

扬子鳄的起源*

莫鑫泉

(中国科学院发育生物学研究所, 北京 100080)

赵铁军 秦鹏春

(东北农学院生物工程系, 哈尔滨 150030)

摘 要

经典分类学把扬子鳄和密河鳄归入鼈科、鼈属下的两个种, 认为它们的关系十分密切。我们的 DNA—DNA 杂交结果指出: 扬子鳄是亚洲起源的相对年轻的鳄类, 密河鳄则比较古老。泰国鳄、湾鳄处于两者之间。鼈与鳄两者之间似乎可以相互进化。鳄的进化速率较鸟类和高等脊椎动物缓慢。得到了四种鳄的种系发生关系。提出了湾鳄的祖先是密河鳄与扬子鳄之间的过渡类型的假设。

关键词: 扬子鳄, 种系发生, DNA—DNA 杂交, 分子进化

扬子鳄是我国特有的珍稀动物, 1879 年由 Fauvel 定名为 *Alligator sinensis* 而闻名于世^[1]。Alligator 译成钝吻(或短吻)鳄, 另一种钝吻鳄是栖息在美国东南诸州的密西西比鳄(*Alligator mississippiensis*, 以下简称密河鳄)。世界上现存 21 种鳄类, 它们分属鳄目的鳄科、食鱼鳄科、鼈科, 由于扬子鳄和密河鳄是鼈科、鼈属下仅存的两个现生种, 因此尤其受到重视。

虽然早在 1890 年 Boulanger 就已经注意到扬子鳄有一系列的特征与南美的眼镜鳄(凯门鳄的一种)相近, 1923 年 Mook 也记述了扬子鳄的头骨特征, 并指出了与密河鳄的不同之处^[2,3], 但更多的生物学家报道了两者颇为相似的特征; 例如大多数鳄类都栖息热带、亚热带的淡水或海水中, 唯独扬子鳄和密河鳄生活在温带的淡水中。它们都挖洞穴居和冬眠, 以适应温带四季多变的气候。它们的吻短, 前端圆钝, 口闭合时, 下颌的第四齿嵌入上颌的一个凹槽中使该齿不外露。它们的染色体数相同($2n=32$), 而且核型也十分相似^[4]。血液中的乳酸脱氢酶和最近对 DNA 重聚动力学分析结果也都十分类似^[5]。Densmore 对 21 种鳄的血红蛋白比较, 表明扬子鳄和密河鳄之间的关系比它们各自对凯门鳄的关系更近^[6]。根据这许多相似特征, 一些生物学家偏向扬子鳄和密河鳄是近亲, 甚至是表兄弟的关系^[8]。一些国际上著名的百科全书也常把扬子鳄和密河鳄相提并论^[7]。鳄类的祖先与恐龙和翼龙同属初龙亚纲, 是史前恐龙类家族的少数后裔, 因此用经典分类学方法对鳄的分类和阐明种间关系有很大难度。随着分子生物学

本文 1990 年 11 月 30 日收到, 1991 年 6 月 6 日收到修改稿。

* 国家自然科学基金和美国洛氏基金部分资助项目。

的进步,以 Britten 的重聚动力学为基础^[8]而发展起来的 DNA—DNA 单拷贝序列杂交法已经成功地用于鸟类^[9]、人猿超科^[10]、大熊猫^[11]、原鼯鼠^[12]以及袋貂类^[13]的分类和种系发生的研究。1989 年 5 月在美国加利福尼亚的 Arrowlake 召开了 DNA—DNA 杂交的专题讨论会,进一步明确了 DNA—DNA 杂交法是研究分子分类和种系发生的有力工具^[14]。我们的实验室在四年前用重聚动力学方法比较了扬子鳄和密河鳄基因组的中度重复序列的种类、数量和拷贝数,发现有一定的差别,也测定了基因组的复杂性^[5]。本文中我们用 DNA—DNA 杂交法探索了扬子鳄的起源。

一、实验材料和方法

DNA 的制备: 扬子鳄、密河鳄、泰国鳄和湾鳄的大分子量 DNA 是从它们的红血球中提取的,血样取自北京动物园^[5]。按 Britten^[8]和 Sibley^[10]的方法分离、制备成~500 bp 的单拷贝序列,部分扬子鳄和密河鳄的 DNA 序列按 Commerford 法^[15]进行 ¹²⁵I 标记,作为示踪 DNA(tracer DNA),其余 DNA 作为驱动 DNA(driver DNA)。不同组合的示踪 DNA 和驱动 DNA 在 60°C 水浴中进行杂交($C_0t=10000, 120h$),将杂交后的 DNA 样品吸附在羟基磷灰石(原西德 Boehringer Mannheim 公司产品)柱上。从 55—95°C,以 $\Delta T=2.5^\circ C$ 为步长洗脱,收集洗脱液,测 γ 计数(美国 Beckman 公司 DP5500 γ 计数仪),具体步骤同 Sibley 方法^[10]。

