mua lại một số diện tích trồng điều trong khu vực lõi phân bố Tê giác, ngân sách nhà nước chưa được phân bổ để Vườn có thể thực hiện được kế hoạch này. Việc lấn chiếm và mở rộng canh tác nông nghiệp vào khu vực lõi phân bố Tê giác và xung quanh VQG Cát Tiên khá phổ biến ở nhiều nơi với qui mô nhỏ (Phụ lục 5). Hiện tại việc lấn chiếm đất đai để canh tác nông nghiệp chỉ ở qui mô vài mét mỗi năm, để tránh bị VQG xử lý.

Trong bối cảnh thiếu sự quan tâm đúng mức để bảo vệ loài Tê giác Java và sinh cảnh của nó, tương lai lâu dài của Tê giác Java đã không thể theo hướng tích cực được kể cả khi quần thể vẫn tồn tại. Vài năm trước đây, đã có kiến nghị về việc kết nối Cát Lộc với Nam Cát Tiên (được cho là nơi có thể là sinh cảnh tốt hơn cho Tê giác Java) thông qua hành lang sinh cảnh, mở ra cơ hội thiết lập vùng sinh cảnh rộng rãi hơn cho Tê giác Java. Tuy nhiên, điều này đã không được thực hiện và sự mất sinh cảnh ở Cát Lộc là hậu quả của phát triển cơ sở hạ tầng, sự tác động gây xáo trộn của người dân và hoạt động canh tác nông nghiệp đã làm hạn chế sự phát triển quần thể Tê giác. Cần chú ý rằng, ở Ấn Độ, vườn Quốc gia Kaziranga có diện tích 42.900 ha (nhỏ hơn VQG Cát Tiên) và với mức độ bảo vệ khá chặt chẽ và chế độ quản lý hiệu quả, một quần thể Tê giác lớn nhất Ấn Độ với hơn 2.000 cá thể đã được duy trì hiệu quả.

4.3 Một vấn đề chung đối với các khu bảo tồn

Vấn đề thực thi pháp luật yếu trong các khu bảo tồn, dù là liên quan đến việc chống săn bắn hay mất sinh cảnh hay lấn chiếm đất khu bảo vệ không phải là vấn đề riêng của VQG Cát Tiên hay Việt Nam. Các báo cáo từ các tổ chức đang làm việc trong các khu bảo tồn trên toàn quốc cho thấy thực thi pháp luật chống săn bắn động thực vật hoang dã là một vấn đề lớn mang tính quốc gia đối với công tác bảo

tồn tại Việt Nam và việc cải thiện công tác bảo vệ và thực thi pháp luật là giải pháp quan trọng nhất đối với nguy cơ này (BirdLife in Indochina 2008, Lê Trọng Trãi và cộng sự 2008, Nadler và cộng sự 2003).

Số phận của Tê giác Java đã đặt ra một vấn đề lớn hơn; đó là nhiều loài khác cũng đang trên bờ tuyệt chủng ở Việt Nam, một số lượng lớn các loài là đặc hữu đối với Việt Nam và khu vực, sẽ có nguy cơ biến mất nếu hệ thống quản lý và bảo vệ khu bảo tồn không được cải thiện. Loài Hươu Vàng (*Axis porcinus*) gần như đã biến mất tại Việt Nam do mất sinh cảnh sống và mức độ săn bắn quá cao (Timmins và cộng sự 2008). Saola, một loài cực kỳ nguy cấp, có quần thể phân bố rời rạc và bị chia cắt, còn lại với số lượng không đến vài trăm cá thể. Sự suy giảm quần thể Saola phần lớn là do săn bắt và sau đó là mất sinh cảnh (Timmins và cộng sự 2008; Ming Hoang và cộng sự 2004). Vọc mũi hếch loài đặc hữu của Việt Nam, có khu vực sinh cảnh bị giảm đáng kể, chỉ còn lại ở một số khu vực thuộc miền Bắc Việt Nam. Người ta cho rằng còn khoảng 250 cá thể, chủ yếu là do nạn phá rừng và áp lực săn bắn (Lê Xuân Cảnh 2008), tình cảnh cũng tương tự cho nhiều loài linh trưởng ở Việt Nam. Các loài khác, đã chia sẻ sinh cảnh đầm lầy với Tê giác Java trong quá khứ đã bị tuyệt chủng hay sắp tuyệt chủng ở Việt Nam do sự mất sinh cảnh trên diện rộng (Wege và cộng sự 2000). Loài cò quắm cánh xanh, được coi là tuyệt chủng tại Việt Nam do không còn sinh sản tại Việt Nam (các cá thể hay các đàn nhỏ có thể di chuyển từ Campuchia sang) do sự mất sinh cảnh và săn bắn (Tổ chức BirdLife Quốc tế 2011). Cá sấu nước ngọt đã bị săn bắt đến tuyệt chủng tại Việt Nam nhưng đã được WWF tái phục hồi theo chương trình dự án vườn Quốc Gia Cát Tiên. Loài này đã sống sót ở Bàu Sấu, nơi duy nhất được bảo vệ nghiêm ngặt do có một trạm bảo vệ và một lượng lớn du khách đến đây góp phần vào công tác này.

