

行政院國家科學委員會專題研究計劃成果報告

紅果蠅階段性染色體進化

The stepwise chromosome evolution in *Drosophila albomicans*

計畫編號： NSC89-2313-B002-031

執行期限： 89 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

主持人：張慧羽 國立台灣大學昆蟲學系

E-mail: hwei@ccms.ntu.edu.tw

一、中文摘要

紅果蠅 (*Drosophila albomicans*) 的新-X (neo-X) 染色體與其新-Y (neo-Y) 染色體是由原始的性染色體與第三對體染色體癒合而成。種化過程 (speciation) 中的兩次癒合事件所牽涉到的選汰作用 (selection forces) 是本研究探討的主題。利用紅果蠅與其同胞種輝顏果蠅 (*D. nasuta*) 仍能成功雜交的特性，我們所提出的 "階段性染色體進化" 假說有機會得以驗證。"階段性染色體進化" 是推測在進化的過程中第一次的性染色體癒合可以在族群中留存很長的一段時間直到第二性染色體癒合的發生。其後選汰力就會促成兩個癒合型性染色體在族群中發生了固定化 (fixation)。

若此假說成立，則紅果蠅進化研究上的一些爭議當可迎刃而解。例如：本研究室以往曾兩度建立紅果蠅和輝顏果蠅的雜交族群，均維持長期 (*i.e.*, 超過二十代) 的多態性，但印度 Dr. Ranganath 研究室所建立的雜交族群卻很快地 (*i.e.*, 不超過十代) 達到染色體核型的固定。若階段性染色體進化假說是正確的，則這個矛盾現象很顯然是由於族群起始狀態的不同所致。為了驗證這個假說，我們曾構築四種具有不同染色體組成的實驗族群，兩種代表第一階段：原始型 X 與兩種 Y、原始型 Y 與兩種 X；兩種代表第二階段：癒合型 X 與兩種 Y、癒合型 Y 與兩種 X。雖然研究結果間接地支持這個假說，仍存在一些不確定性，即第一階段驗證癒合的性染色體在族群中以多態性的方式留存，而第二階段卻是從癒合的性染色體已達固定的情況

下去探討，而從多態性到固定化仍有一段距離。因此在這次的實驗中我們將構築同時具有原始型 X、原始型 Y、癒合型 X 與癒合型 Y 四種染色體型式的實驗族群。我們預測癒合型 X 與癒合型 Y 最後將固定在該族群中，也就是在四型染色體並存的狀態下，選汰力會促成兩種癒合型性染色體的固定化。

兩個雜交族群的結果顯示：E1 雜交族群長期飼養後仍維持 3-X 與 3-Y 染色體多態型；而 E2 雜交族群在二十代的累代培養過程中 3-X 與 3-Y 的染色體被快速地排除。這個不符合預期的結果卻意外地顯示我們在實驗過程中刻意迴避的減數分裂驅動 (meiotic drive) 效應可能在紅果蠅染色體進化過程中扮演重要的角色。我們接下來的研究重點就是減數分裂驅動因子和染色體進化的關係。

關鍵字：染色體進化、紅果蠅、輝顏果蠅、勞勃松氏 (Robertsonian) 變化

Abstract

The neo-X and neo-Y chromosomes of *Drosophila albomicans* were formed by two fusion events of the ancestral sex and 3rd chromosomes during evolution. The main purpose of this study is to show chromosomal selection forces involved during evolution. Fortunately, *D. albomicans* can produce fertile hybrids with its sibling species, *D. nasuta*. Therefore, it is possible to test our hypothesis of "stepwise

chromosome evolution”.

In our “stepwise chromosome evolution” hypothesis, the new sex chromosome formed by the first fusion event can be maintained under a polymorphic condition in the population for a long time waiting for the occurrence of the second fusion event. The two fused chromosomes will be fixed in the population by selection forces.

This hypothesis can solve some of the long lasting issues in the study of *D. albomicans* evolution. For instance: the hybrid populations established in our laboratory maintained polymorphic for at least twenty generations, whereas the hybrid populations established in Dr. Ranganath's laboratory in India soon became fixed. If our “stepwise chromosome evolution” hypothesis is correct, this phenomenon is apparently due to different initial conditions.

In order to test this hypothesis, we had established four different types of populations to represent the two stages of chromosome evolution. They were fixed ancestral X with two kinds of Ys, fixed ancestral Y with two kinds of Xs for stage I, and fixed neo-X with two kinds of Ys, fixed neo-Y with two kinds of Xs for stage II. The result of that study supported our hypothesis indirectly, but there still exists some uncertainty between the two stages, *i.e.*, in stage II, the populations were initiated from a condition that the first fused chromosome had been fixed. However, the data only supported that polymorphism can be maintained at stage I. Therefore, we planed to establish a population with all four types of chromosomes simultaneously, and see if the two fused chromosomes will go fixation as we predicted. The result of two replicated experiments revealed that karyotype polymorphism exists in E1 hybrid population after long-term cultivation, but the 3-X and 3-Y chromosomes are excluded rapidly after 20 generations. This unexpected result accidentally showed that the meiotic drive, which we tried to avoid in our experiments, might play an important role in the chromosome evolution of *D. albomicans*.

