

从 12S rRNA 基因序列探讨 8 种鳄类的系统学关系*

吴孝兵 王义权** 周开亚 童宗中

聂继山 王朝林 谢万树

(南京师范大学遗传资源研究所, 南京 210097)

(安徽师范大学生命科学学院, 安徽芜湖 241000)

(安徽省扬子鳄繁殖研究中心, 安徽宣城 230042)

摘要 测得扬子鳄 (*Alligator sinensis*) 和暹罗鳄 (*Crocodylus siamensis*) 的 mtDNA 12S rRNA 基因片段的部分序列, 与 GenBank 中的 2 种鳄及文献中 4 种鳄的 12S rRNA 基因相应片段, 经比对后构建系统树。其结果显示, 现存鳄类为单系起源, 可划分为 3 个科, 即: 鳄科、食鱼鳄科和假食鱼鳄科。食鱼鳄与假食鱼鳄亲缘关系较近, 支持将假食鱼鳄作为食鱼鳄科的一个属, 与以形态学为基础的研究结果不同。在钝吻鳄科中, 扬子鳄与凯门鳄亲缘关系较远, 而与密西西比鳄的亲缘关系虽较近, 但它们的确存在很多差异, 两者 12S rRNA 基因序列差异达 12.12%, 碱基的颠换数为 9。在基于碱基转换和颠换的 NJ 系统树及仅基于碱基颠换的 NJ 系统树中, 前者支持扬子鳄与密河鳄间的亲缘关系较近, 而后者支持扬子鳄与凯门鳄间的亲缘关系较近, 说明扬子鳄与密河鳄间亲缘关系是值得研究的问题。因本文仅根据 12S rRNA 基因部分序列来进行分析的, 尚需进一步研究。

关键词 鳄 12S rRNA 基因 DNA 序列 分子进化

世界鳄类现存仅 23 种, 但在分类上却较为混乱。主要观点有: 认为它们隶属鳄目 (Crocodylia) 鳄科 (Crocodylidae) 三个不同的亚科: 钝吻鳄亚科 (Alligatorinae)、鳄亚科 (Crocodylinae) 和食鱼鳄亚科 (Gavialinae), 假食鱼鳄为鳄亚科中的一个属即假食鱼鳄属 (*Tomistoma*), 钝吻鳄科有钝吻鳄属 (*Alligator*) (鼈属) 和凯门鳄属 (*Caiman*) 等 (Alderton, 1991); 认为它们应分别都提升为科, 即钝吻鳄科 (Alligatoridae)、鳄科 (Crocodylidae) 和食鱼鳄科 (Gavialidae), 假食鱼鳄作为鳄科中的一个属 (Wermuth, 1953);

在第二种观点的基础上, 有人将假食鱼鳄并入食鱼鳄科; 有的学者将鳄目分成二个科, 即食鱼鳄科和鳄科, 鳄科中分为鳄亚科和钝吻鳄亚科 (鼈亚科) (张孟闻等, 1998); 以上的分类观点各不一致。

钝吻鳄属现存扬子鳄 (*Alligator sinensis*) 和密河鳄 (*Alligator mississippiensis*) 两种。Fauvel (1897) 发现扬子鳄和鳄属有很大差异, 与钝吻鳄属接近, 将其列入钝吻鳄属中, 并命名而公之于世 (Fauvel, 1879)。此后, 尽管很多学者对此提出过

疑问, 但其分类地位则一直未变。鉴于扬子鳄与同属的密河鳄在头骨等骨骼特点上存在较大的差异 (Deraniyagala, 1947; Mook, 1921), Deraniyagala (1947) 年建议成立新属 *Caigator*, 后来, 他又撰文对扬子鳄属的分类作了进一步的肯定, 但一直未被学术界接受; 组织学研究结果同样也表明, 扬子鳄和密河鳄在很多方面存在明显的差异 (陈壁辉等, 1989; 1991; 吴孝兵等, 1993); 有些学者运用了染色体组型 (Cohen *et al.*, 1970)、生化和免疫学技术等研究手段 (Densmore, 1983), 对扬子鳄、密西西比鳄及其它鳄类的系统关系作过比较研究, 但意见不一; 莫鑫泉等 (1991) 用 DNA-DNA 分子杂交的方法研究了扬子鳄、密河鳄、暹罗鳄 (*Crocodylus siamensis*) 和湾鳄 (*Crocodylus porosus*) 四种鳄的亲缘关系, 得出了扬子鳄与密河鳄的亲缘关系较远的结论, 这对扬子鳄和密河鳄间的分类关系又一次提出挑战; 陈壁辉 (1993) 亦综合前人的研究结果和头骨测量数据的分析, 对扬子鳄的属名问题提出疑问。