Các loài có phân bố rộng hơn cũng đang suy giảm tại Việt Nam. Voi Châu Á đã bị suy giảm xuống thành các quần thể nhỏ và biệt lập ở miền Trung và miền Nam Việt Nam và bị đe dọa săn bắn (Choudhury và đồng sự 2008). Quần thể hổ ở Việt Nam được ước tính còn dưới 30 cá thể, là kết quả trực tiếp của việc săn bắn cho mục đích thương mại (Chundawat và cộng sự 2010). Bò tót được báo cáo là đang suy giảm mạnh mẽ ở Việt Nam (Duckworth và đồng sự 2008) và bò banteng cũng đang trong tình trạng tương tự, bị biến mất khỏi nhiều nơi mà trước đây chúng từng tồn tại (Timmins và đồng sự 2008).

Sự suy giảm các quần thể sinh vật hoang dã ở Việt Nam càng trở nên nghiêm trọng hơn nữa do nhu cầu về sử dụng sinh vật hoang dã trong buôn bán dược phẩm ở Việt Nam, Trung Quốc và các nơi khác ở Châu Á, cũng như buôn bán thịt thú rừng. Hiện tại với tốc độ tăng trưởng nhanh số người thuộc tầng lớp trung lưu và thượng lưu tại khu vực đô thị, việc tiêu thụ thịt thú rừng đang trở nên phổ biến trong xã hội (Wyler và Sheikh, 2008, TRAFFIC, 2007). Việt Nam cũng là nơi có lượng buôn bán sinh vật hoang dã lớn trong khu vực cũng như trên thế giới. Vì sinh vật ở Việt Nam đang bị suy giảm, người buôn bán phải đi xa hơn để tìm nguồn cung cấp các loài giá trị cao như Tê giác, hổ, rùa và trút để đáp ứng nhu cầu. Tê giác là loài có giá trị có lẽ cao nhất, giá sừng Tê giác có thể lên đến \$100,000/ kg. Trên khắp các nơi từ Châu Phi, và Châu Á, tất cả các loài Tê giác đang phải đối mặt với nạn săn bắn ngày càng tăng, nhằm để lấy sừng. Một số người bị bắt và nhiều trường hợp khác cho biết hầu hết các sừng, đặc biệt là từ Nam Phi được buôn lậu đến cho người mua ở Việt Nam.

Trong bối cảnh có nhiều áp lực lên Tê giác và các loài có giá trị thương mại khác, việc bảo vệ các loài này đòi hỏi phải được thực thi liên tục ở thực địa, chủ yếu tập trung vào các loài này để tránh sự tuyệt chủng loài. Mức độ tuần tra như ở VQG Cát Tiên rõ ràng là chưa đảm bảo để bảo vệ quần thể Tê giác và ngay cả khi thực hiện dự án Bảo tồn Đa dạng Sinh học VQG Cát Tiên tình hình đã được cải thiện. Các tiêu chuẩn của WWF hiện tại đề nghị tối thiểu phải tuần tra 16 ngày/tháng, và việc tuần tra trên diện tích rộng là rất quan trọng và một số chiến thuật tuần tra cần được sử dụng để chống lại các nguy cơ do thợ săn dùng súng, chó săn, bẫy gậy ra, tất cả các hình thức săn bắn này đều có ở Cát Lộc.

Cán bộ tuần tra ở VQG Cát Tiên đã được đào tạo về thực thi pháp luật trong dự án Bảo Tồn VQG Cát Tiên, tuy nhiên công tác quản lý và giám sát tuần tra chưa hiệu quả dẫn đến việc các công tác này không được thực hiện một cách phù hợp sau khi dự án kết thúc. Vấn đề tương tự vẫn tồn tại trong giai

đoạn 2009-2010 khi WWF hỗ trợ 21 ngày tuần tra trong mỗi tháng trong khu vực lõi Tê giác, nhưng việc thực hiện trên thực tế thấp hơn nhiều so với mong đợi (Phụ lục 6).

4.4 Vai trò của WWF và các tổ chức bảo tồn khác ở vườn Quốc gia Cát Tiên

Trong điều kiện sau khóa đào tạo về tư vấn pháp luật, hoạt động thực thi pháp luật tại VQG Cát Tiên vẫn không đạt chuẩn và WWF đặt vấn đề bảo vệ quần thể Tê giác là ưu tiên, có lẽ hơi sớm để WWF quyết định không tiếp tục sự hiện diện của mình cho đến khi kết thúc dự án Bảo tồn VQG Cát Tiên. Mặc dù vẫn duy trì những hỗ trợ nhỏ về tài chính trong giai đoạn 2005-2006 để tiếp tục thực thi pháp luật và tuần tra bảo vệ Tê giác, thiếu sự giám sát của WWF, công tác thực thi và tuần tra giám sát được thực hiện ở mức độ thấp hơn so với thời gian thực hiện dự án Bảo tồn VQG Cát Tiên. Khi WWF có mặt tại hiện trường để khảo sát Tê giác giai đoạn 2009-2010, sự quan tâm của cán bộ VQG Cát Tiên đối với những đề xuất của WWF về kỹ thuật tuần tra và thực thi có phần hạn chế. Nếu WWF duy trì sự tham gia về mặt tham vấn kỹ thuật như trong suốt thập kỷ trước tại hiện trường thì công tác tuần tra ở Cát Lộc có lẽ đã tốt hơn.

