

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

紅果蠅與輝顏果蠅的種間生殖隔離機制(II)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2313-B-002-335-

執行期間：91 年 08 月 01 日至 92 年 07 月 31 日

執行單位：國立臺灣大學昆蟲學系暨研究所

計畫主持人：張慧羽

計畫參與人員：陳建甫、王小翠、戴佑達、張德斌

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 31 日

行政院國家科學委員會專題研究計劃成果報告

紅果蠅與輝顏果蠅種間的隔離機制

Reproductive isolation between *Drosophila albomicans* and *D. nasuta*

計畫編號： NSC 91-2313-B-002-335

執行期限： 91 年 8 月 1 日 至 92 年 7 月 31 日

主持人：張慧羽 國立台灣大學昆蟲學系

E-mail: hwei@ntu.edu.tw

一、中文摘要

在實驗室中雜交時紅果蠅 (*Drosophila albomicans*) 與輝顏果蠅 (*D. nasuta*) 有交尾後生殖隔離 (postmating isolating mechanism) 但不明顯。自然族群中紅果蠅與輝顏果蠅地理分布雖然很接近但尚未發現雜交個體，再加上這兩種果蠅的染色體核型 (karyotype) 截然不同 (紅果蠅為 $2n=6$ 而輝顏果蠅為 $2n=8$)。在自然界中隔絕兩者基因交流之因素的探究，是研究族群分化 (population differentiation) 乃至於物種形成 (speciation) 的良好題材。

實驗的設計是用來觀察紅果蠅與輝顏果蠅交尾前生殖隔離 (premating)。實驗中採用印度的輝顏果蠅與六個不同地理區的紅果蠅進行交尾選擇實驗。因為在種化之初生殖隔離尚不完備，紅果蠅與輝顏果蠅不同地理族群間是否已產生了不同型式的生殖隔離是本實驗的研究重點。

實驗結果顯示泰國與沖繩的紅果蠅產生了初步的交尾前生殖隔離，其他地區 (廣東、台灣、日本本州) 紅果蠅的交尾前生殖隔離則不明顯。

關鍵詞：物種形成、紅果蠅、輝顏果蠅、生殖隔離

Abstract

Drosophila albomicans and *D. nasuta* show a little but not significant postmating isolation. However, no hybrids have ever been found in nature anywhere including the area near the border, and they have different karyotypes ($2n=6$ in *D. albomicans* and $2n=8$ in *D. nasuta*). Therefore it's interesting to know what factors prevent gene flow between them. They are good material to realize population differentiation as well as speciation.

The experiments were designed to investigate the premating isolation between *D. albomicans* and *D. nasuta*. The materials used in the experiments include one *D. nasuta* and six *D. albomicans* stocks from different geographic regions. Due to the incomplete reproductive isolation revealed by former experiments, we focused on whether the *D. albomicans* and *D. nasuta* have acquired premating isolation mechanisms.

The result of our investigation revealed that there exists primary premating isolation between Thailand *D. albomicans* and India *D. nasuta*, but the premating isolation between India *D. nasuta* and *D. albomicans* from other regions (Kang Tong, Taiwan, Honshu Japan) is not significant.

Keywords: speciation, *Drosophila albomicans*, *D. nasuta*, reproductive isolation

