

# 扬子鳄分子遗传学与遗传多样性研究现状\*

黄磊<sup>①②</sup> 王义权<sup>①②\*\*</sup>

(<sup>①</sup>南京师范大学生命科学学院 南京 210097; <sup>②</sup>厦门大学生命科学院 厦门 361005)

**摘要:** 扬子鳄 (*Alligator sinensis*) 是中国特有的珍稀物种, 其遗传资源的保护已受到广泛关注和重视。本文简要介绍了近年来有关扬子鳄在分子系统学、遗传多样性与种群遗传结构、线粒体基因组、个体识别以及性别决定方面的分子遗传学研究状况。

**关键词:** 扬子鳄; 分子遗传学; 遗传多样性

**中图分类号:** Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2004)05-101-04

## Molecular Genetics and Genetic Diversity of Chinese Alligator, *Alligator sinensis*

HUANG Lei WANG Yi-Quan

(<sup>①</sup> College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097;

<sup>②</sup> School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** Chinese alligator, *Alligator sinensis*, is a critically endangered rare species, and comprehensive attention has been paid to the conservation of its genetic resources. This paper reviews the molecular genetics of Chinese alligator including molecular phylogenetics, genetic diversity, population genetic structure, mitochondrial genome, individual identification and sex determination.

**Key words:** *Alligator sinensis*; Molecular genetics; Genetic diversity

扬子鳄是中国特有的珍稀物种,也是现存 23 种鳄类中惟一分布于我国的物种。近几十年来,因生境破坏严重,其分布区域已急剧缩小,野生扬子鳄种群濒临灭绝,该物种遗传资源的保护因而倍受关注。多年来,扬子鳄的研究工作主要集中在生态、饲养繁殖、形态结构、生理生化、组织胚胎及系统分类等领域,近年随着分子生物学技术的快速发展和广泛应用,对扬子鳄的研究也逐渐深入到分子水平,并取得了一些成果。本文就该领域中的分子系统学、遗传多样性、线粒体基因组、个体识别以及性别决定等方面作一综述。

### 1 与扬子鳄相关的鳄类分子系统学

扬子鳄最早由 Fauvel 命名为 *Alligator sinensis*<sup>[1]</sup>, 与密河鳄 (*A. mississippiensis*) 同属钝吻鳄科 (*Alligatoridae*) 钝吻鳄属 (*Alligator*)。虽然扬子鳄与密河鳄有一系列颇为相似的特征,但扬子鳄的系统学地位及其与密河鳄的亲缘关系问题,早在上世纪初就有人提出疑问<sup>[2]</sup>, 鉴

于扬子鳄与密河鳄在头骨等骨骼特征上存在较大差异,而与凯门鳄 (*Caiman crocodilus*) 较为接近, Deraniyagala<sup>[3]</sup> 建议将扬子鳄从 *Alligator* 中分离出来另立新属 *Caigator*。史瀛仙等<sup>[4]</sup> 比较扬子鳄与密河鳄的染色体组型后发现,虽然二者染色体组型基本一致,但其间第 6、7 对染色体存在着显著差异。陈壁辉<sup>[5]</sup> 在综合了扬子鳄和密河鳄在形态学、组织学、细胞学、行为学等方面的差异后,也认为二者的归属问题值得商榷。

随着分子生物学技术的发展,从分子水平深入探讨扬子鳄的系统学地位,有助于一些有争议问题的解

\* 教育部骨干教师资助计划项目 (No. GG-180-21002403-1740), 教育部留学回国人员启动基金资助;

\*\* 通讯作者, E-mail: wangyq@xmu.edu.cn;