Hơn nữa, việc không thiết lập được một tiểu đơn vị chuyên trách về bảo tồn Tê giác ở Cát Lộc có lẽ đã dẫn đến sự lỏng lẻo trong công tác quản lý, so với Nam Cát Tiên nơi có trụ sở BQL vườn. Việc thực hiện công tác của cán bộ tuần tra ở Cát Lộc không được sự kiểm soát và quản lý chặt chẽ từ trụ sở và vì vậy việc tuần tra không được khuyến khích; họ không được giám sát theo dõi và không bị qui trách nhiệm khi không thực hiện nhiệm vụ tốt. WWF và VQG Cát Tiên lẽ ra cần hợp tác với nhau để thiết lập đơn vị quản lý tại Cát Lộc, với một thành viên từ WWF thường xuyên ở đây để hỗ trợ về kỹ thuật và quản lý, giám sát thực hiện hoạt động.

Nếu thành lập được tiểu đơn vị quản lý ở Cát Lộc, có lẽ công tác bảo tồn đã có được những hỗ trợ kịp thời từ tỉnh Lâm Đồng, là một tỉnh khá quan trọng đối với các hành động về bảo tồn thí dụ như vấn đề về tái định cư cho người dân. Vùng Cát Lộc thuộc Lâm Đồng và vì vậy thuộc trách nhiệm quản lý của tỉnh nhưng VQG Cát Tiên lại thuộc quyền hạn pháp lý của tỉnh Đồng Nai. Sự phối hợp thiếu chặt chẽ và sự khác biệt về ưu tiên giữa hai tỉnh có thể đã ảnh hưởng đến việc thực hiện các hoạt động bảo tồn loài Tê giác Java.

5. KẾT LUẬN

Việt Nam đang phải đối mặt với thảm họa về tuyệt chủng các loài sinh vật hoang dã do việc thiếu kiểm soát hiệu quả đối với vấn đề buôn bán động vật hoang dã và sự phổ biến các hình thức săn bắt trộm phi pháp. Công tác quản lý các khu bảo tồn và các nỗ lực về bảo tồn không đủ để đáp ứng những nguy cơ hiện tại. Sự tuyệt chủng của loài Tê giác Java ở Việt Nam là hậu quả trực tiếp của việc bảo vệ và quản lý không hiệu quả khu bảo tồn từ tất cả các bên liên quan về công tác bảo tồn loài này.

Sự tuyệt chủng của loài này là hậu quả của các thiếu hụt, đồng thời cũng là các thách thức đối với ngành bảo tồn Việt Nam. Thiếu sự hỗ trợ từ phía chính quyền để đảm bảo duy trì sinh cảnh phù hợp, chống nạn xâm lấn, và bảo vệ quần thể Tê giác còn lại khỏi sự săn bắn trộm. Mặc dù VQG Cát Tiên đã nhận được nguồn hỗ trợ ngân sách đáng kể, nhưng cũng như các VQG khác tại Việt Nam, phần lớn đầu tư từ ngân sách nhà nước được dùng để phát triển cơ sở hạ tầng mà ít tập trung giải quyết các vấn đề có liên quan trực tiếp đến nguy cơ đối với bảo tồn. Hơn nữa, việc phân bổ trách nhiệm trong việc bảo tồn loài đối với kiểm lâm viên, lãnh đạo kiểm lâm và lãnh đạo VQG chưa rõ ràng làm cho việc bảo vệ các loài trong các khu bảo tồn ở Việt Nam hiện tại chưa hiệu quả.

Các tổ chức quốc tế đã đầu tư đáng kể vào VQG Cát Tiên nhằm cố gắng giải quyết các vấn đề nêu trên với Tê giác Java, được coi là loài biểu tượng trong nhiều dự án bảo tồn. Tuy nhiên, như trình bày trong báo cáo này, các nỗ lực đó cuối cùng cũng thất bại. Sự thất bại đối với việc bảo tồn loài Tê giác Java này cần được xem như một lời cảnh báo rằng những đầu tư tương tự như vậy đối với các khu bảo tồn

tại Việt Nam thường là không có hiệu quả trong bối cảnh trách nhiệm giải trình và trách nhiệm quản lý đối với các hoạt động bảo tồn còn chưa rõ ràng.

