

几种鳄分子系统发生的探讨

朱伟铨¹,王义权¹,吴孝兵²,周开亚¹

(1. 南京师范大学生命科学学院遗传资源研究所,南京 210097;2. 安徽师范大学生命科学学院,芜湖 241000)

摘要:百年来关于扬子鳄的分类学位置存在着很多争议,本文测得扬子鳄、暹罗鳄和湾鳄的 mtDNA *ND4* 和 *Cyt b* 基因,并从 GenBank 中获得密西西比鳄和海龟的 *ND4* 基因和 *Cyt b* 基因相应片段。用 Clustal X1.8 进行对位排列,以海龟为外群构建分子进化系统树。结果显示:在鳄类动物中,扬子鳄与密西西比鳄的亲缘关系最近,两者 *ND4* 基因序列碱基差异为 20.68%,而 *Cyt b* 基因序列碱基差异为 14.43%;但扬子鳄与密西西比与鳄的分类问题仍将有待进一步探讨。

关键词: 鳄;*ND4* 基因序列;*Cyt b* 基因序列;分子系统发生

中图分类号:Q349

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2001)05-0435-04

The Molecular Phylogeny of Four Crocodylians Based on the Sequence of Mitochondrial *ND4* and *Cyt b* Gene

ZHU Wei-quan¹, WANG Yi-quan¹, WU Xiao-bing², ZHOU Kai-ya¹

(1. Institutes of Genetic Resources, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China;

2. College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu, 241000, China)

Abstract: A portion of mitochondrial *ND4* and cytochrome *b* gene of 3 species of crocodylian was sequenced. Additional homologous sequences of *Alligator mississippiensis* from GenBank were aligned together and compared with *Chelonia mydas*. The phylogenetic trees were reconstructed with the neighbor-joining (NJ) algorithm. *Alligator sinensis* is more related to *Alligator mississippiensis* than others though the diversity of their mitochondrial *ND4* gene reached 20.68% while *Cyt b* gene 14.43%. It needs further study to determine the phylogenetic relationships of *Alligator sinensis* and *Alligator mississippiensis*.

Key words: Crocodylian; Mitochondrial *ND4* gene; Mitochondrial cytochrome *b* gene; Phylogeny

全世界现存鳄 23 种,传统分类学依据形态特征将它们划归为鳄目的 3 个科(钝吻鳄科 Alligatoridae、鳄科 Crocodylidae、食鱼鳄科 Gavialidae)8 个属^[1]。1897 年, Fauval 将扬子鳄定名为 *Alligator sinensis*, 与密西西比鳄同列入钝吻鳄科、钝吻鳄属 (*Alligator*) 中^[2], 一直沿用至今。而 Deraniyagala 于 1947 年建议将扬子鳄从 *Alligator* 中分离出来成立新属 *Caigator*^[3]。陈壁辉在综合了扬子鳄和密西西比鳄在形态学、组织学、发生学、细胞学、染色

体组型、蛋白质组成、DNA 杂交、行为学等方面的差异后,也认为两者被并为一属是值得商榷的^[4]。

随着分子生物学的快速发展 DNA 分子技术越来越多的被运用到物种亲缘关系的分析中。以 mtDNA 基因为标记,开展遗传分化研究,将有助于我们了解现存鳄类的系统进化关系。本文通过几种鳄 mtDNA *ND4* 基因和 *Cyt b* 基因序列的综合分析,探讨扬子鳄和密西西比鳄及鳄类的分子系统发生。

收稿日期:2000-09-22;修回日期:2001-03-30

基金项目:江苏省“333 工程”人才培养基金、安徽省自然科学基金(99042419)和安徽省跨世纪学科带头人培养专项基金资助

第一作者:朱伟铨(1975-),女(汉),江苏东台人,硕士研究生,研究方向:动物分子生物学

通讯作者:王义权(1957-),男(汉),安徽合肥人,教授,博导,专业方向:动物分子生物学。Tel:025-3598328 E-mail:yqw@pine.njnu.edu.cn

致 谢 承蒙深圳野生动物园张毅城高级兽医师赠标本,特此致谢!