二、实验结果

1. 图 1 是以扬子鳄的单拷贝 DNA 为示踪 DNA,分别与密河鳄、泰国鳄、湾鳄的驱动 DNA 杂交的结果,纵轴代表复性的自交、杂交 DNA 解链百分数;横轴为温度($^\circ C$),结果如下:

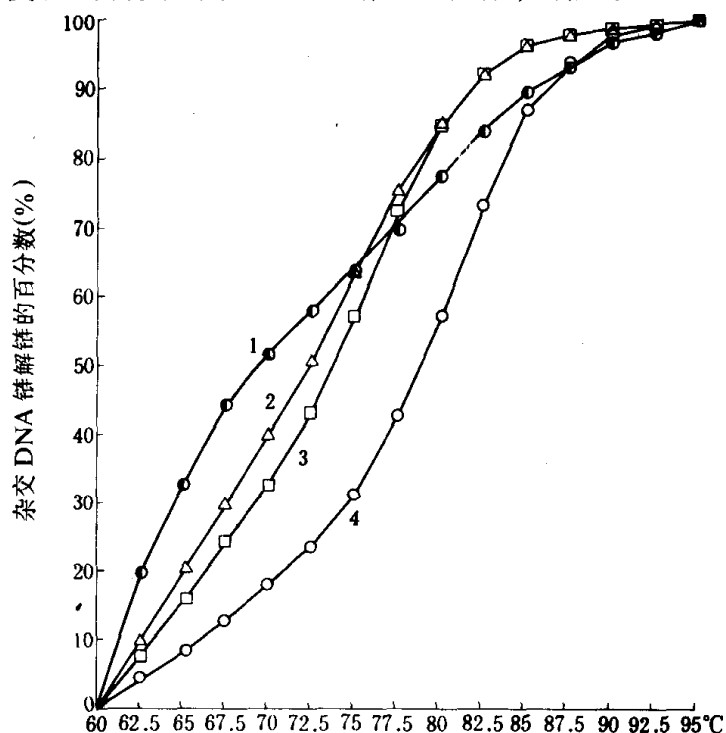


图 1 以扬子鳄单拷贝 DNA 为示踪 DNA 与其它三种鳄的单拷贝 DNA (驱动 DNA) 杂交及与扬子鳄单拷贝 DNA (驱动 DNA) 自交的 DNA 解链曲线

(1——扬子鳄 × 密河鳄, 2——扬子鳄 × 湾鳄, 3——扬子鳄 × 泰国鳄, 4——扬子鳄 × 扬子鳄)

表 1 以扬子鳄为示踪DNA,四种鳄之间的 DNA—DNA 杂交链解链一半时的相应温度(T_m)

扬子鳄 × 扬子鳄	扬子鳄 × 泰国鳄	扬子鳄 × 湾 鳄	扬子鳄 × 密河鳄
T_m 78.8	74.1	72.5	69.5
ΔT_m 0.0	4.7	6.3	9.3