Với nhu cầu tăng nhanh về động vật hoang dã và các sản phẩm từ động vật hoang dã, cùng với sự phức tạp trong diễn biến của các hoạt động săn bắn và buôn bán sinh vật, việc bảo tồn các loài sinh vật và sinh cảnh của chúng ở cấp độ hiện trường cần được ưu tiên cải thiện nhanh. Để đảm bảo các hoạt động bảo tồn loài có hiệu quả trong các trường hợp có sự tham gia hỗ trợ của các tổ chức quốc tế hoặc các tổ chức phi chính phủ, cần làm rõ vai trò và trách nhiệm giải trình của từng bên. Và bất kể có sự hỗ trợ quốc tế hay không, các đầu tư về bảo tồn trong các khu bảo tồn cần phải tập trung vào việc thực thi hiệu quả pháp luật chống săn bắn và buôn bán bất hợp pháp động vật hoang dã. Nếu những điều này không được đảm bảo thì nhiều khả năng các loài sinh vật hoang dã khác ở Việt Nam cũng sẽ cùng chung số phận với Tê giác Java.

Đặc biệt, nhằm nâng cao chất lượng bảo tồn và thực thi pháp luật tại tất cả các khu bảo tồn ở Việt Nam, đặc biệt những khu bảo tồn là nơi trú ngụ của những loài đang bị đe dọa một cách nghiêm trọng, WWF kiến nghị những thay đổi sau:

- 1. Gia tăng số lượng kiểm lâm viên, đã qua đào tạo, tuần tra tại tất cả các khu bảo tồn;
- 2. Gia tăng hoặc phân bổ lại nguồn ngân sách để đảm bảo các hoạt động tuần tra có hiệu quả;
- 3. Áp dụng hệ thống MIST tiêu chuẩn quốc tế về tuần tra thực thi pháp luật; giám sát và quản lý tại tất cả các khu bảo tồn;
- 4. Thiết lập một hệ thống quốc gia về quản lý khu bảo tồn chịu trách nhiệm quản lý và giám sát hiệu năng của cán bộ bảo tồn.

6. TÀI LIỆU THAM KHẢO

AsRSG (Nhóm Chuyên Gia Tê giác Châu Á) (2000). Kế hoạch hành động bảo tồn Tê giác Java ở vườn Quốc gia Cát Tiên 2000/2010, Việt Nam. IUCN, Gland, Thụy Sĩ.

BirdLife Đông dương (2008) *Mạng lưới buôn bán động vật hoang dã bất hợp pháp xung quanh Khu Bảo tồn Thiên nhiên Bắc Hướng Hóa, tỉnh Quảng Trị, Việt Nam*. Báo cáo kỹ thuật số 36. Tổ chức BirdLife Quốc tế, Chương Trình Việt Nam, Hà Nội, Việt Nam.

Tổ chức BirdLife Quốc tế (2011) Sách đỏ IUCN về các loài chim. Download tại <http://www.birdlife.org> ngày 12/04/2011.

Borthakur .U., B.M. Talukdar, & B Goossens. 2010. Giám sát gen quần thể Tê giác Ấn Độ (*Rhinoceros unicornis*) tại Assam. Đánh giá về đa dạng gen và phân biệt quần thể qua lấy mẫu không xâm lấn. Báo cáo năm thứ nhất cho IRF.

Choudhury, A., LahiriChoudhury, D.K., Desai, A., Duckworth, J.W., Easa, P.S., Johnsingh, A.J.T., Fernando, P., Hedges, S., Gunawardena, M., Kurt, F., Karanth, U., Lister, A., Menon, V., Riddle, H., Rübel, A. & Wikramanayake, E. 2008. *Elephas maximus*. In: IUCN 2010. Danh sách của IUCN về các loài bị đe dọa. Phiên bản 2010.4. <www.iucnredlist.org>. Tải về ngày 12 tháng 4 năm 2011.

Duckworth, J.W., Steinmetz, R., Timmins, R.J., Pattanavibool, A., Than Zaw, Đỗ Tước & Hedges, S. 2008. *Bos gaurus*. Trong: IUCN 2010. Danh sách của IUCN về các loài bị đe dọa. Phiên bản 2010.4. <www.iucnredlist.org>. Tải về ngày 12 tháng 4 năm 2011.

Fernando, P., Polet, G., Foad, N., Ng, L.S., Pastorini, J. và Melnick, D.J.2006. Đa dạng gen, sự phát sinh loài và bảo tồn Tê giác Java (*Rhinoceros sondaicus*). Di truyền bảo tồn 7 (3) 439-448.

Havemann, P. (2004). Khóa đào tạo lại về Tuần tra và Giám sát, Vườn Quốc gia Cát Tiên, Việt Nam. Báo cáo số 53, Dự án Bảo tồn vườn Quốc Gia Cát Tiên, WWF Việt Nam, Hà Nội.