1 材料与方 法

1.1 材 料

用于测序的扬子鳄 3 个个体(2♂, 1♀)均来自安徽省扬子鳄繁殖研究中心,取肌肉和肝脏后,于-20℃保存待用;暹罗鳄 2 个个体,均为雄性,来自南京动物园,取肌肉于-20℃保存待用;湾鳄为 2 个幼鳄,性别难以区分,为深圳野生动物园馈赠的福尔马林浸制标本。

1.2 DNA 提取

取扬子鳄和暹罗鳄的肌肉组织 0.5g 左右,加 STE(10 mmol/L Tris-HCL, pH=8.0; 1 mol/L EDTA, pH=8.0) 1 ml,加蛋白酶 K 30 μl(10 mg/ml)和 SDS 150 μl(10%)于 50℃水浴 6 小时。按常规酚抽提法除蛋白,获得总 DNA。取湾鳄肌肉 0.2g 于 1.5ml 离心管中,用超纯水浸泡 24h(间隔换水),再按上述方法提取总 DNA。

1.3 PCR 引物及扩增反应条件

ND4 基因片段 PCR 的引物为本实验室根据 Arévalo 等^[5] 的研究所设计的 ND4(5' TGACTAC-CAAAAGCTCATGTAGAAGC 3')和 LEU(5' TACT TTTACTTGGATTTGACCCA)。PCR 总体积为 30 μl,其中含缓冲液(1×10)3 μl, Mg²⁺ (25 mmol/L) 2 μl, dNTP(2 mmol/L) 2 μl, 模板 DNA 1.5 μl, Taq DNA 聚合酶 1U, 引物各 1 μl 和适量的 ddH₂O。循环参数如下: 95℃ 预变性 4 min, 94℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 60s, 共 30 循环; 循环结束后在 72℃ 延伸 10min。而 Cyt b 基因片段的 PCR 引物则为通用引物 LI4724(5' CGAGATCTGAAAACCATCGTTG 3')和 HI5149(5' AAAGTGCAGCCCCTCAGAATGATATT-GTCTCA 3')。PCR 的总体积为 30 μl, 反应体系同 ND4 基因的 PCR 体系。循环参数如下: 95℃ 预变性 4 min, 96℃ 30s, 54℃ 30s, 72℃ 40s, 共 30 循环; 循环结束后在 72℃ 延伸 5 min。

1.4 序列测定和数据分 析

PCR 产物用 WASTON 公司 Gel Extraction Kit 纯化,并用 Perkin Elmer 公司的 ABI Prism™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 进行测序反应,并用其 ABI 310 遗传分析仪测序。将测得的序列连同 GenBank 中查得的密西西比鳄^[3] 的 ND4 基因和 Cyt b 基因的相应序列用 Clustal X1.8 软件进行对位排列。以 MEGA 软

件统计转换数和颠换数,并基于 Kimura 双参数模型的 NJ 法(Neighbor-joining),以龟(*Chelonia mydas*)作外群,构建几种鳄的分子系统树。

2 结 果

2.1 ND4 和 Cyt b 基因片段

本实验共得到扬子鳄、湾鳄和暹罗鳄(GenBank 登录号 AF380944、AF380946、AF380945)的 mtDNA ND4 基因序列长度分别为 706 bp、711 bp、710 bp,将序列与 GenBank 中获得的密西西比鳄的相应序列(GenBank 登录号: Y13113)^[6] 进行对位排列后得到同源序列 807 bp,其中多态位点 430 个,占总位点数的 53.27%。表 1 列出几种鳄的 mtDNA ND4 基因序列的碱基转换和颠换的比值及差异百分比。

表 1 4 种鳄类的 ND4 基因序列转换/颠换数(对角线上)及差异百分比(对角线下)

Table 1 Numbers of transitions/transversions (above diagonal) and percentage of difference (below diagonal) for four species of ND4 gene sequences

OUTS	1	2	3	4
1. 扬子鳄 (<i>Alligator sinensis</i>)		98/48	104/122	98/138
2. 密西西比鳄 (<i>Alligator mississippiensis</i>)	20.68		122/129	122/157
3. 暹罗鳄 (<i>Crocodylus siamensis</i>)	32.19	35.75		98/152
4. 湾鳄 (<i>Crocodylus porosus</i>)	38.56	39.46	40.52	