现代分子生物学技术已越来越多地应用于物种间亲缘关系分析。12S rRNA 基因是线粒体基因组

2000-01-25 收稿, 2000-11-24 修回

* 本文为江苏省“333 工程”人才培养基金、安徽省自然科学基金 (99042419) 和安徽省跨世纪人才培养基金资助

** 通讯作者

第一作者简介 吴孝兵, 男, 36 岁, 博士, 教授, 研究方向: 动物分子生物学。E-mail: yxbwu@263.net

的基因之一,在进化上较为保守,通常被用于分子进化和系统发生的研究 (Knight *et al.*, 1994; Gasteley, 1992; Honda, 1999; Medina *et al.*, 2000)。在鳄类亲缘关系研究中, Aggarwal 等 (1994) 研究了 18 种鳄 Bkm 探针的指纹图谱, 分析了其属间的亲缘关系; Gasteley (1992) 以 12S rRNA 基因序列为基础分析了 4 种鳄亲缘关系, 但均未对扬子鳄的分类问题进行过探讨。本文拟通过 12S rRNA 基因的序列分析, 对扬子鳄与密河鳄等的系统关系进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

用于测序的扬子鳄 3 个个体, 2 个, 1 个, 均来自安徽省扬子鳄繁殖研究中心, 取肌肉或肝脏, 于 -20℃ 冻存待用; 暹罗鳄 2 个个体, 均为雄性, 来自南京红山动物园, 取肌肉冻存于 -20℃ 中待用。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取和 PCR 扩增 根据 Sambrook 等方法, 从冻存样品中提取总 DNA。扩增 12S rRNA 基因片段的引物为 L1091: 5'-AAACTGGGATTA-GATACCCAC TAT-3' (删去原引物 5 端 10 bp) 和 H1478: 5'-GAGGGT GACGGCGGTGTGT-3' (Kocher 等, 1990)。12S rRNA 基因片段的 PCR 循环参数如下: 95℃ 预变性 4 min, 95℃ 40 s, 57℃ 40 s, 72℃ 40 s, 循环数为 30; 循环结束后 72℃ 延伸 5 min。

1.2.2 DNA 序列测定 用 ABI 310 遗传分析仪 (Perkin Elmer 公司) 测序, 测序试剂为该公司的 ABI Prism™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit。对所测的样品进行双向测序。

将测得的序列连同从 GenBank 中查得的密河鳄 (accession No. Y13113) 及美洲鳄 (*Crocodylus acutus*) (accession No. U95670) 的 12S rRNA 基因的相应序列进行比对。用 MEGA 软件中基于 Kimura 双参数模型中的邻接法 (neighbor-joining), 以乌龟 (*Chinemys reevesii*) 作外群, 构建 8 种鳄的分子系统树。

2 结果

2.1 12S rRNA 基因片段

本实验共得到扬子鳄和暹罗鳄的 mtDNA 12S rRNA 基因序列长度分别为 398 bp 和 402 bp, DNA 序列已送 GenBank (accession No. AF237577, AF237578)。所测定扬子鳄 3 个个体和暹罗鳄 2 个个体的该 DNA 序列均为一致, 没有变异; 将序列与 GenBank 中获得的密河鳄和美洲鳄的相应序列进行比对位排列后, 得到 410 bp 的同源序列, 其中多态位点 118 个, 占总位点数的 28.78%, 同时从 Gasteley (1992) 的文中获得了四种鳄的 12S rRNA 基因相应序列进行分析, 得到同源序列约 281 bp, 在上述 8 种鳄中, 共有多态位点 108 个, 占总位点数的 38.43%。