二、計畫緣由與目的

在生物進化的研究上，種化 (speciation 亦即新種產生) 是一個相當重要的課題。但是在探討種化時必須先釐清種的概念 (species concept)。也就是說，當研究者對種的定義不同，對種化的研究策略就不同。舉例來說，Ting *et al.* (1998) 根據生物種概念 (biological species concept) 去探討發生在擬黃果蠅 (*Drosophila simulans*) 與其同胞種 (sibling species) *D. mauritiana* 和 *D. sechellia* 的種化過程，因為擬黃果蠅與兩個同胞種的雜交後代雄蟲沒有生殖力 (sterile)，所以控制雜交後代生殖力的基因 *Odysseus* 可稱為種化基因 (speciation gene)；相對地，如果種的定義是根據生物的多個特徵，如形態、生殖、生化形質、以及地理分布的異同來判斷是否為同一種，而不只考慮雜交後代生殖力或存活的狀況時，即使兩分類群可以雜交產生後代且可累代培養，也可能被定義成不同種，例如 Kitagawa *et al.* (1982) 將紅果蠅 (*D. albomicans*) 與輝顏果蠅 (*D. nasuta*) 根據地理分布、形態、生殖、核型 (karyotype)、異構酶 (allozyme) 的研究判定為不同種，但印度的學者 Ranganath 則始終認為兩者只是亞種而已 (因為紅果蠅與輝顏果蠅在自然界尚未發現地理分布重疊區域)。

如上所述，紅果蠅與輝顏果蠅是否為同一種尚有爭議。但一個不爭的事實是兩者在實驗室中雖然可以雜交，但兩者的核型卻有明顯的差異，紅果蠅為 $2n=6$ 而輝顏果蠅則是 $2n=8$ 。因為輝顏果蠅具有原始的核型，而紅果蠅的性染色體為原始的新-X (neo-X) 染色體，及原始的 Y 染色體和原始的第三染色體癒合而成的新-Y (neo-Y) 染色體，二者的差異牽涉到複雜的染色體變化。然而最令人疑惑的是在自然界中的紅果蠅與輝顏果蠅的核型如此不同真的只是因為地理分布沒有重疊，還是有其他選汰力介入其中呢？因為紅果蠅與輝顏果蠅的分布都相當廣泛，後者則是西

起非洲東岸、向東延伸到印度與孟加拉交界；而前者西起印度東部省份 (孟加拉東部)、向東延伸到日本南部，可見兩者的擴散能力都不差，而且兩者之間並沒有明顯的地理障礙。若是如此，為何自然界中找不到雜交個體？若有雜交事件發生，即使並不常見但只要發生，根據其在實驗室中可以雜交且雜交後代可以維持長期的染色體多態性 (polymorphism) 的現象 (Chang and Ayala, 1989) 推測雜交後代應該可以在自然族群中繁衍開來，進而蔓延到整個自然族群之中；然而事實並非如此，在自然界中兩者的核型依然如此壁壘分明，似乎存在著一股力量限制了紅果蠅與輝顏果蠅的基因交流。這種選汰力果真存在的話，可說是促使紅果蠅與輝顏果蠅成為不同種的力量，並可顯示兩者已經是不同種、而非正處於種化的過程。

紅果蠅與輝顏果蠅所屬的輝顏果蠅種亞群 (*nasuta species subgroup*) 中的 14 個分類群在形態上都非常接近，而彼此之間都有程度不等的交尾後生殖隔離。也就是整個輝顏果蠅種亞群可以說是一個研究物種分歧不同階段的好材料。而紅果蠅與輝顏果蠅的關係似乎最接近種化期，加上這兩種果蠅的研究最多遺傳背景最豐富，所以最適合用來探討生殖隔離與種化的關係。

三、材料與方法

實驗由印度地區的一個輝顏果蠅單雌品系 (193.7, Mysore, India) 與六個分別從六個地區採集的紅果蠅單雌品系進行交尾選擇 (表一)，每種配對重複實驗三次。

表一、紅果蠅品系與採集地

編號	果蠅採集地
55.01	太魯閣，花蓮，台灣。
161.08	Chiang Mai, 泰國。
163.05	Nago, Okinawa, 日本。
231.03	Okayama, Honshu, 日本。
254.29	Chiang Mai, 泰國。