由表 1 可知钝吻鳄属的扬子鳄和密西西比鳄的碱基差异为 20.68%, 碱基的转换数和颠换数分别是 98 和 48; 而鳄属的暹罗鳄与湾鳄的碱基差异为 40.52%, 碱基的转换数和颠换数分别为 98 和 152。

表 2 4 种鳄类的 Cyt b 基因序列转换/颠换数(对角线上)及差异百分比(对角线下)

Table 2 Numbers of transitions/transversions (above diagonal) and percentage of difference (below diagonal) for four species of Cyt b gene sequences

OUTS	1	2	3	4
1. 扬子鳄 (<i>Alligator sinensis</i>)		43/15	50/56	53/89
2. 密西西比鳄 (<i>Alligator mississippiensis</i>)	14.43		51/55	52/86
3. 暹罗鳄 (<i>Crocodylus siamensis</i>)	26.37	26.37		53/87
4. 湾鳄 (<i>Crocodylus porosus</i>)	35.32	34.33	34.83	

实验得到扬子鳄、湾鳄和暹罗鳄(GenBank 登录号: AF306454、AF306452、AF306453)的 mtDNA Cyt b

基因序列长度分别为 424 bp、402 bp 和 426 bp。密西西比鳄的相应序列与进行对位排列后得到同源序列 402 bp, 其中多态位点 75 个, 占总位点数的 18.66%。

从表 2 中可知, 钝吻鳄属的扬子鳄和密西西比鳄 mtDNA Cyt b 基因的碱基差异达 14.43%, 碱基的颠换数和转换数分别为 43 和 15; 而鳄属的暹罗鳄和湾鳄的碱基差异为 34.83%, 碱基的颠换数和

转换数分别为 53 和 87。

2.2 系统发生分析

由于龟类与鳄类的亲缘关系较近^[7], 在根据以上物种的 ND4 基因序列构建系统树时, 选取海龟 *Chelonia mydas* (GenBank 登录号: AB012104)^[8] 为外群, 在考虑所有碱基替代(转换+颠换)条件下, 利用 NJ 法构建系统树如图 1。

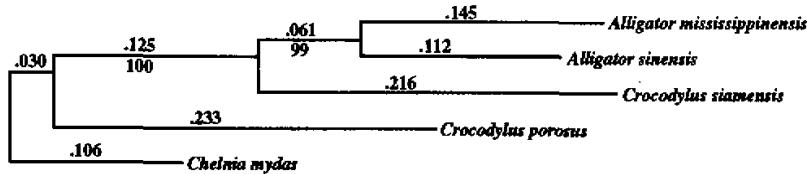


图 1 基于碱基转换和颠换的 Kimura 双参数模型, 用 NJ 法构建的鳄类 ND4 基因的分子系统树

Fig. 1 Phylogenetic tree inferred from partial mitochondrial ND4 gene sequences of 4 crocodilians and 1 outgroups using NJ method with Kimura 2-parameter distance.

Branch length were above branches Bootstrap values derived from 1000 replication were indicated under branches.

根据 Cyt b 基因序列以及将 ND4 基因和 Cyt b 基因序列综合后构建的系统树(文中不再示出)与 ND4 基因构建的系统树较为相似, 扬子鳄和密西西比鳄都聚为一支, 湾鳄和暹罗鳄各自成一支, 且暹罗鳄与扬子鳄和密西西比鳄的距离较近, 湾鳄与两者的关系较远。但在三个系统树中, 具体的分支支长存在差异。

3 讨 论

Buffetaut 研究了分布在世界各地的不同地层的鳄类化石后, 认为现存的三大类鳄中钝吻鳄科动物的祖先约在 140~150Ma 年前的早白垩纪(Lower Cretaceous)最先与其他的鳄相分离, 而鳄科动物与食鱼鳄科的分离则在新生代第三纪的古新世(约 65~55Ma 年前)^[9]。由此构建的进化分支系统中钝吻鳄科动物应位于系统树的根部。但本实验的结果与此正相反, 属于鳄科的湾鳄和暹罗鳄比较早地分离出来。这两种结果有极端的差异, 这种差异可能是使用不同的研究方法造成的。化石记录能比较真实地显示生物的进化历史, 但由于地质事件的发生或人为的因素, 现有的化石资料并不能完整地反映鳄类动物的进化史。而每一种生物都有自己的祖先, 都有自己的进化史, 进化资料会记录和储存在

