

体表擦拭取样在两栖动物保护遗传学研究中的应用

艾永斌¹, 杨旭升^{2,3}, 彭卫华¹, 陈云梅¹, 徐凉燕¹, 罗剑¹, 夏云², 曾晓茂^{2*}

(1. 四川申果庄省级大熊猫自然保护区管理处, 四川越西 616650; 2. 中国科学院成都生物研究所, 成都 610041;
3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 相比于其他取样方法, 非损伤性取样对动物的伤害可以降到最低, 因而在动物保护研究中有着重要的价值。在两栖类中通过体表擦拭进行非损伤性取样的方法已有报道, 但是相关研究仅局限于零星物种, 且均是在实验室环境下完成取样, 并不适用于野外就地取样。本研究对四川申果庄省级大熊猫自然保护区内有尾两栖类及无尾两栖类 6 科 10 属 11 种进行了就地擦拭取样。线粒体基因序列分析表明, 体表擦拭取样法获得的 DNA 能满足常规的分子生物学实验要求, 可用于水生、陆栖等各种两栖动物类群, 可在两栖类保护遗传学研究中广泛应用。

关键词: 体表擦拭取样; 两栖类; 保护遗传学

中图分类号: Q959.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-7083(2018)04-0373-08

The Application of Extracting DNA from Skin Swabbing in Amphibians

AI Yongbin¹, YANG Xusheng^{2,3}, PENG Weihua¹, CHEN Yunmei¹, XU Liangyan¹,

LUO Jian¹, XIA Yun², ZENG Xiaomao^{2*}

(1. Administrative Office of Shengguozhuang Provincial Giant Panda Nature Reserve, Yuexi, Sichuan Province 616650, China;
2. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China;
3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Compared to other sampling methods, non-invasive sampling can minimize the damage to animals, so it has important value for animal protection. There is only a few reports on skin swabbing in a limited number of amphibian species, and the sampling methods are all performed in laboratory environment and are not suitable for application in the wild fields. In this study, Shengguozhuang Provincial Giant Panda Nature Reserve in Sichuan was selected as the research area. The skin swabbing method was used on wild populations of 11 amphibian species to test DNA yields and quality. Finally, the DNA was successfully obtained and multiple of genetic markers were amplified. Based on PCR performance, DNA yields and sampling considerations, the method of skin swab sampling was confirmed to work well to obtain DNA without harming the amphibian. Therefore, skin swabbing is a reliable method for obtaining genetic data from endangered amphibian without jeopardizing their survival.

Keywords: skin swab sampling; amphibian; conservation genetics

在两栖动物遗传学和分子生物学的相关研究中, 为了获取 DNA, 常常需要获得动物的组织样品。早期研究往往采取损伤性取样, 即处死动物后获取

样品。随着人们保护意识的提高, 非损伤性取样即非损伤性基因取样得到广泛应用, 包括剪趾法、活体组织检查和针刺取血等方法 (Maddock *et al.*, 2014)。

收稿日期: 2017-09-23 接受日期: 2018-04-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (NSFC31572241); “环境保护部生物多样性专项” 支持项目

作者简介: 艾永斌, 男, 林业工程师, 研究方向为野生动物与自然保护区管理, E-mail: 352278596@qq.com

* 通信作者 Corresponding author, E-mail: zengxm@cib.ac.cn

相比之下,非损伤性取样既可以满足生物学研究的要求,也在一定程度上保护了物种的生存和繁殖。

在非损伤性取样方法中,剪趾法对两栖动物伤害最大,主要是因为两栖动物适应水陆两栖的生活,栖息环境中存在大量病菌,皮肤作为免疫防御机制对于两栖动物抵御病菌至关重要,因此,剪趾或者剪尾易导致两栖动物死亡。Parris 等(2010)在 3 种无尾类中比较了口腔取样、剪趾取样、蝌蚪剪尾取样对动物的伤害程度,发现剪趾法对动物伤害最大,在实验室饲养,同时用消炎药处理伤口的前提下,非损伤性取样后西方蟾蜍 *Bufo boreas* 的死亡率为 0.35%。此外,在野外两栖动物的监测项目中,通常会采用剪趾法作标志重捕,而剪趾会影响动物的存活率和重捕率,进而影响对整个种群数量的评估(McCarthy *et al.*, 2009; 吴军等, 2013)。