第一作者简介 黄磊,男,26岁,硕士研究生;研究方向:动物分子遗传学。

收稿日期:2004-04-06,修回日期:2004-07-07

决。Densmore<sup>[6]</sup>通过 21 种鳄的血红蛋白比较,认为扬子鳄与密河鳄的亲缘关系较近,同时指出二者间的蛋白质相似性较其它属内种间要低,提示现存鳄类中,扬子鳄与密河鳄间的亲缘关系虽然最近,但二者长期的地理分隔,形成了较大的种间差异。史瀛仙等<sup>[7]</sup>对扬子鳄与密河鳄的血清蛋白、血红蛋白和乳酸脱氢酶进行凝胶电泳分析,发现二者的血清蛋白和血红蛋白组成基本相似,而在乳酸脱氢酶的同功酶组成上存在较大差异。莫鑫泉等<sup>[8]</sup>通过 DNA 复性动力学分析研究扬子鳄和密河鳄的基因组组织结构,发现具有种属特异性的重复序列在二者基因组中的含量相近,但其随后根据 DNA-DNA 杂交研究结果认为扬子鳄与密河鳄的亲缘关系比隶属不同科的暹罗鳄 (*Crocodylus siamensis*) 与湾鳄 (*Crocodylus porosus*) 间关系还要远<sup>[9]</sup>。

吴孝兵等<sup>[10]</sup>用线粒体 DNA 上 12S rRNA 基因片段,比较研究扬子鳄、密河鳄等 8 种鳄的系统学关系发现,扬子鳄与密河鳄间的 12S rRNA 基因序列差异明显高于鳄科 (Crocodylidae) 鳄属 (*Crocodylus*) 中古巴鳄 (*C. rhombifer*)、暹罗鳄和美洲鳄 (*C. acutus*) 三者间的差异,相当于鳄科中鳄属与假食鱼鳄属 (*Tomistoma*) 间的差异。朱伟铨等<sup>[11]</sup>根据 mtDNA 上 ND4 与 Cyt b 基因片段比较了扬子鳄、密河鳄、暹罗鳄与湾鳄,发现扬子鳄与密河鳄在两个基因片段上的碱基差异都小于鳄属中暹罗鳄与湾鳄间的差异,系统学分析显示扬子鳄与密河鳄间的差异未达到属间水平。Glenn 等<sup>[12]</sup>对扬子鳄与密河鳄的 mtDNA 上 Cyt b 基因片段分析显示,二者在核苷酸及氨基酸水平的差异分别为 17.5% 和 13.8%,根据分子生物钟推算二者的分歧时间与化石记录吻合。mtDNA 控制区串连重复序列的比较分析显示,鳄科动物与钝吻鳄科的扬子鳄、密河鳄及凯门鳄差异明显,扬子鳄与密河鳄的重复单元间同源性相对较高,与凯门鳄差异较大<sup>[13]</sup>。吴孝兵等<sup>[14]</sup>在对扬子鳄 mtDNA 全序列分析的基础上,用 12S rRNA、16S rRNA、13 个蛋白编码基因序列及其合并数据进行系统学分析,结果支持现存鳄类中扬子鳄与密河鳄的亲缘关系较近而与凯门鳄关系相对较远的观点。

尽管多数研究支持扬子鳄与密河鳄有较近的亲缘关系,但二者在分子水平差异显著是客观事实。陈壁辉<sup>[15]</sup>认为,由于趋同进化和鳄类动物形态进化缓慢,致使扬子鳄与密河鳄形态上相似,加之二者间缺少过渡物种以资比较和对扬子鳄研究仍不够深入,目前只能将二者作为同一属中的二个物种对待。可见,扬子鳄的系统学地位及其与密河鳄关系仍有待进一步研究。

## 2 遗传多样性与种群遗传结构

目前野外生存的扬子鳄已很少,并仍以每年 4% ~ 6% 的速率下降<sup>[16-18]</sup>。虽然扬子鳄饲养种群近年来有了较大发展,但由于奠基者效应,已发现子代鳄繁殖衰退的迹象<sup>[19]</sup>,可见无论扬子鳄野生种群还是饲养种群,都还存在着巨大的遗传风险。