Hedges, S. và Lawson, D. (2006). Tiêu chuẩn khảo sát lấy mẫu phân cho chương trình MIKE. Giám sát việc săn bắn Voi trái phép.

IUCN SSC Nhóm chuyên gia bảo tồn Tê giác Châu Phi 2008. *Ceratotherium simum*. Trong: IUCN 2010. Sách đỏ IUCN về các loài bị đe dọa. Phiên bản 2010.4. <www.iucnredlist.org>. Tải về ngày 12 tháng 4 năm 2011.

Lê Trọng Trai, Mahood, S. P., Lương Hữu Thanh và Mai Đức Vinh. (2008). Mạng lưới buôn bán gỗ và động vật hoang dã trái phép xung quanh Vườn Quốc gia Chu Yang Sin, tỉnh Đắk Lắk, Việt Nam. Tổ chức BirdLife Quốc tế, Chương trình Việt Nam, Hà Nội, Việt Nam.

Ley, R. E., M. Hamady, C. Lozupone, P. Turnbaugh, R. Ramey, J. Bircher, M. Schlegel, T. Tucker, M. Schrenzel, R. Knight & J. Gordon. 2008. Science. Tiến hóa của động vật có vú và vi trùng ruột; 1647 - 1651.

Minh Hoàng, Long, B. và Hardcastle, J. (2004). Bảo tồn Saola tại Quảng Nam. Báo cáo dự án Mosaic của WWF.

Nadler, T., Momberg, F., Nguyễn Xuân Đăng và Lormee, N. (2003). Tổng quan hiện trạng bảo tồn linh trưởng tại Việt Nam 2002, phần 2: Loài khỉ lá. Tổ chức Fauna and Flora Quốc tế-Chương trình Việt Nam và Hiệp hội Động vật Frankfurt, Hà Nội, Việt Nam.

Nguyễn Xuân Đăng, Đỗ Hữu Thu và Osborn, T. (2004). Đánh giá Đa dạng Sinh học và Kinh tế Xã hội cho Lâm trường Dạ Tễ, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam. Dự án bảo tồn Đa dạng Sinh học Vườn Quốc gia Cát Tiên, WWF-Việt Nam, Hà Nội.

Nguyễn Xuân Đăng và Osborn, T. (2004). Đánh giá Đa dạng Sinh học và Kinh tế Xã hội cho Lâm trường Bảo Lâm, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam. Dự án Bảo tồn Đa dạng Sinh học Vườn Quốc gia Cát Tiên, WWF-Việt Nam, Hà Nội..

Nguyễn Xuân Đăng và Osborn, T. (2004). Đánh giá đa dạng sinh học và kinh tế xã hội cho lâm trường Trung Nghĩa, tỉnh Bình Phước, Việt Nam. Dự án bảo tồn đa dạng sinh học vườn Quốc gia Cát Tiên, WWF Chương trình Việt Nam, Hà Nội.

Peppin L., R. McEwing, R. Ogden, R. Hermes, C. Harper, A. Guthrie & G. R. Carvalho. (2009). Xác định giới với mức phân tử cho Tê giác Châu Phi. Di truyền Bảo tồn. 11 (3) 1181-1184.

Polet, G., Trần Văn Mùi, Nguyễn Xuân Đăng, Bùi Hữu Mạnh và Mike Baltzer (1999): Tê giác Java, *Rhinoceros sondaicus annamiticus*, tại Vườn Quốc gia Cát Tiên, Việt Nam: Hiện trạng và Kiến nghị Quản lý, Pachyderm (1999) no. 27, p. 34-48.

Polet, G., Đỗ Văn Đạt và Nguyễn Văn Châu. (2003). Đánh giá và giám sát cộng đồng sống trong vùng đệm Vườn Quốc gia Cát Tiên – Việt Nam, 1992-2002. Báo cáo số 45 của Dự án Bảo tồn Đa dạng Sinh học Vườn Quốc gia Cát Tiên.

Polet, G. và Ling, S. 2004. Bảo tồn Đa dạng Động vật có vú: cơ hội và khó khăn đối với vấn đề quản lý bảo tồn thực tế tại Vườn Quốc gia Cát Tiên, Việt Nam. Oryx 38 (2), 1-11.

Rolland, R. M., Hamilton, P.K., Kraus, S.D., Davenport, B., Gillett, R.M. và Wasser, S. K. 2006. Lấy mẫu phân bằng phương pháp sử dụng chó đánh mùi để nghiên cứu sức sinh sản và sức khỏe của cá voi ở Bắc Atlantic (*Eubalaena glacialis*). Tạp chí Cetacean Research Management 8 (2): 121-125.

Santiapillai, C. Phạm Mộng Giao, và Vũ Văn Dũng. (1993). Bảo tồn và Quản lý Tê giác Java (*Rhinoceros sondaicus annamiticus*) tại Việt Nam. PP 248-256 trong Sinh học và Bảo tồn Tê giác: Tài liệu hội nghị quốc tế, San Diego, U.S.A.