目前报道的用于两栖动物的非损伤性取样方法有口腔擦拭取样和体表皮肤擦拭取样: Poschadel 和 Möller(2004)描述了在陆龟科 Testudinidae、蛙科 Ranidae、蝾螈科 Salamandridae、蟾蜍科 Bufonidae 动物中通用的口腔取样方法,即用 1 个小勺子轻轻打开动物口腔,然后用棉签沾取口腔内的黏液; Broquet 等(2007)在高山欧螈 *Triturus alpestris* 和无斑雨蛙 *Hyla arborea* 中验证了口腔擦拭得到的 DNA 样品可以用于微卫星分型研究; Mendoza 等(2012)在卵齿蟾 *Eleutherodactylus johnstonei* 中用棉签擦拭表皮来获取 DNA 样品,并用 16S rRNA 做了分析; Guo 等(2013)通过电极刺激中国大鲵 *Andrias davidianus* 的体表,收集皮肤黏液和皮肤脱落物作为组织样品; Maddock 等(2014)在蚓螈目 Gymnophiona 5 个物种中尝试了口腔擦拭、皮肤擦拭取样,均成功获取 DNA。

迄今,采用口腔擦拭取样在两栖动物中应用较多,但此法受动物个体限制,小型个体或幼体不易操作。相对而言,体表皮肤擦拭取样应用更广泛,不受发育期的限制,适用于成体、幼体或蝌蚪期任一发育阶段。但已知的皮肤擦拭取样的研究局限于个别物种,能否普及到各类群尚不得知;另一方面,已知的取样方法多为在实验室对活体的操作,不适用于野外就地取样。基于此,本研究通过比较分析,尝试野外就地体表擦拭取样、野外就地干燥保存、DNA 高效提取等方法,对四川申果庄省级大熊猫自然保护区内的有尾两栖类及无尾两栖类 6 科 10 属 11 种进

行研究,以期验证体表擦拭取样在野外工作中的可行性。

1 材料和方法

1.1 实验材料

2017 年 4 月和 6 月对四川申果庄省级大熊猫自然保护区(102°42'00" ~ 102°54'17"E, 28°28'13" ~ 28°41'54"N)内的有尾类及无尾类就地随机取样,共计 6 科 10 属 11 种,采样信息见表 1。

表 1 四川申果庄省级大熊猫自然保护区物种采样信息
Table 1 Information of samples collected from Shenguo Zhuang Provincial Giant Panda Nature Reserve, Sichuan

物种 Species	采集时间 Collecting date	数量 Number/只
I 无尾目 Anura		
一角蟾科 Megophryidae		
(一) 齿蟾属 Oreolalax		
1. 无蹼齿蟾 <i>Oreolalax schmidti</i>	2017 年 4、6 月	9
2. 疣刺齿蟾 <i>Oreolalax rugosus</i>	2017 年 4 月	5
(二) 齿突蟾属 Scutiger		
3. 圆疣猫眼蟾 <i>Scutiger tuberculatus</i>	2017 年 6 月	1
(三) 角蟾属 Megophrys		
4. 沙坪角蟾 <i>Megophrys shapingensis</i>	2017 年 6 月	3
二蛙科 Ranidae		
(四) 湍蛙属 Amolops		
5. 棕点湍蛙 <i>Amolops loloensis</i>	2017 年 6 月	3
(五) 林蛙属 Rana		
6. 昭觉林蛙 <i>Rana chiaoensis</i>	2017 年 6 月	2
三树蛙科 Rhacophoridae		
(六) 树蛙属 Rhacophorus		
7. 宝兴树蛙 <i>Rhacophorus dugritei</i>	2017 年 6 月	2
四铃蟾科 Bombinatoridae		
(七) 铃蟾属 Bombina		
8. 大蹼铃蟾 <i>Bombina maxima</i>	2017 年 6 月	3
五蟾蜍科 Bufonidae		
(八) 蟾蜍属 Bufo		
9. 中华蟾蜍华西亚种 <i>Bufo gargarizans andreusii</i>	2017 年 4 月	2
II 有尾目 Urodela		
六小鲵科 Hynobiidae		
(九) 拟小鲵属 Pseudohynobius		
10. 普雄原鲵 <i>Pseudohynobius puxiongensis</i>	2017 年 4 月	1
(十) 山溪鲵属 Batrachuperus		
11. 山溪鲵 <i>Batrachuperus pinchonii</i>	2017 年 4 月	3

注:物种分类系统按费梁等(2009)和 Frost(2017)