DNA 中。因此, 研究生物进化规律可追踪到核苷酸水平, 比较物种间完整的基因组的核苷酸序列是最理想的方法^[10]。由此得出, 不同的研究方法造成两种结果的差异。关于扬子鳄属的划分问题, 人们有着许多争论。莫鑫泉在 DNA-DNA 杂交的重聚动力学研究中认为扬子鳄与密西西比鳄的关系比与隶属不同科的暹罗鳄与湾鳄间的距离还远, 而化石资料显示密西西比鳄比扬子鳄更为古老, 因而四种鳄的合理进化途径是: 密西西比鳄→湾鳄→暹罗鳄→扬子鳄^[11]。而徐安琪比较东亚和北美大陆各个地层发现的钝吻鳄科化石, 并综合晚白垩世以来气候和地理等因素的变化, 认为钝吻鳄科首先于渐新世在北美出现, 扬子鳄的祖先类型则是在中新世由北美洲经白令陆桥传播到东亚的, 此后长期的地理隔离使两大洲的钝吻鳄科类演变为两个不同的物种, 即扬子鳄和密西西比鳄^[12]。且在本文以 ND4 基因和 Cyt b 基因为分子标记构建的系统树中扬子鳄和密西西比鳄也聚为一支, 湾鳄和暹罗鳄在此分支以外, 此结论与传统分类学相一致。在 Fauval 将扬子鳄定名为 *Alligator sinensis*, 并与密西西比鳄并为一属后^[2], Deraniyagala 认为扬子鳄与凯门鳄在头骨特征上存在 10 个相似特征, 而与密西西比鳄仅 2 个相似特征, 因此建议将扬子鳄独立为一属

(Caigator)^[3]。陈壁辉在比较了扬子鳄、密西西比鳄、凯门鳄、骨喉鳄(*Osteolaemus tetraspis*)及湾鳄的头骨测量数据后,发现扬子鳄与密西西比鳄间的距离较远^[4]。组织学研究中,扬子鳄成体背腺退化,而密西西比鳄成体具背腺;扬子鳄舌腺具泌盐功能,而生活与淡咸水交界处的密西西比鳄的舌腺并不具此功能^[4],视觉器官组织结构上扬子鳄与密西西比鳄亦存在一定的差异^[13]。染色体组研究中扬子鳄与密西西比鳄染色体的臂间倒位和易位,造成染色体间显著的统计学差异^[14]。此外,Densmore 利用生物化学和免疫学技术研究现存鳄类亲缘关系时认为扬子鳄和密西西比鳄的关系较近,但他亦同时指出这两种鳄间的蛋白质相似性较其它同属的种间的要差,认为两者虽然被聚为一支,它们之间客观存在着较大的种间差异^[15]。而根据本文的研究结果,以及以 12S rDNA 基因序列构建的系统树^[16]中,扬子鳄和密西西比鳄间的亲缘关系最近。这种分类学中存在的传统分类学与形态学、组织学、古生物学、免疫学及分子生物学等研究结果的冲突可能是趋同进化和辐射进化的结果^[10]。扬子鳄与密西西比鳄的 mtDNA *ND4* 基因碱基差异为 20.68%,而鳄科鳄属的暹罗鳄与湾鳄间的碱基差异为 40.52%;扬子鳄与密西西比鳄间的 *Cyt b* 基因碱基差异为 14.43%,暹罗鳄与湾鳄间为 34.83%,可见暹罗鳄与湾鳄间碱基差异远高于扬子鳄与密西西比鳄间的差异。综合两个基因的分析结果看扬子鳄与密西西比鳄的 mtDNA *ND4* 基因和 *Cyt b* 基因碱基差异并未达到属间差异水平。而在 12S rDNA 基因的研究中,两者碱基差异为 12.12%,同属的暹罗鳄与美洲鳄(*Crocodylus acutus*)间差异为 5.22%,远低于 12.12% 的差异率,而鳄科属间的差异,如鳄属和假食鱼鳄属间的碱基差异为 12.26%,与扬子鳄和密西西比鳄的碱基差异率相当,吴孝兵等认为扬子鳄和密西西比鳄的 12S rDNA 基因碱基差异较大^[16],此研究结果的差异是由于不同的基因在进化过程中面临着不同的选择压力,不同的基因或不同种群间的同一基因进化速率是不同的。因而分子系统学在应用分子序列进行研究时,应尽可能多地采用多基因的序列综合分析,以达到较为满意的结果^[10]。