从表 1 中 ΔT_m 可知扬子鳄与泰国鳄的亲缘关系最近,其次为湾鳄,最远为密河鳄。

2. 图2 是以密河鳄的单拷贝 DNA 为示踪 DNA,分别与扬子鳄、泰国鳄和湾鳄的驱动 DNA 杂交 DNA 解链曲线。

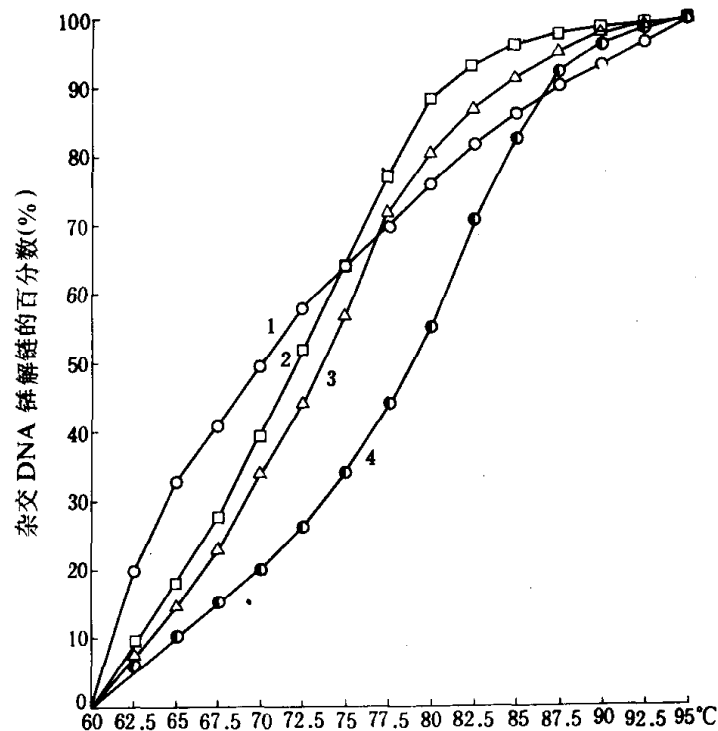


图 2 以密河鳄单拷贝DNA 为示踪 DNA 与其它三种鳄的单拷贝 DNA(驱动 DNA)杂交及与密河鳄单拷贝 DNA 自交复性DNA 解链曲线

(1——密河鳄 × 扬子鳄, 2——密河鳄 × 泰国鳄, 3——密河鳄 × 湾鳄, 4——密河鳄 × 密河鳄)

表 2 以密河鳄为示踪DNA,四种鳄之间的 DNA—DNA 杂交链解链一半时的相应温度(T_m)

密河鳄 × 密河鳄	密河鳄 × 湾 鳄	密河鳄 × 泰国鳄	密河鳄 × 扬子鳄
T_m 79.0	73.7	72.1	70.1
ΔT_m 0.0	5.3	6.9	8.9

从表 2 中的数据可看出与密河鳄亲缘关系最近的是湾鳄,其次是泰国鳄,最远的是扬子鳄。这一结果与表 1 是一致的。

3. 图 3 是以 $T_{50}H$ 表示的图 2 的各种杂交组合的 DNA 解链曲线。由于 $T_{50}H$ 是在 T_m 的数据中合并了累计的标准化的百分杂交率,在区分种间关系密切的物种时比 T_m 准确、灵敏。图中可见泰国鳄与湾鳄的曲线被拉开,然而扬子鳄与密河鳄的 ΔT_m 值很大,已超过了用 $T_{50}H$ 表示的范围(图中用虚线表示),因此在比较亲缘关系很远的物种,并不一定要用 $T_{50}H$ 表示。

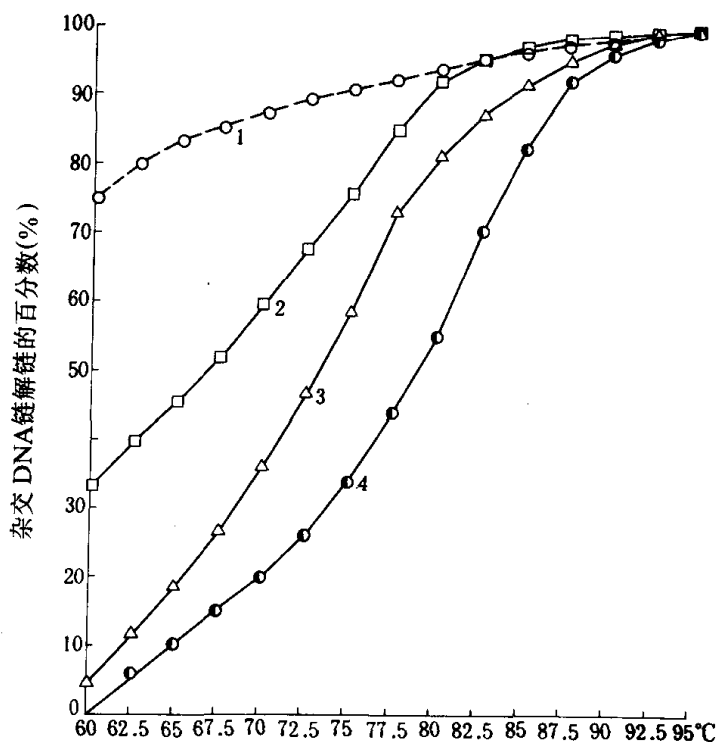


图3 以密河鳄单拷贝DNA为示踪DNA与其它三种鳄单拷贝DNA(驱动DNA)