Note: The classification follows Fei *et al.*, 2009 and Frost, 2017

1.2 取样方法

体表擦拭、口腔擦拭、剪趾 3 种取样方式获取动物 DNA 样本。同一动物个体除剪趾取 1 个样本外, 体表及口腔擦拭样本取 1~5 个。

1.2.1 体表擦拭取样 轻轻捉住动物, 就地用流溪清水冲洗干净, 取无菌棉签在体表(背部或腹部)擦拭至棉签湿润, 然后将棉签置入 EP 管。

1.2.2 口腔擦拭取样 轻轻捉住动物, 就地用流溪清水冲洗干净, 用边角圆润的勺子轻轻打开口腔, 将棉签伸入口中, 擦拭至棉签湿润, 然后将棉签置入 EP 管。

1.2.3 剪趾取样 体表擦拭和口腔擦拭取样结束后, 剪取动物第二节关节处的脚趾, 保存在装有 95% 乙醇的 EP 管中, 取样完成后将动物就地释放。

1.3 样品的保存

棉签擦拭样品(体表、口腔)置于密封袋中, EP 管盖敞开, 袋中放硅胶, 封住密封袋, 待棉签完全干燥(大约 24 h)后合上 EP 管盖。在野外可将样品放置在常温环境下(20~25 °C), 待回到实验室将其保存在 -20 °C。剪趾样本回到实验室后更换 1 次 95% 乙醇, -20 °C 保存。

1.4 DNA 的提取

每个物种随机抽取 2~15 个样本, 分 2 组提取

DNA, 其中一组用常规高盐法提取, 另一组用试剂盒提取。使用 TIANGEN 公司的口腔拭子基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)(TIANamp Swab DNA Kit, DP322), 根据说明书操作获得 DNA 样品, 并于 -20 °C 保存。

1.5 PCR 扩增

PCR 扩增分别选取了 *16S rRNA* 通用引物 1 对、*CO I* 专一引物 1 对以及 *CO I* 通用引物 4 对(表 2), 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。25 μL PCR 扩增反应体系: 12.5 μL Taq MIX (EasyTaq™ DNA Polymerase、dNTPs 和优化的反应缓冲液反应终浓度为 2 ×, 2 × EasyTaq PCR SuperMix; 全式金 AS111-01, 北京); 上、下游引物各 1 μL; 1 μL DNA 模板; 添加 ddH₂O 至 25 μL。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 53 °C (*CO I*) 或者 55 °C (*16S rRNA*) 退火 40 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。

1.6 序列的测定与分析

PCR 扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司成都测序部进行 ABI3730XL 单向测序, 使用 PCR 检测时相对应的上游引物进行测序, 将测序结果在 NCBI 中使用 Nucleotide collection(nr/nt) 数据库进行 BLAST 物种比对分析, 以相似性程度判断相应物种 DNA 非损伤性取样是否成功。

表 2 引物信息
Table 2 Primers used in PCR

基因 Gene	引物 Primer	引物序列 Primer sequence	参考文献 Reference	
<i>16S rRNA</i>	P7	F:5'-CGCCTGTTTACCAAAAACAT-3'	Simon <i>et al.</i> , 1994	
	P8	R:5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'		
<i>CO I</i>	VR1d	F:5'-TAGACTTCTGGGTGGCCRAARAAYCA-3'	Ivanova <i>et al.</i> , 2006	
	VF1d	R:5'-TTCTCAACCAACCACAARGAYATYGG-3'		
	Chmf4	F:5'-TYTCWACWAAAYCAYAAAGAYATCGG-3'	Che <i>et al.</i> , 2012	
	Chmr4	R:5'-ACYTCRGGRTGRCCRAARAATCA-3'		
	CO I -CO2	F:5'-AYTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'		
	CO I -CO4	R:5'-ACYTCRGGRTGACCAAAAAATCA-3'		
	CO I -CO1	F:5'-TYTCWACWAAAYCAYAAAGAYATTGG-3'		
	CO I -CO3	R:5'-ACYTCYGGRTGACCAARAAYCA-3'		
	CO I -1	F:5'-CAAATCACAAAGACATTGGCACCCCT-3'		Zheng <i>et al.</i> , 2009
	CO I -2	R:5'-GATACGACATACTGGAAGTGGGCTAC-3'		

注: CO I -1/CO I -2 为铃蟾属 *Bombina* 专一引物, 其余 *CO I* 引物为通用引物

Notes: CO I -1/CO I -2 is a specific primer of *Bombina*, and the rest are universal primers