Schaller, G., B., Nguyễn Xuân Đăng, Lê Đình Thụy, Võ Thanh Sơn. (1990). Tê giác Java ở Việt Nam. *Oryx*, 24:2

Smith, D.A., Ralls, K., Hurt, A., Adams, B., Parker, M., Davenport, B., Smith, M.C. và Maldonado, J.E. 2003. Mức độ chính xác trong việc sử dụng chó đánh mùi để tìm phân từ cáo San Joaquin (*Vulpes macrotis mutica*). *Bảo tồn Động vật* 6; 339-346.

Stoops, M. 2009. Xác định giới tính sớm cho Tê giác thông qua xác định gen con đực trong dịch huyết thanh mẹ. Tổng quan năm 2009. Trung tâm Bảo tồn và Nghiên cứu Sinh vật Hoang dã bị đe dọa. Vườn động thực vật Cincinnati.

Streicher, U., Newcomer, E., McCarty, D., Brook, S. và Bạch Thanh Hải. (2010). Báo cáo Khám nghiệm xác cá thể tê giác, Vườn Quốc gia Cát Tiên, Việt Nam. WWF-Việt Nam, Hà Nội, Việt Nam.

Timmins, R.J., Duckworth, J.W., Hedges, S., Steinmetz, R. & Pattanavibool, A. 2008. *Bos javanicus*. Trong: IUCN 2010. Danh sách đỏ IUCN các loài bị đe dọa. Phiên bản 2010.4. <www.iucnredlist.org>. Tải về ngày 12 tháng 4 năm 2011.

Timmins, R.J., Duckworth, J.W., Samba Kumar, N., Anwarul Islam, Md., Sagar Baral, H., Long, B. & Maxwell, A. 2008. *Axis porcinus*. trong: Danh sách đỏ IUCN các loài bị đe dọa 2010. Phiên bản 2010.4. <www.iucnredlist.org>. Tải về ngày 12 tháng 4 năm 2011.

Timmins, R.J., Robichaud, W.G., Long, B., Hedges, S., Steinmetz, R., Abramov, A., Đỗ Tước & Mallon, D.P. 2008. *Pseudoryx nghetinhensis*. trong: IUCN 2010. Danh sách đỏ IUCN các loài bị đe dọa. Phiên bản 2010.4. <www.iucnredlist.org>. Tải về ngày 12 tháng 4 năm 2011.

Dự án Thay đổi hành vi tiêu thụ các sản phẩm động vật hoang dã tại Hà Nội, Việt Nam, 2007. TRAFFIC Đông Nam Á, Chương trình Greater Mekong, Hà Nội, Việt Nam.

Van Coeverden de Groot, P. J. (2011). Ước đoán về quần thể và tỷ lệ giới của Tê giác Java bằng mẫu phân và tối ưu hóa gen và giới tính của Tê giác Sumatran: trên cơ sở các tiến bộ gần đây. Đại học Queen, Báo cuối cùng năm thứ nhất cho IRF, 2009-2010.

Van Strien, N.J., Steinmetz, R., Manullang, B., Sectionov, Han, K.H., Isnan, W., Rookmaaker, K., Sumardja, E., Khan, M.K.M. & Ellis, S. 2008. *Rhinoceros sondaicus*. Trong: IUCN 2010. Danh sách đỏ các loài bị đe dọa của IUCN. Phiên bản 2010.3. <www.iucnredlist.org>. Tải về ngày 26 tháng 10 năm 2010.

Vương Duy Lập, Phan Quốc Vinh, Lại Văn Kiệt, Lê Văn Tân và David Murphy (2004). Giám sát Tê giác Tê giác Java trong Vườn Quốc gia Cát Tiên, Việt Nam. Dự án bảo tồn vườn Quốc gia Cát Tiên, báo cáo kỹ thuật số 8.

Wasser, S., Davenport, B., Ramage, E.R., Hunt, K.E., Parker, M., Clarke, C. và Stenhouse, G. (2004). Chó phát hiện phân trong nghiên cứu và quản lý động vật hoang dã: áp dụng cho gấu xám Bắc Mỹ và Gấu đen tại hệ sinh thái Yellowhead, Alberta, Canada. *Can. J. Zool.* 82: 475–492.

Wege, D.C., Long, A.J., Mai Kỳ Vinh, Vũ Văn Dũng & Eames, J.C. 1999. Mở rộng hệ thống khu bảo vệ tại Việt Nam trong thế kỷ 21: phân tích hệ thống hiện tại và kiến nghị mở rộng hợp lý. Hà Nội, Việt Nam: Tổ chức Birdlife Quốc tế, Chương trình Việt Nam.

Xuân Cảnh, L., Khắc Quyết, L., Thanh Hải, D. & Boonratana, R. 2008. *Rhinopithecus avunculus*.
Trong: IUCN 2010. Danh sách đỏ IUCN các loài bị đe dọa. Phiên bản 2010.4. <www.iucnredlist.org>.
Tải về ngày 12 tháng 4 năm 2011.