杂交及与密河鳄单拷贝DNA(驱动DNA)自交复性DNA解链曲线

(1——密河鳄 × 扬子鳄, 2——密河鳄 × 泰国鳄, 3——密河鳄 × 湾鳄, 4——密河鳄 × 密河鳄)

4. 鳄的进化的时间的标定. 距今约65Ma前的白垩纪末, 欧亚大陆与北美被大西洋完全隔开, 则用65Ma除以扬子鳄与密河鳄的 ΔT_m 值(8.9—9.3), 表1, 2中的 $\Delta T_m 1.0$ 相当于7.0—7.38Ma, 平均7.2Ma, 即两物种DNA—DNA自交与杂交链的 ΔT_m 每相差1°C, 则它们在进化历程上相距7.2Ma.

5. 图4是根据表1的 ΔT_m 和标定的 $\Delta T_m 1.0$ 所代表的时间作出和四种鳄的种间关系图.

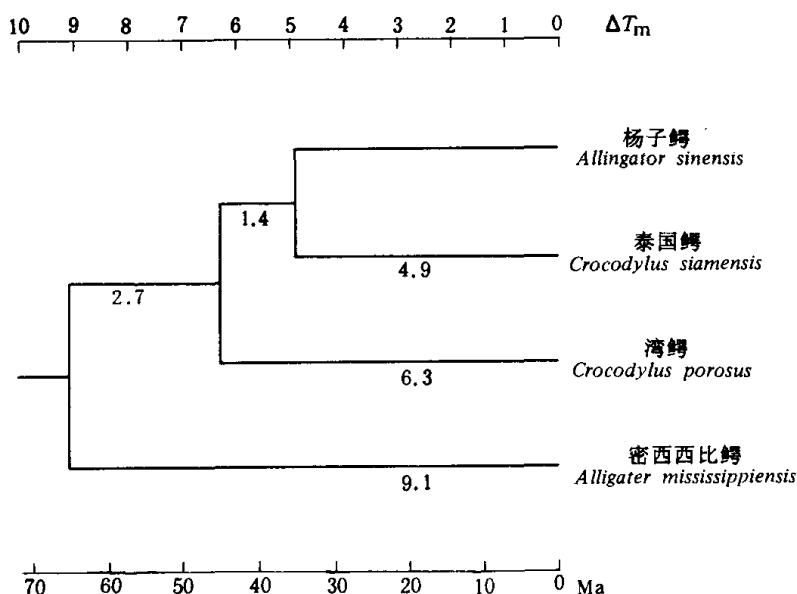


图4 四种鳄的种系发生图

扬子鳄与泰国鳄在 35Ma 前有一共同祖先, 扬子鳄与湾鳄在 45Ma 前有一共同祖先, 扬子鳄与密河鳄在 65 Ma 前有一共同祖先。

三、讨 论

1. DNA—DNA 杂交的理论根据

每个生物都有自己的祖先, 也都有自己的进化史。进化的资料记录和储存在 DNA 中, 因此研究生物进化的规律可追踪到核苷酸水平。比较物种间完整基因组的核苷酸序列是最理想的方法, 但脊椎动物的基因组十分庞大 ($\sim 3 \times 10^9$), 虽然美国已经开始了人的基因组工程规划的研究, 但预计本世纪不可能实用化, 因此 DNA—DNA 杂交法是当前比较物种间完整基因组的最实用的方法。由于去除了进化过程中变化较快的重复序列 DNA, 因此, DNA—DNA 杂交的结果稳定可靠。DNA—DNA 杂交的原理是: DNA 双链之间的碱基对 A—T 和 G—C 之间是以氢键结合的。当两个物种从一个共同的祖先那里开始分枝后, 它们的后裔发生的遗传变异通过传代不断被固定下来, 时间越长 DNA 双链中的碱基对的差异越大, 它们杂交链之间的不能形成 AT, GC 配对的地方也越多, 拆开这种杂交链所需的能量就越小。因此可以用 ΔT_m 或 $\Delta T_{50}H$ 作为两个物种从一个共同的祖先那里分枝后的差异的量变。 T_m 是 DNA 杂交双链解链一半时的温度; $T_{50}H$ 是把标准化的杂交百分率合并到 T_m 值中的一种数据处理法。使 ΔT_m 或 $T_{50}H$ 与从一个始祖种分化成不同谱系的已确定年代的地质事件联系起来, 就能标定出绝对时间与 ΔT_m 或 $\Delta T_m H$ 的对应关系。Sibley 根据澳洲与北美洲分隔的地质年代为 80Ma, 除以澳洲的三趾鸵鸟与北美洲的鸵鸟的 $\Delta T_{50}H$, 得到 $\Delta T_{50}H 1.0^\circ\text{C} = 4.5\text{Ma}$, 这个数值被用于计算鸟类、人猿超科的歧异时间, 用 DNA—DNA 杂交法测定物种进化年代的方法也称 DNA 钟^[9,10]。