Wu 等<sup>[20]</sup>用 RAPD 分子标记方法对来自扬子鳄宣州饲养种群 33 个体和长兴种群 10 个体研究发现,2 个扬子鳄饲养种群的遗传多样性水平非常低,虽然目前 2 个饲养种群呈相互隔离状态,但由于历史上两地间并无天然屏障,且人为隔离时间较短,因此在遗传上二者有同来源。进一步的 AFLP 分子标记研究也证实了这一点(数据待发表),因此两地饲养的扬子鳄应作为一个进化显著性单元 (ESU) 管理。之后王义权等<sup>[21]</sup>又采用进化速率较快的 mtDNA 控制区对宣州与长兴 2 个扬子鳄饲养种群进行研究,但在所测得的 5' 端非重复区段的 462 bp 序列中,全部 39 个个体未检测到任何变异,共享一种单元型,揭示数十年来扬子鳄种群的衰退,对该物种的遗传多样性已产生了极其严重的影响。

针对扬子鳄种群遗传多样性非常低的现状,为进一步揭示其遗传结构特征,以便制订切实有效的遗传多样性保护策略,黄磊等<sup>[22]</sup>用微卫星 DNA 分子标记对扬子鳄野生对照群和宣州饲养种群共 39 个个体进行了研究,发现 8 个多态微卫星座位的等位基因中有 6 个属低频等位基因,因而仅单纯采用避免“近交”的方式,难以阻止由于“遗传漂变”导致低频等位基因的丧失。进一步对 mtDNA 控制区 3' 端的研究发现,扬子鳄 mtDNA 的 3' 端,由于含串连重复序列 (mtVNTR) 呈现较高的片段长度多态性(数据待发表)。据此作者提出,对扬子鳄进行分子标记的个体识别,重建养殖群体的谱系,对扬子鳄种群中低频等位基因全面筛查,并加以保护,实现最大限度地保护扬子鳄种群遗传多样性的策略。

## 3 线粒体基因组

线粒体 DNA 呈母系遗传,基因组相对较小,易于分析。吴孝兵等<sup>[14]</sup>对扬子鳄线粒体基因组全序列进行测序,结果显示扬子鳄 mtDNA 由 22 个 tRNA、2 个 rRNA、13 个蛋白质编码基因及 1 个非编码的控制区组成,其中蛋白质编码基因的排列顺序与其它脊椎动物相同,而 tRNA 基因的排列顺序仅与密河鳄、凯门鳄相同,与其它脊椎动物有差异;扬子鳄 mtDNA 控制区为 1 045 bp,含 16 个由 21 ~ 22 bp 保守单元组成的重复序列,与已知密河鳄控制区 988 bp 相近,短于凯门鳄控制区 1 992 bp。

mtDNA 全序列数据分析结果支持现存鳄类中扬子鳄与密河鳄的亲缘关系较近,排除扬子鳄与凯门鳄亲缘关系较近的观点。

#### 4 个体识别技术

宣州扬子鳄饲养种群近年来有了较大发展,已形成世界上最大的扬子鳄饲养种群,但该种群在半自然状态下放养,缺少详细的家系记录<sup>[21]</sup>,子代繁殖过程中可能发生近交而引起种群衰退,因此有必要对现有饲养种群进行个体识别建立完整的遗传谱系,确定核心遗传种质以保证其健康发展,并可为日后人工饲养的扬子鳄回归自然提供有益的遗传学资料。同时,野外生存的扬子鳄虽已相当稀少,却是现有扬子鳄种质资源的重要组成部分,但由于种群衰退,某些个体的消失可能导致一些稀有的基因型从该物种的基因库中永久性丧失,因此尽快对野生扬子鳄进行全面的遗传资源普查,并将其中稀有的基因型及其携带者,有目的的引入饲养种群中,将有利于扬子鳄种质资源的全面保持。