经分析, 钝吻鳄属的扬子鳄与密河鳄的碱基差异达 12.12%, 碱基的颠换数和转换数分别为 23 和 9 (表 1); 而鳄属的暹罗鳄与美洲鳄的碱基差异仅为 5.22%, 碱基的颠换数和转换数分别为 13 和 1; 古巴鳄 (*Crocodylus rhombifer*) 与暹罗鳄、美洲鳄碱基差异仅分别为 4.12% 和 1.12%, 碱基的颠换数分别为 10 和 3, 转换数分别为 1 和 0; 食鱼鳄与假食鱼鳄间的碱基差异为 5.60%, 碱基的颠换数和转换数分别为 12 和 3。

表 1 8 种鳄间的 12S rRNA 281 bp 序列替代 (转换/颠换) (对角线以上) 及碱基差异百分比 (对角线以下)

Table 1 Numbers of transition/transversion (above diagonal) and percentage of difference (below diagonal) for 12S rRNA gene fragment sequences

OTUS	1	2	3	4	5	6	7	8
1. 凯门鳄 <i>Caiman crocodilus</i>		38/26	32/28	43/26	39/15	38/10	45/27	40/26
2. 古巴鳄 <i>C. rhombifer</i>	24.71		17/15	14/16	30/25	30/22	10/1	3/0
3. 食鱼鳄 <i>G. gangeticus</i>	23.44	12.31		12/3	26/24	25/23	22/16	19/15
4. 假食鱼鳄 <i>T. schlegelii</i>	26.95	11.54	5.60		31/22	35/21	15/17	16/16
5. 密河鳄 <i>A. mississippiensis</i>	20.61	20.91	18.59	20.46		23/9	34/26	32/25
6. 扬子鳄 <i>A. sinensis</i>	18.32	19.85	18.60	21.71	12.12		35/23	32/22
7. 暹罗鳄 <i>C. siamensis</i>	27.80	4.12	14.56	12.26	22.81	22.14		13/1
8. 美洲鳄 <i>C. acutus</i>	25.48	1.12	13.03	12.26	21.67	20.61	5.22	

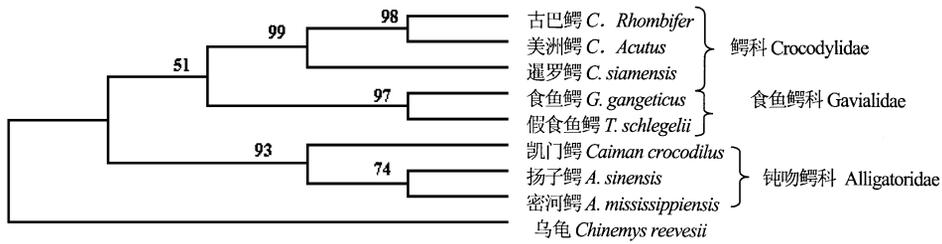


图 1 基于碱基转换和颠换的 Kimura 双参数模型, 用 NJ 法构建的鳄类 12S rRNA 基因的分子系统树

Fig. 1 Phylogenetic tree (by transition and transversion) inferred from partial mitochondrial 12S rRNA gene sequences of 8 crocodiles and 1 outgroups using NJ method with Kimura 2-parameter distance

分支上方的数字为自引导值来自 1 000 个复制品 (Bootstrap values derived from 1 000 replication were indicated above branches)

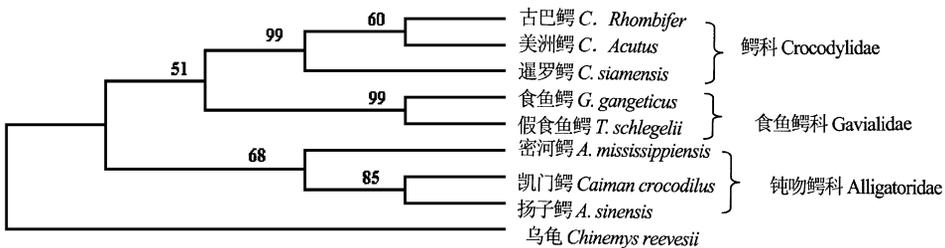


图 2 基于碱基颠换的 Kimura 双参数模型, 用 NJ 法构建的鳄类 12S rRNA 基因的分子系统树

Fig. 2 Phylogenetic tree inferred (only by transversion) from partial mitochondrial 12S rRNA gene sequences of 8 crocodiles and 1 outgroups using NJ method with Kimura 2-parameter distance