2 结果

2.1 BLAST 比对分析

共获得 11 个物种 34 个个体的 46 个剪趾、体表、口腔样本共计 46 条线粒体基因序列,同一个体不同来源样本的相同基因序列一致。BLAST 比对结果表明,受检样本物种基因序列匹配度除疣刺齿蟾 *Oreolalax rugosus* 的 1 个样本为 97%,其余各样本均在 99% 以上,部分样本达 100%。每只个体上传

1 条基因序列到 GenBank,共计上传 34 只个体 34 条基因序列(附录 I)。

2.2 DNA 提取方法比较

采用不同的 DNA 提取方法,剪趾样本获得的 DNA 质量没有明显差异,均能获得目标物种的线粒体 DNA 序列,扩增测序成功率 100%;而擦拭样本所获得的 DNA 质量表现出一定程度的差异,进而影响测序的成功率。

在对所有样本使用相同引物(16S rRNA 通用引

表 3 线粒体序列 BLAST 比对结果
Table 3 BLAST results of the mitochondrial sequence

物种 Species	样本 Sample	COI /16S rRNA	体表/口腔/剪趾 Skin/mouth/toe	匹配物种 Matching species in GenBank	相似性 Identity/%
无蹼齿蟾 <i>Oreolalax schmidtii</i>	YXS84	16S rRNA	√/—/—	<i>O. schmidtii</i>	99
	YXS4-1	16S rRNA	√/—/—	<i>O. schmidtii</i>	99
	YXS9-1	16S rRNA	√/—/—	<i>O. schmidtii</i>	99
	YXS9-3	16S rRNA	√/—/—	<i>O. schmidtii</i>	99
	YXS72-1	16S rRNA	√/—/—	<i>O. schmidtii</i>	99
	YXS72-2	16S rRNA	√/—/—	<i>O. schmidtii</i>	99
	YXS73-1	16S rRNA	√/—/—	<i>O. schmidtii</i>	99
	YXS73-2	16S rRNA	√/—/—	<i>O. schmidtii</i>	99
	YXS74-1	16S rRNA	√/—/—	<i>O. schmidtii</i>	99
	YXS74-2	16S rRNA	√/—/—	<i>O. schmidtii</i>	99
	YXS75-1	16S rRNA	√/—/—	<i>O. schmidtii</i>	99
	YXS76-1	16S rRNA	√/—/—	<i>O. schmidtii</i>	99
	YXS88	16S rRNA	—/—/√	<i>O. schmidtii</i>	99
疣刺齿蟾 <i>Oreolalax rugosus</i>	YXS41-3	16S rRNA	√/—/—	<i>O. rugosus</i>	97
	YXS43-2	16S rRNA	√/—/—	<i>O. rugosus</i>	99
	YXS43-3	16S rRNA	√/—/—	<i>O. rugosus</i>	99
	YXS44-2	16S rRNA	√/—/—	<i>O. rugosus</i>	99
	YXS44-3	16S rRNA	√/—/—	<i>O. rugosus</i>	99
	YXS45-3	16S rRNA	√/—/—	<i>O. rugosus</i>	99
	YXS35-2	16S rRNA	√/—/—	<i>O. rugosus</i>	99
	YXS35-4	16S rRNA	—/—/√	<i>O. rugosus</i>	99
大蹼铃蟾 <i>Bombina maxima</i>	YXS61-2	COI	√/—/—	<i>Bo. maxima</i>	99
	YXS67-1	COI	√/—/—	<i>Bo. maxima</i>	99
	YXS47-4	COI	—/—/√	<i>Bo. maxima</i>	99
中华蟾蜍华西亚种 <i>Bufo gargarizans andrewsi</i>	YXS85	COI	√/—/—	<i>Bu. gargarizans</i>	99
	YXS90	COI	—/—/√	<i>Bu. gargarizans</i>	99
圆疣猫眼蟾 <i>Scutiger tuberculatus</i>	YXS57-1	16S rRNA	√/—/—	<i>S. tuberculatus</i>	99
	YXS57-2	16S rRNA	√/—/—	<i>S. tuberculatus</i>	99
	YXS57-3	16S rRNA	√/—/—	<i>S. tuberculatus</i>	99
	YXS57-4	16S rRNA	√/—/—	<i>S. tuberculatus</i>	99
	YXS57-5	16S rRNA	√/—/—	<i>S. tuberculatus</i>	99
	YXS57-6	16S rRNA	—/—/√	<i>S. tuberculatus</i>	99