近年来,DNA 分子标记在对动物个体识别与亲缘鉴定方面已有较多应用。在采用微卫星与 mtVNTR 两种分子标记方法进行的扬子鳄个体识别分析中,39 个扬子鳄个体在 8 个微卫星座位上共检测到 34 种基因型组合,其中 30 个个体被完全区分,余下 9 个个体分别共享 4 种基因型组合,8 个微卫星座位的累计个体识别率为 0.996 8,累计父权排除率为 0.769 7,而其中 33 个个体的 mtVNTR 分析中共检测到 19 种基因型,个体识别率为 0.914 6,联合 8 个微卫星座位和 mtVNTR 将所分析 39 个个体完全区分,累计个体识别率达 0.999 7(数据待发表)。与扬子鳄已进行的 RAPD、AFLP 及 mtDNA 序列分析等分子标记比,联合使用 SSR 和 mtVNTR 分子标记,区分能力明显增强,因此在开发出多态性更高的分子标记之前,微卫星与 mtVNTR 两种分子标记对扬子鳄个体识别工作将有一定的实际意义。

#### 5 性别决定

扬子鳄二倍体的染色体数目为 32 条,雌、雄个体均未发现有性染色体存在<sup>[23]</sup>,温度影响其孵化率<sup>[24]</sup>,而且它的性别决定机制属于温度决定型(temperature dependent sex determination, TSD)<sup>[25]</sup>,因此,扬子鳄是一种研究温度决定性别机制的良好模式生物<sup>[26]</sup>。郑济芳等<sup>[26]</sup>和陈冬生等<sup>[27]</sup>分别报道了扬子鳄的 Sox 基因,与其它类群动物相关基因比较发现具有很高的同源性,暗示扬子鳄的 Sox 基因可能在其胚胎发育中承担着与哺乳动物相类似的功能,由于目前对温度决定型性别

决定的分子机制了解甚少,进一步研究扬子鳄的 Sox 基因,以及它在不同胚胎发育时期与不同组织部位的作用与机制,将有非常重要的意义。

#### 6 展 望

相对而言,从分子水平上对扬子鳄的研究开展时间不长,但已经取得一定成果。现有工作在深度和广度上都还远远不够,对其进行更深层次的分子遗传学研究,无论是为了保护这一珍稀物种的基因库,还是进一步揭示这种奇特动物的生物学本质都是十分必要的。此外,扬子鳄是中生代时期遗留下的古老爬行动物,与恐龙类有一定的亲缘关系,对扬子鳄的研究将对研究恐龙类的起源与演化及中生代时期爬行动物有一定指导作用;扬子鳄与密河鳄分类上同为一属,且为世界上仅有的两种淡水鳄,但二者却分居东西两个半球,地理位置相距甚远,研究扬子鳄对了解地质变迁和物种的起源演化将有着积极作用<sup>[28]</sup>。因此更加全面和深入地开展扬子鳄相关研究对其保护工作无疑将具有重要意义。

#### 参 考 文 献

- [1] Fauvel A. Alligators in China. *Journal of the Morth-China Branch of the Royal Asiatic Society*, Shanghai, 1879, New Series 13: 1 ~ 36.
- [2] Mook C C. Skull characters of recent crocodilia with notes on the affinities of the recent genera. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 1921, 44(13): 123 ~ 268.
- [3] Deraniyagala P E P. A new genus for the Chinese alligator. *Proceedings of the Third Annual Sessions of the Ceylon Association of Science*, 1947, 2: 12.
- [4] 史瀛仙,李士鹏,高庆生等.扬子鳄和密河鳄染色体组型的比较.两栖爬行动物学报,1984,3(3):11~16.
- [5] 陈壁辉.扬子鳄属名研究现状.见:赵尔宓等主编.中国黄山国际两栖爬行动物学学术会议论文集.北京:中国林业出版社,1993,18~22.
- [6] Densmore L D. Biochemical and immunological systematic of the order Crocodylia. *Evolution Biology*, 1983,16:397~465
- [7] 史瀛仙,李士鹏,高庆生等.扬子鳄和密河鳄的血清蛋白、血红蛋白和乳酸脱氢酶凝胶电泳的比较.两栖爬行动物学报,1984,3(2):21~24.
- [8] 莫鑫泉,王先为,史瀛仙等.扬子鳄与密河鳄基因组 DNA 的复性动力学和组织结构的研究.遗传学报,1988,15(6):436~441.
- [9] 莫鑫泉,赵铁军,秦鹏春.扬子鳄的起源.中国科学,1991,10:1047~1053.
- [10] 吴孝兵,王义权,周开亚等.从 12S rRNA 基因序列探讨