分支上方的数字为自引导值来自 1 000 个复制品 (Bootstrap values derived from 1 000 replication were indicated above branches)

2.2 系统树的构建

在对以上物种的 DNA 序列构建系统树时, 考虑到龟类与鳄类的亲缘关系较近 (Hedges *et al.*, 1999), 故选取乌龟 (*Chinemys reevesii*) 作外群, 序列来自 GenBank (accession No. AF04338), 在考虑所有碱基替代 (转换 + 颠换) 条件下, 利用 NJ 法构建系统树结果见图 1; 如果在仅考虑颠换的条件下, 用 NJ 法构建的系统树结果见图 2。

从 12S rRNA 基因序列构建系统树的结果来看, 8 种鳄可分为二大支, 食鱼鳄科的食鱼鳄和鳄科的假食鱼鳄与鳄科的其他鳄类组成一支, 自引导值为 51%, 而支持食鱼鳄和假食鱼鳄聚为一起的自举检验值为 97%; 其中鳄属中的古巴鳄与美洲鳄亲缘关系较近; 钝吻鳄科的密河鳄和扬子鳄及凯门鳄聚为一起, 但在仅考虑颠换的条件下, 扬子鳄与凯门鳄聚类后, 再与密河鳄相聚; 但食鱼鳄和假食鱼鳄仍聚在一起, 且自引导值达 99%。

3 讨论

长颌鳄类的食鱼鳄和假食鱼鳄的系统关系存在较大的争议。以前的研究主要有两种观点, 一种是基于形态学性状的研究, 认为食鱼鳄是现存所有鳄类的姐妹群, 而假食鱼鳄是作为鳄科形成单系群的一部分 (Tarsitano *et al.*, 1989); 另一种是基于生化证据如同功酶、免疫扩散实验、蛋白质指纹比较及分子生物学证据如 RFLP、微卫星 DNA 指纹 (Densmore, 1983; Aggarwal *et al.*, 1994; Densmore *et al.*, 1989), 认为食鱼鳄和假食鱼鳄与现存鳄形成一姐妹群。在本文研究的 12S rRNA 基因序列的系统树中, 现存鳄类为单系进化, 假食鱼鳄为代表鳄科的一个属, 但它与食鱼鳄的分子系统关系很近, 支持它们聚为一起的自引导值达 97%, 而在仅考虑颠换条件下, 支持它们聚为一起的引导值达 99%, 支持第二种观点; 但在本文中, 两种条件下的聚类都表明, 食鱼鳄和假食鱼鳄并不是与

其它的鳄类形成姐妹群, 而仅与鳄科形成姐妹群, 它们形成的单系再与钝吻鳄科形成姐妹群。钝吻鳄科中扬子鳄与密河鳄关系较近, 支持传统的分类观点。同时从支序图来看, 食鱼鳄和假食鱼鳄聚为一支后, 再与鳄科的鳄属构成一姐妹群, 而鳄科与食鱼鳄科再与钝吻鳄科构成一姐妹群, 所以, 将钝吻鳄科划为鳄科的一个亚科的观点(张孟闻等, 1989) 本文不予支持; 食鱼鳄虽与假食鱼鳄聚为一支, 但两者碱基差异仅 5.60%, 从表 1 来分析, 这种差异仅在属间变异范围内, 因此, 从 12S rRNA 基因片段序列分析的角度, 本文支持假食鱼鳄是食鱼鳄科的一个属的观点, 不支持将其提升为假食鱼亚科(张孟闻等, 1989)。在钝吻鳄科中, 扬子鳄与密河鳄聚在一起, 两者间的亲缘关系较近, 而与凯门鳄的关系较远; 对扬子鳄头骨测量的数据与密河鳄、眼镜鳄、骨喉鳄及湾鳄进行了比较, 发现扬子鳄与眼镜鳄的距离最近, 而与密河鳄距离较远(陈壁辉, 1993), 与本文的结果有差距; 同时 DNA-DNA 杂交重聚动力学表明: 在扬子鳄、密河鳄、湾鳄和暹罗鳄中, 前两者亲缘关系最远, 而与暹罗鳄关系最近(莫鑫泉等, 1991); 本文得出的结果与 DNA-DNA 杂交重聚动力学方法所得到的结果截然不同, 可能与不同的研究方法有关。