蛋白钟是根据比较物种间相同蛋白质多肽链中氨基酸的差异与进化的时间的对应关系建立的一种研究种系发生关系的方法。然而一些蛋白质对维持生命活动起关键作用, 在进化上非常保守, 另一些蛋白质则变化较快。因此用蛋白钟标定的进化时间误差范围可达 20 倍之多^[10]。基因编码蛋白质, 而发生在蛋白质一级结构上的变化在密码三联体上有相应的变化, 但某些在蛋白质一级结构上不能反映的变化(遗传密码的简并性、内含子的突变)可在 DNA 水平上反映出来。虽然某些基因在某时也可能变得快些, 但另一些可能变得慢些, 由于基因组很大, DNA 的变化就相对稳定, 因此 DNA 钟比蛋白钟精确。

2. 鳄 DNA 钟的校正

我们标定的鳄类的 $\Delta T_m 1.0 \approx 7.2\text{Ma}$, 是 Sibley 在鸟类中标定时间的 1.3 倍。即鳄的 DNA 钟走得比鸟类和人类的 DNA 钟更慢, 这符合 DNA 钟快慢变化的范围。Britten 指出不同的生物的 DNA 变化的速率相差约 5 倍^[15]。

3. 扬子鳄与密河鳄发生年代的考证

化石资料表明, 扬子鳄出现在中国大陆的全新世, 中华鼈近似种(已灭绝)出现在中更新世以前, 一些始鼈(已灭绝)出现在中古新世和古新世^[17-19], 同时化石资料也说明我国史前生活着多种鳄和鼈, 始鼈未必是扬子鳄的直接祖先。密河鳄的化石出现在北美洲大约 30Ma 前的中渐新世, 类似于密河鳄的种类出现在 180 Ma 前^[20]。无疑, 密河鳄的化石比扬子鳄的化石更古老。我们的 DNA—DNA 杂交结果指出, 扬子鳄是较年轻的鳄种的结论是与化石资料一致的。

4. 扬子鳄起源的假说

迄今为止对鳄目的分类有不同意见。在科一级上是在分为鳄科、鼈科和食鱼鳄科还是分为鳄科(下设鳄亚科、鼈亚科和马来鳄亚科)和食鱼鳄科有分歧。日本学者青木认为鼈亚科与鳄亚科差异颇大,应独立为科。在属一级水平上,也有分为 8 属 21 种或 9 属 25 种等不同意见,分类学上的分歧也反映了在种间关系研究的薄弱。我们的 DNA — DNA 杂交实验提供了四种鳄的种间关系遗传背景的明确数据, ΔT_m 表明扬子鳄和密河鳄是相距很远的种。四种鳄的杂交组合的 ΔT_m 排除了泰国鳄或湾鳄的祖先同是扬子鳄与密河鳄的祖先的可能性,剩下两种种间关系的可能性为密河鳄 → 湾鳄 → 泰国鳄 → 扬子鳄或扬子鳄 → 泰国鳄 → 湾鳄 → 密河鳄。由于化石资料表明密河鳄比扬子鳄更古老,加之扬子鳄、泰国鳄、湾鳄都生活在亚洲,可以断定:密河鳄 → 湾鳄 → 泰国鳄 → 扬子鳄是合理的进化途径。不过并不是密河鳄的直系后代进化为扬子鳄,而是通过一个密河鳄分枝出来的过渡类型(现代湾鳄的祖先)在亚洲进化而来。在 65Ma 前后,欧亚大陆与北美洲已被大西洋隔开,但在始新世结束前仍有一些陆桥相联,随着海水的涨落,一些岛屿就是鳄迁徙的很好的中转站,使这种迁徙方式更容易进行。湾鳄又称咸水鳄,喜欢栖息在海湾,又善于长距离游泳,因此它的分布范围很广,沿着东南亚的海岸,在印度、斯里兰卡、中国南部(已灭绝)、马来群岛、索罗门群岛和澳大利亚都有它的踪迹。很可能湾鳄的祖先在 45Ma 前迁徙到亚洲,其中一枝滞留在东南亚热带的淡水水域,进化发展成泰国鳄;另一枝(或泰国鳄的祖先已适应了淡水生活)沿江河内陆北上,进化成扬子鳄。扬子鳄仍保留有盐腺说明它们的祖先曾生活在海洋中。Cohen^[4] 从鳄目染色体的研究暗示了鼈和鳄之间的关系,只需一次染色体倒位湾鳄的染色体核型就可变成泰国鳄的染色体核型。但需要一次染色体并合、两次染色体倒位才能变成扬子鳄的染色体核型。我们的 DNA — DNA 杂交结果指出了鼈和鳄之间的遗传距离和在进化过程中的相互关系,泰国鳄和湾鳄的 ΔT_m 接近与经典分类学把它们分入鳄科是一致的。然而扬子鳄与密河鳄间的 ΔT_m 值很大,显示了两者的遗传距离较大,而且泰国鳄与湾鳄的遗传距离处在扬子鳄与密河鳄之间,这是我们的 DNA — DNA 杂交结果与经典分类学的不同之处。