- 8 种鳄类的系统学关系. 动物学报, 2001, 47(5): 522 ~ 527.
- [11] 朱伟铨, 王义权, 吴孝兵等. 几种鳄分子系统发生的探讨. 遗传, 2001, 23(5): 435 ~ 438.
- [12] Glenn T C, Staton J L, Vu A T, *et al.* Low mitochondrial DNA variation among American alligators and a novel non-coding region in crocodylians. *Journal of Experimental Zoology (Mol Dev Evol)*, 2002, 294: 312 ~ 324.
- [13] Ray D A, Densmore L D. Repetitive sequences in the crocodylian mitochondrial control region: poly-A sequences and heteroplasmic tandem repeats. *Molecular Biology and Evolution*, 2003, 20(6): 1 006 ~ 1 013.
- [14] 吴孝兵, 王义权, 周开亚等. 扬子鳄线粒体全基因组与鳄类系统发生. 科学通报, 2003, 48(18): 1954 ~ 1959.
- [15] 陈壁辉. 扬子鳄的起源. 动物学杂志, 2002, 37(5): 87 ~ 90.
- [16] Thorbjarnarson J, Wang X M. The conservation status of the Chinese alligator. *Oryx*, 1999, 33(2): 152 ~ 159.
- [17] 丁由中, 王小明, 何利军等. 野生扬子鳄物种及栖息地现状研究. 生物多样性, 2001, 9(2): 102 ~ 108.
- [18] Thorbjarnarson J, Wang X M, Shao M, *et al.* Wild populations of the Chinese alligator approach extinction. *Biological Conservation*, 2002, 103(1): 93 ~ 102.
- [19] 吴孝兵, 王义权, 周开亚等. 安徽省宣州扬子鳄饲养种群繁殖现状分析. 应用与环境生物学报, 1999, 5(6): 585 ~ 588.
- [20] Wu X B, Wang Y Q, Zhou K Y, *et al.* Genetic variation in captive population of Chinese alligator, *Alligator sinensis*, revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Biological Conservation*, 2002, 106: 435 ~ 441.
- [21] 王义权, 朱伟铨, 王朝林. 扬子鳄饲养种群线粒体 DNA 控制区的序列多态性. 遗传学报, 2003, 30(5): 425 ~ 430.
- [22] 黄磊, 王义权. 扬子鳄种群的微卫星 DNA 多态及其遗传多样性保护对策分析. 遗传学报, 2004, 31(2): 143 ~ 150.
- [23] Cohen M M, Gans C. The chromosomes of the order Crocodylia. *Cytogenetics*, 1970, 9: 81 ~ 105.
- [24] 何利军, 王小明, 丁由中等. 温度对扬子鳄卵野外孵化的影响. 动物学报, 2002, 48(3): 420 ~ 424.
- [25] Lang J W, Andrews H V. Temperature-dependent sex determination in crocodylians. *Journal of Experimental Zoology*, 1994, 270: 28 ~ 44.
- [26] 郑济芳, 朱陆元. 扬子鳄的 CaSox4 基因的分子克隆和进化分析. 动物学报, 2003, 49(3): 404 ~ 407.
- [27] 陈冬生, 聂刘旺, 程双怀等. 扬子鳄 4 个 Sox 基因保守区的克隆及序列分析. 动物学研究, 2003, 24(2): 127 ~ 131.
- [28] 吴孝兵, 陈壁辉. 扬子鳄资源数量、价值及开发利用现状. 自然资源学报, 1999, 14(2): 183 ~ 186.