关于扬子鳄与密河鳄是否归于一属, 在约一个世纪前就已提出疑问(Mook, 1921)。继 Bouglenger 观察到扬子鳄与眼镜鳄相似的特征后, Deraniyagala 认为扬子鳄与眼镜鳄之间在头骨等特征上存在 10 个相似特征, 而与密河鳄仅有 2 个相似特征, 并在 1947 年和 1951 年先后两次提出将扬子鳄独立成为一属: *Caigator* 属(Deraniyagala, 1947), 这种观点一直未引起足够重视, 但是扬子鳄和密河鳄之间的差异的确存在。从背腺和舌腺的功能来看, 扬子鳄成体中背腺退化, 而密河鳄成体具有背腺, 扬子鳄舌腺具有泌盐功能, 而密河鳄虽生活于淡咸水交界处, 但并无泌盐功能(陈壁辉等, 1991; 陈壁辉, 1989), 这表明扬子鳄与密河鳄在起源上可能存在一定的差异; 同时, 在视觉器官组织结构上, 扬子鳄与密河鳄亦存在一定的差异(吴孝兵等, 1993)。此外, 扬子鳄与密河鳄染色体的臂间倒位和互相易位造成染色体间显著的统计学

差异(Cohen *et al.*, 1970)。现代分子生物学的研究亦显示了扬子鳄与密河鳄之间的差异性, DNA-DNA 杂交的重聚动力学研究表明, 扬子鳄与密河鳄的关系, 比隶属不同科的暹罗鳄和湾鳄距离还远(莫鑫泉等, 1991)。尽管 Densmore (1983) 利用生物化学和免疫学技术研究现存鳄亲缘关系时认为扬子鳄与密河鳄关系较近, 但他同时指出这两种鳄间的蛋白质的相似性较同属其它种间的同源性要小; 这实际上同样说明了扬子鳄与密河鳄虽被聚为一支, 但它们之间较大的差异是客观存在的。

从本文研究的 12S rRNA 基因序列结果来看, 扬子鳄与密河鳄之所以聚为一支, 是因为它们之间没有过渡的近缘物种的存在。从它们 mtDNA 的 12S rRNA 序列差异来看, 两者碱基差异为 12.12%, 而鳄科鳄属的种间差异, 古巴鳄和暹罗鳄间差异为 4.12%, 与美洲鳄间差异为 1.12%, 暹罗鳄与美洲鳄间差异为 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也仅为 12.26%, 与扬子鳄和密河鳄的碱基差异率相当; 再从碱基的颠换数来看, 属内的颠换数为: 古巴鳄与暹罗鳄的颠换数为 1, 古巴鳄与美洲鳄的颠换数为 0, 暹罗鳄与美洲鳄的颠换数为 1, 而属间的颠换数为: 眼镜鳄与扬子鳄的颠换数为 10, 而扬子鳄与密河鳄的颠换数为 9, 所以在仅基于颠换条件下, 用 NJ 法聚类的结果中, 可看到扬子鳄和凯门鳄关系较扬子鳄和密河鳄的关系更近, 而且这一观点也得到了形态学证据的支持。陈壁辉(1993)对扬子鳄头骨的测量数据与密河鳄、眼镜鳄、骨喉鳄及湾鳄进行了比较, 发现扬子鳄与眼镜鳄的距离最近, 而与密河鳄距离较远。从以上 2 种不同的结果来看, 同为一属的扬子鳄与密河鳄的系统学位置是值得进一步研究的。但我们考虑到单纯从线粒体 DNA 基因的序列来解决这一问题尚存在不足之处, 因此, 还需更多的研究来进一步证实和定论。

致谢 承蒙安徽师范大学生物系陈壁辉教授审阅文稿、徐信荣先生帮助收集样品, 特此一并致以衷心的感谢!