四、结 论

(1) DNA 杂交结果表明扬子鳄在 35Ma 前与泰国鳄有一个共同祖先。在 45Ma 前与湾鳄有一个共同祖先。而在 65Ma 前与密河鳄有一个共同祖先。

(2) 在四种鳄中,密河鳄和扬子鳄间的遗传距离最远,说明在白垩纪末期欧亚大陆分隔后,两者一直处于遗传隔离状态。扬子鳄是亚洲发生的较年轻的种类。

(3) 由于泰国鳄和湾鳄的遗传距离处于扬子鳄与密河鳄之间,而且更接近密河鳄,因此湾鳄的祖先很可能是扬子鳄种系形成过程中的过度类型。鼈与鳄似乎是可以相互进化的。

(4) 鳄的 DNA 的变化速率比鸟类和哺乳类更缓慢,这可以解释鳄类(或许是爬行类)进化缓慢的原因。

作者对张燕生同志协助采集血样,特此致谢。

参 考 文 献

[1] Fauvel, A.A., *China branch, Royal Asiatic Soc. New Series*, 13(1879), 1 — 36.

- [2] Mook, C. H. C., *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.*, **48**(1932), 553 — 562.
- [3] 陈壁辉等, 扬子鳄, 安徽科学技术出版社, 1985.
- [4] Cohen, M. M. & Gans, C., *Cytogenetics*, **9**(1970), 81 — 105.
- [5] 莫鑫泉等, 遗传学报, **15**(1988), 6: 436 — 441.
- [6] Myrna, E. W., *Animal Kingdom*, **89** (1986), 5: 34 — 39.
- [7] *Van Nostrand's Scientific Encyclopedia*, Sixth Edition, Van Nostrand Reinhold Company Inc., 1983.
- [8] Britten, R. J. & Kohne, D. E., *Science*, **161**(1968), 529 — 540.
- [9] Sibley, C. G. & Ahlquist, J. E., *Scientific American*, **254** (1986), 2: 68 — 78.
- [10] Sibley, C. G. & Ahlquist, J. E., *J. Mol. Evol.*, **20**, (1984), 2 — 15.
- [11] O'Brien, S. J. et al., *Nature*, **317** (1985), 140 — 144.
- [12] Catzeflis, M. F. et al., *J. Mol. Evol.*, **29** (1989), 223 — 232.
- [13] Springer, M. S. et al., *ibid.*, **30** (1990), 298 — 311.
- [14] Brunk, C. F. & Olson, E. C., *ibid.*, **30** (1990), 191 — 192.
- [15] Commerford, *Biochemistry*, **10** (1971), 11: 1993 — 1999.
- [16] Britten, R. J., *Science*, **231** (1986), 1393 — 1398.
- [17] 曹克清, 两栖爬行动物学报, **3** (1986), 3: 73 — 76.
- [18] 黄象洪、曹克清, 古脊椎动物与古人类, **16** (1978), 1: 60 — 66.
- [19] 杨钟健, 古脊椎动物与古人类, **8** (1964), 2: 187 — 209.
- [20] Gartside, D. F., Dessauer, H. C. & Joanen, T., *Biochem. Genet.*, **15** (1977), 655 — 663.