综上所述,尽管扬子鳄和密西西比鳄间有着多方面的差异,但从 *ND4* 基因序列和 *Cyt b* 基因序列的研究结果分析,在被研究的鳄类中两者的亲缘关

系最近;而且它们都生活在位于北温带同一纬度的两个大河流域,其他的鳄类则分布于热带和亚热带地区^[10]。但扬子鳄分类地位的最终确定将有待于分子系统学研究的进一步深入,以及多种研究方法的综合运用。

参 考 文 献 (References):

- [1] Alderton D. Crocodile and Alligator of the world[M]. Blandford Publishing, 1991, UK; 120~122.
- [2] Fauvel A. Alligators in China [J]. Journal of the North-China Branch of the Royal Asiatic Society Shanghai New Series 1879, 13: 1-36, 36a~f.
- [3] Deraniyagala, P E P. A new genus for the Chinese alligator [A]. Proceedings of the Third Annual Sessions of the Ceylon Association of Science [C]. 1947, Pt. 2: 12.
- [4] 陈壁辉. 扬子鳄属名研究现状 [A]. 中国黄山国际两栖爬行动物学学术会议论文集 [C] 北京: 中国林业出版社, 1993, 18~22.
- [5] Arévalo E, Davis S K, Sites Jr J W. Mitochondrial DNA Sequence divergence and phylogenetic relationships among eight chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (Phrynosomatidae) in Central Mexico [J]. 1994, Syst Biol, 43: 387~418.
- [6] Janke A, Arnason U. The complete mitochondrial genome of *Alligator mississippiensis* and the separation between recent archosauria (birds and crocodiles) [J]. Mol Biol Evol, 1997, 14 (12): 1266~1272.
- [7] Hedges S B, Poling L L. A molecular phylogeny of reptiles [J]. Science, 1999, 283: 998~1001.
- [8] Kumazawa Y, Nishida M. Complete mitochondrial DNA sequences of the green turtle and blue-tailed mole skink: statistical evidence for archosaurian affinity of turtles [J]. Mol Biol Evol, 1999, 16(6): 784~792.
- [9] Eric Buffetaut. The Evolution of the Crocodylians [J]. Scientific American, 1979, Oct vol 241(4): 130~144.
- [10] 张 昉. 生物进化 [M]. 北京大学出版社, 1998, 142~226.
- [11] 莫鑫泉, 赵铁军, 秦鹏春. 扬子鳄的起源 [J]. 中国科学, 1991, 10: 1147~1153.
- [12] 徐钦琦, 黄祝坚. 试论晚白垩世以来气候、地理等因素的变化对鼈类的进化及地理分布等影响 [J]. 古脊椎动物学报, 1984, 22 (1): 49~53.
- [13] 吴孝兵, 陈壁辉, 王朝林. 扬子鳄视觉器官组织学研究 [J]. 动物学报, 1993, 39(3): 244~250.
- [14] Cohen M M, Gans C. The Chromosomes of the orker Crocodile [J]. Cytogenetics, 1970, 9: 81~105.
- [15] Densmore L D. Biochemical and immunological systematic of the order Crocodylia. In: Evolution biology [J]. Plenum Press, 1983, 16: 397~465.
- [16] 吴孝兵, 王文权, 周开亚, 等. 从 12S rRNA 基因序列探讨 8 种鳄类的系统学关系 [J]. 动物学报, 2001, 47(5).