- 254.30 Maesa, 泰國。
259.02 鼎湖山，廣東，中國。
283.01 九份二山，南投，台灣。

交尾選擇實驗進行時採用 6 日齡的處女蠅 400 隻，其中輝顏果蠅雌、雄各 100 隻，紅果蠅雌、雄各 100 隻，於處女蠅的第五日齡下午二時進行標記。標記方法是採用以螢光粉 (fluorescent dust, Day-Glo A pigments, Day-Glo Color Corp., Cleveland, OH, USA) 沾黏蟲體的方式。標記使用的兩種顏色螢光粉為：藍色 (Horizon Blue* 19)，粉紅色 (Aurora Pink* 11)。標記的詳細方法為：將微量螢光粉 (<0.01g) 倒入標記用廣口瓶中，將欲標記的果蠅置入廣口瓶，瓶口放上塑膠漏斗，以橡皮吹球經漏斗吹氣入廣口瓶中，使瓶內產生氣旋而讓果蠅與螢光粉充分混合，最後果蠅體表 (包含翅膀) 70% 以上的表面積沾黏螢光粉，完成標記。標記後的紅果蠅或輝顏果蠅會再倒入一內含培養基的廣口瓶裡，直到隔日上午九時進行實驗。

實驗中使用的兩種顏色螢光粉，已經由先前的數次實驗證實螢光粉顏色不會對於交尾選擇有影響。通常藍色用來標記輝顏果蠅，粉紅色用來標記紅果蠅。其標記可以用肉眼觀察，若使用解剖顯微鏡觀察則辨識度可達百分之百。

交尾選擇實驗於收處女蠅後第 6 日上午九時左右開始，觀察二小時。本實驗在族群箱 (cage) 中進行。族群箱為壓克力製透明長方體，長 30 cm，寬 21 cm，高 21 cm，厚 0.5 cm，族群箱兩側 (正方形面) 各開一直徑為 13 cm 的圓形開口，在實驗進行時開口以短絲襪封住以防果蠅飛出。

每一個族群箱的實驗以一個二乘二關聯表表示，實驗後以 Chi-square test 和 G-test 做獨立性檢測，並計算交尾成功率與 RDI (relative discrimination index)，RDI>0 表示偏好同種交尾，RDI=0 表示交尾選擇無差別，RDI<0 表示偏好異種交尾 (Hollocher *et al.* 1997)。

四、結果

本實驗在今年度將研究重點置於交尾前隔離 (premating isolation) 的部分。

實驗結果發現，每一個族群箱實驗的交尾配對模式有一類似趨勢，尤其是以同一個地區的同一品系最為明顯。其中紅果蠅雌蟲的交尾率普遍低於輝顏果蠅雌蟲的交尾率，而在所有 24 個實驗中，有 21 個實驗中紅果蠅 female × 輝顏果蠅 male 的配對數最低，約為其他組合數的四分之一至二分之一。用卡方和 G-test 做獨立性檢測，顯示泰國品系紅果蠅與印度輝顏果蠅之交尾選擇實驗有非隨機交尾現象 ($P<0.05$)，日本沖繩品系之交尾實驗也有非隨機交尾現象，其餘紅果蠅品系與輝顏果蠅的組合皆為隨機交尾 ($P>0.05$)。

表二、實驗的卡方與 G-test 結果

品系	卡方	G-test	RDI
55.01 (台灣)	0.0004**	0.0001**	0.2311
	0.0137*	0.0102*	1.0974
	0.0225*	0.023*	0.8983
161.08 (泰國)	0.0147*	0.0135*	1.0647
	0.0027**	0.0022**	1.3863
	0.0001**	9.58E-0.5	1.8638
163.05 (日本)	0.0002**	0.0002**	1.4098
	0.0163*	0.0166*	0.8183
	0.0406*	0.0412*	0.6866
231.03 (日本)	0.1628	0.1621	
	0.8023	0.8038	
	0.0938	0.094	
254.29 (泰國)	0.1446	0.1423	
	0.0198*	0.0155*	1.2220
	0.1064	0.1044	
254.30 (泰國)	0.0029**	0.002**	1.6507
	0.0022**	0.0016**	1.8841
	0.1057	0.1058	
259.02 (中國)	0.7565	0.758	
	0.0443*	0.0397*	1.0761
	0.1271	0.1252	