续表 3

物种 Species	样本 Sample	<i>COI</i> / <i>16S</i> rRNA	体表/口腔/剪趾 Skin/mouth/toe	匹配物种 Matching species in GenBank	相似性 Identity/%
沙坪角蟾 <i>Atympanophrys shapingensis</i>	YXS11-3	<i>16S</i> rRNA	√/—/—	<i>At. shapingensis</i>	100
	YXS71-1	<i>16S</i> rRNA	√/—/—	<i>At. shapingensis</i>	100
	YXS77-1	<i>16S</i> rRNA	—/√/—	<i>At. shapingensis</i>	100
棕点湍蛙 <i>Amolops loloensis</i>	YXS79-1	<i>COI</i>	√/—/—	<i>Am. loloensis</i>	100
	YXS83-1	<i>COI</i>	√/—/—	<i>Am. loloensis</i>	100
	YXS53-4	<i>COI</i>	—/—/√	<i>Am. loloensis</i>	100
昭觉林蛙 <i>Rana chiaoensis</i>	YXS60-1	<i>COI</i>	√/—/—	<i>Ra. chaochiaoensis</i>	100
	YXS89	<i>COI</i>	—/—/√	<i>Ra. chaochiaoensis</i>	100
宝兴树蛙 <i>Rhacophorus dugritei</i>	YXS65-1	<i>16S</i> rRNA	√/—/—	<i>Rh. dugritei</i>	99
	YXS82-1	<i>16S</i> rRNA	√/—/—	<i>Rh. dugritei</i>	99
普雄原鲵 <i>Pseudohynobius puxiongensis</i>	YXS12-1	<i>COI</i>	√/—/—	<i>P. puxiongensis</i>	100
山溪鲵 <i>Batrachuperus pinchonii</i>	YXS86	<i>COI</i>	√/—/—	<i>Ba. pinchonii</i>	99
	YXS87	<i>COI</i>	√/—/—	<i>Ba. pinchonii</i>	99
	YXS91	<i>COI</i>	—/—/√	<i>Ba. pinchonii</i>	99

注: YXS65-1 中, YXS65 为野外采集标本号, -1 为该标本所取的剪趾, 或体表擦拭, 或口腔擦拭样本号; 下同

Note: YXS65 is number of the field collected specimen, -1 is the ID of the specimen from the toe, skin, or mouth; the same below

物)的前提下,通过高盐法提取擦拭样本(口腔、体表)的 DNA 质量相对较弱,部分样本不能获得物种基因序列,共提取 DNA 样本 27 个,测序成功 21 个,成功率为 78%。而通过试剂盒提取擦拭样本的 DNA 质量良好,共提取 DNA 样本 12 个,测序成功率达 100%(表 4)。

2.3 不同引物比较

实验结果表明,剪趾样本使用 4 种通用 *COI* 引物均可扩增并成功测序。而擦拭样本在模板全部使用试剂盒提取 DNA 的前提下,运用 6 对不同线粒体基因引物进行 DNA 扩增,不同类群物种明显受引物特异性的局限,扩增成功率受到明显影响。*COI* 通用引物 VR1d/VF1d 仅中华蟾蜍华西亚种 *Bufo gargarizans andrewsi* 扩增并测序成功;通用引物 F/R 也仅在棕点湍蛙 *Amolops loloensis* 和昭觉林蛙 *Rana chiaoensis* 2 个物种中扩增成功。4 对 *COI* 通用引物均不能在大蹼铃蟾 *Bombina maxima* 中扩增成功,只有使用铃蟾属 *Bombina* 专一引物才成功获得该物种序列。*16S* rRNA 通用引物虽然在角蟾科 Megophryidae 物种以及树蛙科 Rhacophoridae 物种中可以成功扩增,但却不能扩增铃蟾科 Bombinatoridae 物种大蹼铃蟾(表 5)。

3 讨论

3.1 DNA 体表擦拭取样的应用

已有的两栖类体表擦拭取样的研究比较局限,只在零星的几个物种中有报道。Mendoza 等(2012)从离趾蟾 *Eleutherodactylus johnstonei* 的 68 只个体中获取体表涂抹样本,使用 DNeasy 提取试剂盒、盐析、酚-氯仿抽提等方法提取 DNA,并通过扩增 *16S* rRNA 的线粒体基因比较了提取 DNA 的质量,证明在该物种中获取上皮脱落组织是可用的。Pichlmüller 等(2013)利用皮肤擦拭取样在火蝾螈 *Salamandra salamandra* 的幼体中获得 DNA 并完成了微卫星分型。