参 考 文 献 (References)

- Aggarwal, R. K., K. C. Majumdar, J. W. Lang and L. J. Singh 1994 Genetic affinities among crocodylians as revealed by DNA fingerprinting with a Bkmr derived probe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10 606 ~ 10 609.

- Alderton, D. 1991 *Crocodile and Alligator of the World*. U K: Blandford Publishing, 120 ~ 122.
- Buffetaut, E. 1979 The evolution of the crocodylians. *Scientific American* **241** (4): 130 ~ 144.
- Chen, B. H. 1993 The status of the genus name of the Chinese alligator. In: *Proceedings of the First Asian Herpetological Meeting*. Beijing: China Forestry Press, 18 ~ 22. [陈壁辉 1993 扬子鳄属名研究现状. 见: 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, 18 ~ 22.]
- Chen, B. H., J. Y. Tang and Y. X. Wei 1989 The lingual glands of the Chinese alligator. *Acta Zool. Sin.* **35** (1): 28 ~ 32. [陈壁辉, 唐剑云, 魏运鑫 1989 扬子鳄的舌腺. *动物学报* **35** (1): 28 ~ 32]
- Chen, B. H., X. L. Jiang and C. L. Wang 1991 Structure and development of the integumental glands of the Chinese alligator. *Acta Zool. Sin.* **37** (1): 16 ~ 21. [陈壁辉, 蒋小林, 王朝林 1991 扬子鳄皮肤腺结构与发育的初步观察. *动物学报* **37** (1): 16 ~ 21.]
- Cohen, M. and M. C. Gans 1970 The chromosomes of the order crocodile. *Cytogenetics* **9**: 81 ~ 105.
- Densmore, L. D. and R. D. Owen 1989 Molecular systematic of the order crocodylia. *Amer. Zool.* **29**: 831 ~ 841.
- Densmore, L. D. 1983 Biochemical and immunological systematic of the order crocodylia. In: *Evolution Biology*, Vol. 16. Plenum Press, 397 ~ 465.
- Deraniyagala, P. E. P. 1947 A new genus for the Chinese alligator. *Proceedings of the Third Annual Sessions of the Ceylon Association of Science Pt. 2*: 12.
- Fauvel, A. 1879 Alligators in China. Shanghai: Journal of the North-China Branch of the Royal Asiatic Society, New Series **13**: 1 ~ 36.
- Gatesy, J. 1992 Sequence similarity of 12S ribosomal segment of mitochondrial DNAs of Gharial and false Gharial. *Copeia* **1**: 241 ~ 243.
- Hedges, S. B. and L. L. Poling 1999 A molecular phylogeny of reptiles. *Science* **283**: 998 ~ 1001.
- Honda, M., H. Ota, M. Kobayashi and T. Hikida 1999 Phylogenetic relationships of Australian skinks of the Mabuya group (Reptilia: Scincidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Genes Genet Syst.* **74** (4): 135 ~ 139.
- Knight, A and D. P. Mindell 1994 On the phylogenetic relationship of Colubrinae, Elapidae, and Viperidae and the evolution of front-fanged venom systems in snakes. *Copeia* **1**: 1 ~ 9.
- Kocher, T. D., W. K. Thomas, A. Mayer, A. Meyer, S. V. Edwards, S. Paabo, F. X. Villablanca and A. C. Wilson 1989 Dynamics of mitochondrial evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 6196 ~ 6200.
- Medina, M. and P. J. Walsh 2000 Molecular systematics of the order anaspeidea based on mitochondrial DNA sequence (12S, 16S, and COI). *Mol. Phylogenet Evol.* **15** (1): 41 ~ 58.
- Mo, X. Q., T. J. Zhao and P. C. Qin 1991 The origin of *Alligator sinensis*. *Science in China Ser. B* **10**: 1047 ~ 1053. [莫鑫泉, 赵铁军, 秦鹏春 1991 扬子鳄的起源. *中国科学 (B)* **10**: 1147 ~ 1153.]
- Mook, C. C. 1921 Skull characters of recent crocodylia with notes on the affinities of the recent genera. *Bulletin of the American Museum of Natural History* **44** (13): 123 ~ 268.
- Simon, C., F. Frati and A. Beckenbach, B. Chespi. H. Liu and P. Flook 1994 Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial polymerase chain reaction primers. *Annals of The Entomological Society of America* **87** (6): 651 ~ 686.
- Tarsitano, S. F., E. Frey and J. Riess 1989 The evolution of the crocodylia: a conflict between morphological and biochemical data. *Amer. Zool.* **29**: 834 ~ 856.
- Wermuth, H. 1953 Systematik der Rezenten Krokodile. *Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum im Berlin* **29** (2): 375 ~ 514, Figs. 1 ~ 66.
- Wu, X. B., B. H. Chen and C. L. Wang 1993 Histology of visual organ in Chinese alligator. *Acta Zool. Sin.* **39** (3): 244 ~ 250. [吴孝兵, 陈壁辉, 王朝林 1993 扬子鳄视觉器官组织学研究. *动物学报* **39** (3): 244 ~ 250.]
- Zhang, M. W., Y. Zong and J. F. Ma 1998 Reptilia. In: *Fauna Sinica*, Vol. 1. Beijing: Science Press, 166 ~ 168. [张孟闻, 宗愉, 马积藩 1998 中国动物志, 爬行纲 (第一卷). 北京: 科学出版社, 166 ~ 168.]