283.01	0.9935	0.9935
(台灣)	0.8851	0.8858
	0.1288	0.1302

五、討論

就目前的資料，此二物種為並沒有同域的紀錄且並沒有辦法以外部型態來區分，但雜交卻可以產生有生殖能力的後代 (Kitagawa *et al.*, 1982)，也因此我們可以認為此二物種的親緣關係很近，或稱此二物種為異域的同胞種 (allopatric sibling species)。

從統計分析結果來看，印度輝顏果蠅與泰國 Chiang Mai 紅果蠅有非逢機交尾，即其交尾選擇 (mating choice) 是有選擇性的，且由 RDI 值分析可知其同種交尾比例高於異種交尾，換句話說，其交尾前生殖隔離 (premating isolation) 可能已經建立，但還不完備。其他地區如廣東、台灣、日本本州的紅果蠅在統計分析無法顯示有非逢機交尾，但其結果仍可看出紅果蠅雌蟲仍然有選擇同種雄蟲與異種雄蟲的能力。不同於日本本州的紅果蠅，日本 Okinawa Nago 的紅果蠅有非逢機交尾。

為何泰國 Chiang Mai 的紅果蠅有如此明顯的交尾選擇？可能是因為地理區隔上兩個物種並不完全，有雜交現象發生，為了避免雜交所導致的遺傳負荷 (genetic load)，可能會演化出較明顯的交尾前生殖隔離。雖然在文獻中提到兩個物種並沒有同域的紀錄，但可能因為調查紀錄的不完全而有所誤差 (缺乏緬甸的調查資料)，固然目前並無證據證實此兩物種有雜交代或是有共同生活的區域，但也不能就這樣否定其可能性。而其他地理區的紅果蠅因為地理阻隔而不會有接觸的機會 (廣東、台灣、日本本島)，因此並未發展出明顯的交尾前生殖隔離。然而，日本 Okinawa Nago 的紅果蠅與印度的輝顏果蠅有非逢機交尾與交尾前生殖隔離，是令人費解的問題，因為日本本州的紅果蠅還未發展出明確的交尾前生殖隔離，在 Okinawa Nago

的紅果蠅卻有較為明確的交尾前生殖隔離現象。我們可推測近年入侵日本本州的紅果蠅應該不是由琉球群島入侵日本，而有研究顯示日本本州紅果蠅的遺傳組成與台灣的紅果蠅類似，推測可能是由台灣經海、空運交通入侵日本。

六、計畫成果自評

本計畫應用螢光粉做標記的交尾選擇實驗可將族群箱內不同族群果蠅的辨識度提升至100%，方法更可利用在不同種的果蠅交尾選擇實驗，免除了辨識度的問題後更可變換與改良實驗設計，所以此技術的建立對於日後探討相關問題有莫大的助益。

七、參考文獻

- Chang, H., and F. J. Ayala. 1989. On the origin of incipient reproductive isolation. *Evolution* 43:1614-1624.
- Hollecher, H., C. -T. Ting, F. Pollack, and C. -I. Wu. 1997. Incipient speciation by sexual isolation in *Drosophila melanogaster*: variation in mating preference and correlation between sexes.
- Kitagawa, O., K. I. Wakahama, Y. Fuyama, Y. Shimada, E. Takanashi, M. Hatsumi, M. Uwabo, and Y. Mita. 1982. Genetic studies of the *Drosophila nasuta* subgroup, with notes on distribution and morphology. *Jpn. J. Genet.* 57:113-141.
- Ting, C.-T., S. -C. Tsaur, M.-L. Wu., and C. I. Wu. 1998. A rapid evolving homeobox at the site of a hybrid sterility gene. *Science* 282:1501-1504.