本研究对四川申果庄省级大熊猫保护区内的 6 科 10 属 11 种两栖动物随机就地体表擦拭取样,这些动物涵盖有尾及无尾两栖类多个类群的多个物种,并涉及多种生境类群。通过对 PCR 产物的测序分析,在所有受检物种中,研究获得的 *COI* 序列和 *16S* rRNA 序列与 GenBank 中相应物种的序列相似性均在 97% 以上,绝大部分样本匹配度达到 99% 和 100%,表明擦拭获得的 DNA 均可以扩增获得目标物种序列。

由此说明,体表擦拭获取 DNA 的方法在两栖动物各类群中可以广泛应用。

表 4 不同方法提取不同物种样本的结果比较

Table 4 Comparison of extracted DNA in different sample of species by different methods

物种 Species	样本 Sample	高盐法 Salting-out	试剂盒 Tiangen kit	体表/口腔/剪趾 Skin/mouth/toe
	YXS84	√		√/-/-
	YXS4-1	√		√/-/-
	YXS9-1	√		√/-/-
	YXS9-3	√		√/-/-
	YXS72-1		√	√/-/-
无蹼齿蟾 <i>Oreolalax schmidti</i>	YXS72-2		√	√/-/-
	YXS73-1		√	√/-/-
	YXS73-2		√	√/-/-
	YXS74-1		√	√/-/-
	YXS74-2		√	√/-/-
	YXS75-1		√	√/-/-
	YXS76-1		√	√/-/-
	YXS88	√		-/-/√
	YXS35-1	√		x/-/-
	YXS35-2	√		x/-/-
	YXS35-3	√		x/-/-
	YXS42-2	√		x/-/-
疣刺齿蟾 <i>Oreolalax rugosus</i>	YXS41-3	√		√/-/-
	YXS43-2	√		√/-/-
	YXS43-3	√		√/-/-
	YXS44-2	√		√/-/-
	YXS44-3	√		√/-/-
	YXS45-3	√		√/-/-
	YXS57-2	√		√/-/-
	YXS35-4	√		-/-/√
	YXS57-1	√		√/-/-
	YXS57-2	√		√/-/-
圆疣猫眼蟾 <i>Scutiger tuberculatus</i>	YXS57-3	√		√/-/-
	YXS57-4	√		√/-/-
	YXS57-5	√		√/-/-
	YXS57-6	√		-/-/√
	YXS11-3	√		√/-/-
沙坪角蟾 <i>Atympanophrys shapingensis</i>	YXS71-1		√	√/-/-
	YXS77-1		√	-/√/-
	YXS3-6	√		√/-/-
	YXS3-1	√		√/-/-
	YXS3-7	√		-/-/√
宝兴树蛙 <i>Rhacophorus dugritei</i>	YXS65-1		√	√/-/-
	YXS82-1		√	√/-/-

注 Note: x/-/- 测序失败的体表样本 the skin sample of failing to sequence

表 5 不同引物扩增获得的测序成功率

Table 5 The sequencing success rate of PCR amplification using 6 primers

物种 Species	样本 Sample	VR1d VF1d	F/R	COI-1 COI-2	P7/P8
	YXS72-1	x	x	-	√
	YXS72-2	x	x	-	√
无蹼齿蟾 <i>Oreolalax schmidti</i>	YXS73-1	x	x	-	√
	YXS73-2	x	x	-	√
	YXS74-1	x	x	-	√
	YXS74-2	x	x	-	√
	YXS75-1	x	x	-	√
	YXS76-1	x	x	-	√
沙坪角蟾 <i>Atympanophrys shapingensis</i>	YXS71-1	x	x	-	√
	YXS77-1	x	x	-	√
棕点湍蛙 <i>Amolops loloensis</i>	YXS79-1	x	√	-	-
	YXS83-1	x	√	-	-
	YXS78-1	x	x	-	-
	YXS60-1	x	√	-	-
昭觉林蛙 <i>Rana chiaoensis</i>	YXS60-2	x	x	-	-
	YXS62-1	x	x	-	-
	YXS63-1	x	x	-	-
宝兴树蛙 <i>Rhacophorus dugritei</i>	YXS65-1	x	x	-	√
	YXS82-1	x	x	-	√
	YXS61-1	x	x	x	x
	YXS66-1	x	x	x	x
大蹼铃蟾 <i>Bombina maxima</i>	YXS66-2	x	x	x	x
	YXS67-2	x	x	x	x
	YXS68-2	x	x	x	x
	YXS61-2	x	x	√	x
	YXS67-1	x	x	√	x
中华蟾蜍 华西亚种 <i>Bufo gargarizans andrewsi</i>	YXS85	√	-	-	-