外 文 摘 要 (Abstract)

SYSTEMATIC RELATIONSHIPS OF 8 CROCODILIAN SPECIES
SUGGESTED BY 12S rRNA GENE SEQUENCE*WU Xiao-Bing WANG Yi-Quan ** ZHOU Kai-Ya TONG Zong-Zhong
NIE Ji-Shan WANG Chao-Lin XIE Wan-Shu

(Institute of Genetic Resources, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

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

(Anhui Breeding and Research Center of Chinese Alligator, Xuancheng 242034, Anhui, China)

The systematic relationship among crocodiles was the focus of study and debate during the past century, but a general consensus has not been reached yet. Two main issues were concerned: one was that false gharial should be placed in Crocodylidae or Gavialidae, and the other, a traditional explanation on the status of Chinese alligator (*Alligator sinensis*) is to place it in genus *Alligator* together with American alligator (*Alligator mississippiensis*). The controversy on this issue has arisen after it named, though it has not been under intensive debate. In order to address these, the 12S ribosomal RNA gene fragment of Crocodiles (2 individuals) and 1 alligator (2 individuals) were sequenced using ABI310 Genetic Analyzer, and aligned with published sequences of 6 crocodile species in this paper. The sequences were submitted to GenBank (Accession No. AF237577, AF237578). When the turtle was used as an outgroup, crocodile were found to be a significant monophyletic groups, *Tomistoma schlegelii* and *Gavialis gangeticus* was found as the extant sister taxa to all other living Crocodylidae in NJ phylogenetic tree, which is different from the hypothesis based on the morphological analysis. Although, the NJ trees by transition and transversion revealed closer relationship between *Alligator sinensis* and *A. mississippiensis* (71% confidence value), the divergency between them also existed in morphology, biochemistry and molecular data. In this paper, the difference of 12S rRNA gene sequences reaches 12.12% and 9 transversions in Chinese alligator and American alligator. However, the phylogenetic tree contributed only by transversion from partial mitochondrial 12S rRNA gene sequences using NJ method showed the closer relationship between *A. sinensis* and *C. crocodylus* with a higher confidence value (85%), which the result is also supported by some morphological characters. This preliminary research shows that the traditional view may be challenged by molecular data. The authors hypothesize that the classification relationship between Chinese alligator and American alligator should be studied with more molecular markers.

Key words Crocodiles, 12S rRNA gene, DNA sequence, Molecular evolution

* This work was sponsored by the Anhui Natural Science Foundation (No. 99042419) and the Special Fund for Training Discipline Leader in Anhui

** Corresponding author