Phụ lục 1. Tên ổ gen, dạng lắp được khuếch đại, mỗi xuôi và mỗi ngược, nhiệt độ nguội [Tm].

Dù mỗi có nhãn không phát quang ở đầu 3' của mỗi chuyển tiếp – có nhãn – hoặc phải có một đuôi không phát quang thêm vào PCR - có đuôi – thêm 19bp vào sản phẩm. Db44 và SR 262 thể hiện tốt nhất khi kết hợp với phản ứng đa thành phần. Các chu kỳ PCR và hỗn hợp được thể hiện tương ứng trong phụ lục 2 và 3. (1 = Brown & Houlden 1999. 2 = Cunningham và cộng sự 1999. 3 = Scott, Van Coeverden de Groot & Boag unpublished. 4 = Scott và cộng sự. 2004. 5 = Florescu và cộng sự. 2003).

Phụ lục 2. Hai chu kỳ PCR để khuếch đại DNA vi vệ tinh từ mẫu phân Tê giác Java sử dụng máy Biomtra T-Gradient.

Nhiệt độ nguội 58 ⁰ C	Touch Up PCR
Lid – 110°C	Lid- 110
94°C – 5 phút	94°C - 5 phút
94°C – 20 giây	94°C - 20 giây
58°C – 30 giây	50°C đến 58°C - 30 giây
72°C – 30 giây	72°C - 40 giây
72°C – 10 phút	Lặp lại 16 lần tăng 0.5°C mỗi chu kỳ
35 chu kỳ	94°C – 20 giây
	58°C – 30 giây
	72°C – 30 giây
	72°C – 7 phút
	24 Thêm chu kỳ ở nhiệt độ 58°C

Phụ lục 3. Các thành phần của một PCR điển hình được dùng trong nghiên cứu này:

1.2 μ L DNA

7.9 μ L dH₂O

1 μ L 10x đệm PCR (nồng độ cuối cùng của 1x)

0.015 μ L dNTP's (nồng độ cuối cùng của 0.15mM)

0.015 μ L của mỗi môi xuôi và môi ngược (nồng độ cuối cùng của 0.15 μ M)

0.25U của Taq

0.2 μ L M13 Tag

Phụ lục 4. Ảnh khảo sát Tê giác Java

Rừng đầm lầy

Bãi đầm

Bãi đầm

Rừng nửa rụng lá



Suối bao phủ bởi rừng tre

Rừng trên đông núi, sườn đồi có cây mây và bãi đầm.



Lấy mẫu phân



Chó đánh mùi Chevy với mẫu phân của Tê giác



chân của Tê giác Java



Dấu



Bộ xương của Tê giác Java



Sọ của Tê giác Java, sừng đã bị lấy đi

Phụ lục 5. Ảnh về các nguy cơ đối với Cát Lộc và quần thể Tê giác Java



Đội khảo sát đã tháo dỡ nhiều bẫy, gồm cả bẫy thú lớn (ông Bạch Thanh Hải đang gỡ).



Bẫy (trong rổ) bán ở chợ gần đó.

Đội khảo sát đốt hủy lán trại thợ săn.



Chuyển đổi đất rừng sang đất nông nghiệp trái phép trong khu vực lõi ở Cát Lộc.



Chuyển đổi đất rừng trái phép.



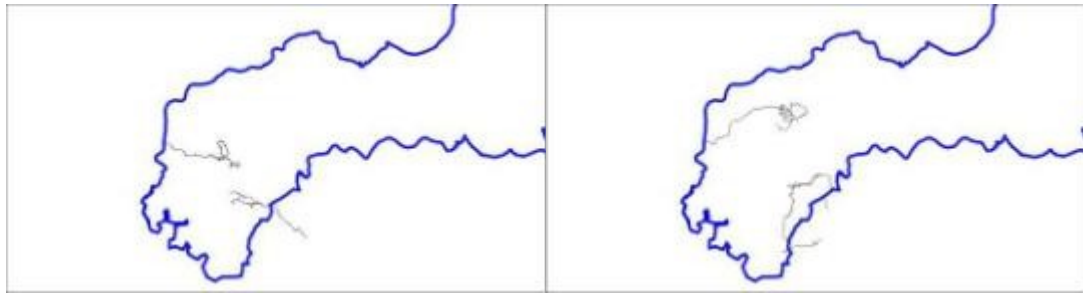
Mất rừng do canh tác nông nghiệp và phát triển hạ tầng (đường mới)

Phụ lục 6. Bản đồ tuần tra ở Cát Lộc do Kiểm Lâm, vườn Quốc gia Cát Tiên thực hiện.