注: 引物 Chmf4/Chmr4、CO I -CO2/CO I -CO4 和 CO I -CO1/CO I -CO3 混合使用, 即上游引物 Chmf4、CO I -CO2、CO I -CO1 混合记作 F, 下游引物 Chmr4、CO I -CO4、CO I -CO3 混合记作 R; √ 该号样本扩增并测序成功, x 未成功, - 未进行该引物检测

Notes: Primers Chmf4/Chmr4, CO I -CO2/CO I -CO4 and CO I -CO1/CO I -CO3 were mixed and used in PCR, the upstream primers Chmf4, CO I -CO2 and CO I -CO1 are denoted as F, and the downstream primers Chmr4, CO I -CO4, CO I -CO3 mixture are denoted as R; √ indicates successful PCR amplification and DNA sequencing, x indicates failed PCR amplification and DNA sequencing, - indicates the detection was not carried out

3.2 DNA 提取方法的影响

与剪趾样本相比,体表擦拭获得的 DNA 质量较差。同时,擦拭样本 DNA 提取难度更大,不同的 DNA 提取方法获得的 DNA 质量存在一定差异。其中,高盐法可获取数量较多的 DNA,但所获 DNA 纯度较低,混有较多脂类、蛋白质等有机物,这些杂质可能影响 PCR 扩增成功率;而试剂盒提取虽然会造成 DNA 量的损失,但可获得纯度更高的 DNA,PCR 扩增成功率更高(邵劲松等,2013;李霞等,2015)。

实验结果表明,在使用同一对引物 P7/P8 的前提下,随机抽取的 5 个物种以试剂盒提取的 DNA 扩增测序成功率为 100%,高于高盐法的 78%。Mendoza 等(2012)的研究中,使用试剂盒和盐析法提取的 DNA 均成功地扩增到了 *16S DNA* 片段,其中,试剂盒提取的 DNA 扩增成功率(90%)比高盐法(80%)的高。

因此,针对体表擦拭样本,建议使用试剂盒提取 DNA。

3.3 引物特异性的影响

与剪趾样本相比,体表擦拭获得的 DNA 量较少,含有较多环境细菌等非目标物种的 DNA。因通用性较强的引物对非目标物种 DNA 也同样扩增,甚至会产生优势扩增情况,导致目标物种扩增失败,因此,体表擦拭样本在提取 DNA 时对引物专一性的要求有所增加。

实际上,同类非损伤性取样研究中,研究者多针对其研究类群,设计专一引物获得目标物种基因序列。Prunier 等(2012)在 2 种两栖类物种中用非损伤性取样的 DNA 样本完成了 14 个微卫星位点的基因分型研究,对每个微卫星位点专门设计了特异性引物。针对离趾蟾完成的非损伤性取样测序检测,设计了特异性的 *16S rRNA* 引物(Mendoza *et al.*,2012)。Simon 等(1994)在蚓螈目 5 个种的研究中也使用了特异性的 *16S rRNA* 和 POMC 引物。

体表擦拭取样获得的 DNA 量小且成分相对复杂,因此,建议针对各类群设计特异性强的引物进行扩增测序,以达到良好的目标物种扩增成功率。

致谢:野外数据采集得到四川省申果庄大熊猫自然保护区拉吉保护站、石门保护站和四川省林业厅野生动植物与自然保护区管理处和管理站工作人员的大力支持,谨此深表谢意!

参考文献:

- 费梁,胡淑琴,叶娉媛,等. 2009. 中国动物志 两栖纲 [M]. 北京:科学出版社.
- 李霞,陈新诺,王蕾,等. 2015. 山羊粪便总 DNA 提取方法的比较[J]. 四川畜牧兽医,42(1):38-40.
- 邵劲松,浦牧野,顾祝军. 2013. 3 种土壤微生物基因组 DNA 提取方法的比较[J]. 南京晓庄学院学报,29(3):64-67.
- 吴军,高逊,徐海根,等. 2013. 两栖动物监测方法和国外监测计划研究[J]. 生态与农村环境学报,29(6):784-788.
- Broquet T, Berset-Braendli L, Emaresi G, *et al.* 2007. Buccal swabs allow efficient and reliable microsatellite genotyping in amphibians [J]. Conservation Genetics, 8(2):509-511.
- Che J, Chen HM, Yang JX, *et al.* 2012. Universal CO I primers for DNA barcoding amphibians [J]. Molecular Ecology Resources, 12(2):247-258.
- Frost DR. 2017. Amphibian species of the world: an online reference version 5.6 [EB/OL]. (2013/01/09). <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>.
- Guo W, Ao M, Li W, *et al.* 2013. Skin secretion and shedding is a good source for non-destructive genetic sampling in the Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) [J]. Zeitschrift für Naturforschung C, Journal of Biosciences, 68(3-4):164-108.
- Ivanova NV, Dewaard JR, Hebert PDN. 2006. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA [J]. Molecular Ecology Resources, 6(4):998-1002.
- Maddock ST, Lewis CJ, Wilkinson M, *et al.* 2014. Non-lethal DNA sampling for caecilian amphibians [J]. The Herpetological Journal, 24(4):255-260.
- McCarthy MA, Weller WF, Parris KM. 2009. Effects of toe clipping on survival, recapture, and return rates of Jefferson salamanders (*Ambystoma jeffersonianum*) in Ontario, Canada [J]. Journal of Herpetology, 43(3):394-401.
- Mendoza ÁM, García-Ramírez JC, Cárdenas-Henao H. 2012. Epithelial mucosa as an alternative tissue for DNA extraction in amphibians [J]. Conservation Genetics Resources, 4(4):

1097-1099.

- Parris KM, McCall SC, McCarthy MA, *et al.* 2010. Assessing ethical trade-offs in ecological field studies [J]. *Journal of Applied Ecology*, 47(1): 227-234.
- Pichlmüller F, Straub C, Helfer V. 2013. Skin swabbing of amphibian larvae yields sufficient DNA for efficient sequencing and reliable microsatellite genotyping [J]. *Amphibia-Reptilia*, 34(4): 517-523.
- Poschadel JR, Möller D. 2004. A versatile field method for tissue sampling on small reptiles and amphibians, applied to pond turtles, newts, frogs and toads [J]. *Conservation Genetics*, 5(6): 865-867.
- Prunier J, Kaufmann B, Grolet O, *et al.* 2012. Skin swabbing as a new efficient DNA sampling technique in amphibians, and 14 new microsatellite markers in the alpine newt (*Ichthyosaura alpestris*) [J]. *Molecular Ecology Resources*, 12(3): 524-531.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, *et al.* 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers [J]. *Annals of the Entomological Society of America*, 87(6): 651-701.
- Zheng YC, Fu JZ, Li SQ. 2009. Toward understanding the distribution of Laurasian frogs: a test of Savage's biogeographical hypothesis using the genus *Bombina* [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52: 70-83.

附录 I 受检标本信息(括号中为各标本上传 GenBank 的 *COI* 或 *16S rRNA* 序列号,其中 *COI* 序列用下划线标出)

Appendix I Specimens examined for *COI* and *16S rRNA* genes (GenBank accession numbers are in parentheses, and *COI* sequences are underlined)

Oreolalax schmidtii, *n* = 9

YXS84(MF805595), YXS4-1(MF805602), YXS9-1(MF805601), YXS72-1(MF805600), YXS73-1(MF805599), YXS74-1(MF805598), YXS75-1(MF805597), YXS76-1(MF805596), YXS88(MF805594)

Oreolalax rugosus, *n* = 5

YXS41-3(MF805606), YXS43-3(MF805592), YXS44-3(MF805591), YXS45-3(MF805590), YXS35(MF805593)

Scutiger tuberculatus, *n* = 1

YXS57-1(MF805589)

Atympanophrys shapingensis, *n* = 3

YXS11-3(MF805604), YXS71-1(MF805608), YXS77-1(MF805607)

Amolops loloensis, *n* = 3

YXS79-1(MF805613), YXS83-1(MF805609), YXS53(MF805612)

Rana chiaoensis, *n* = 2

YXS60(MF805615), YXS89(MF805614)

Rhacophorus dugritei, *n* = 2

YXS65-1(MF805605), YXS82-1(MF805603)

Bombina maxima, *n* = 3

YXS61-2(MF805621), YXS67-1(MF805620), YXS47(MF805622)

Bufo gargarizans andrewsi, *n* = 2

YXS85(MF805610), YXS90(MF805611)

Pseudohynobius puxiongensis, *n* = 1

YXS12-1(MF805619)

Batrachuperus pinchonii, *n* = 3

YXS86(MF805618), YXS87(MF805617), YXS91(MF805616)