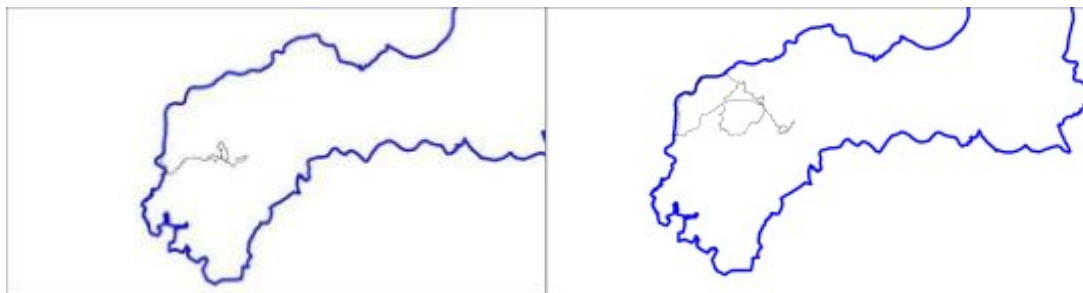
Tháng Bảy 2009

Tháng Tám 2009



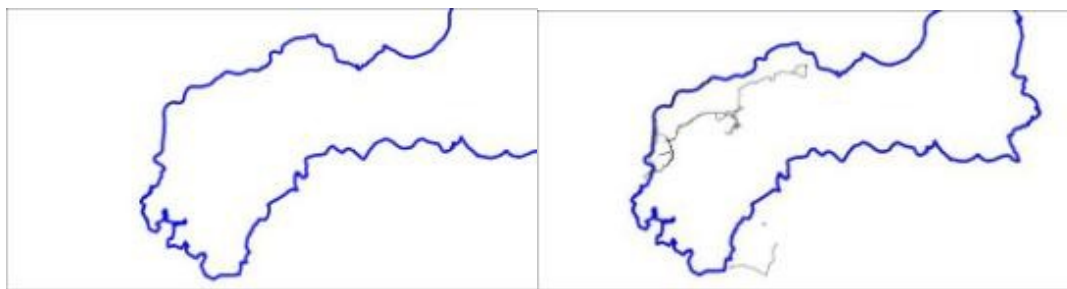
Tháng Chín 2009

Tháng Mười 2009



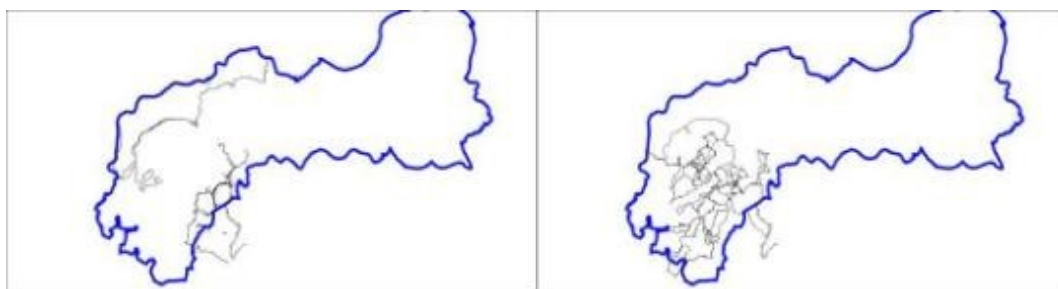
Tháng Mười Một 2009

Tháng Mười Hai 2009 (tuyến xe mô tô)



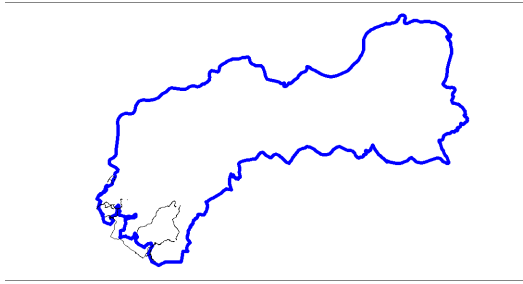
Tháng Một 2010

Tháng Hai 2010 (tuyến xe máy không nằm trong khu vực lõi)

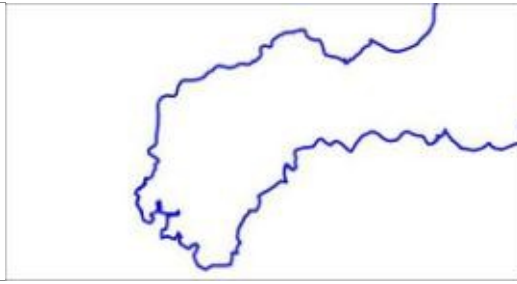


Tháng Ba 2010 (một vài tuyến xe máy)

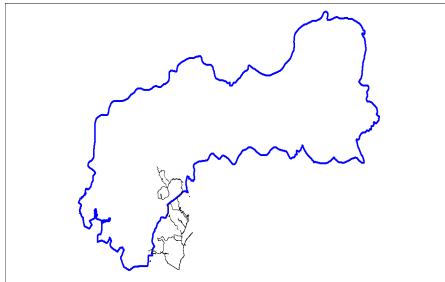
Tháng Tư 2010 (WWF được sự giám sát của WWF)



Tháng Năm 2010



Tháng Sáu 2010



Tháng Bảy 2010