The investigation of the relationship between meiotic driver and chromosome evolution of this species is in progress.

Keywords: chromosomal evolution,
Drosophila albomicans, *D. nasuta*,
Robertsonian change

二、計畫緣由與目的

果蠅 (*Drosophila*) 染色體進化的研究至今已累積了不少成果，但對於自然族群中大的染色體變異，如染色體癒合的進化研究仍然相當少。Meera and Ranganath (1991) 推論出整個大果蠅種群 (*immigrans* species group) 染色體分化的序列是由染色體數目 $2n = 12$ 演變到 $2n = 6$ 。其過程發生了多次的染色體癒合，其中包含體染色體與體染色體間，以及性染色體與體染色體間的癒合，而其中最特殊的就在於紅果蠅 (*Drosophila albomicans*, $2n=6$) 染色體型式的形成過程：其 X 染色體為原始的 X 染色體和原始的第三染色體癒合而成的新-X (neo-X) 染色體，其 Y 染色體亦為原始的 Y 染色體和原始的第三染色體所癒合而成的新-Y (neo-Y) 染色體。這種性染色體與體染色體的癒合在自然族群中發生的機率很低，而在已知的 1500 種果蠅中，除了紅果蠅之外目前只有在 *D. miranda*、*D. americana*、*D. athabasca* 等少數幾個種類曾發生性染色體與體染色體的癒合，但也只限於一次的癒合 (Paika and Miller, 1974; White, 1973)。像紅果蠅種化過程 (speciation) 的兩次癒合導致性染色體佔整個遺傳組成 (genome) 之 60% 的事件在果蠅的進化過程中真可謂絕無僅有 (Hägele and Ranganath, 1982; Meera and Ranganath, 1991)。此外由於紅果蠅與其同胞種輝顏果蠅 (*D. nasuta*, $2n=8$) 的核型雖然不同但仍能雜交並產生可孕的後代，而且其雜交後代在實驗室裏可以培養數十代以上 (Chang and Ayala, 1989)。基於這個特性，紅果蠅為研究進化過程中染色體選汰的好材料。

Ramachandra and Ranganath (1986, 1990, 1996) 提出 *D. nasuta* 和 *D. albomicans* 雜交後代之族群其核型會達到穩定均質的型式。本研究室利用相同的品系兩度建立的雜交族群卻呈現高度的異質性 (Chang and Ayala, 1989; Yu *et al.*, 1997, Yu *et al.*, 1999)。由於這個矛盾現象，再加上在種化過程中兩次性染色體癒合事件單靠遺傳浮動 (genetic drift) 而達固定化的機會微乎其微，我們提出紅果蠅染色體“階段性染色體進化 (Stepwise Chromosome Evolution)” 假說：經由第一次的癒合事件而產生的癒合型性染色體可以和原始型性染色體以多態的 (polymorphic) 形式共存於族群中，直到第二次的癒合事件發生。兩種癒合的性染色體將會因選汰力 (selection forces) 的作用而在族群中達到染色體的固定化 (fixation)。由於紅果蠅和輝顏果蠅可以雜交，這個假說得以驗證。根據這個假說，若族群起始狀態是：性染色體之一為單態的原始型，而另一性染色體為多態的，這相當於紅果蠅染色體進化的第一階段。此時若多態的一方包括進化過程中第一次癒合的染色體，則會維持長期的多態性；若多態的一方包括進化過程中第二個癒合的染色體，則此癒合的染色體會因為結構上的不配合而迅速的從族群中被排除。如果族群起始狀態是：性染色體之一為單態的癒合型，而另一性染色體為多態的，這相當於紅果蠅染色體進化的第二階段。則由於選汰的作用，多態的染色體中癒合型的染色體的頻率會提高終致固定化。在本研究室的前次研究中我們建立了四種族群，他們的起始狀態分別為：A. 含 3,Y 及各半的 3-X 和 3,X；B. 含 3,X 及各半的 3-Y 和 3,Y；C. 含 3-X 及各半的 3-Y 和 3,Y；D. 含 3-Y 及各半的 3-X 和 3,X。結果顯示 3-X 是進化過程中第一個癒合的染色體，而 3-Y 是第二個；同時也顯示有選汰力參與其中。這樣的結果雖然間接的支持我們的階段性染色體進化假說 (Yu *et al.*, 1999)，但是還有一些問題需要深入探討。Charlesworth and Charlesworth (1980) 曾以數學模式的方式模擬分析 Y 染

色體-體染色體癒合 (Y-autosome fusion) 與 X 染色體-體染色體癒合 (X-autosome fusion) 在族群中出現後的頻率變化，他們並根據 White (1973) 的推論假設這些癒合型染色體的體染色體部份帶有某些在選汰作用下具異結合型優勢 (heterozygotes advantage) 的基因組合，而當該體染色體與性染色體癒合後，這些癒合型染色體將提高族群中異結合型個體的頻率，其模擬結果為：由於兩種癒合型染色體在雌雄性的適應值有差異 (因為 Y 染色體只出現在雄性個體，而 X 染色體在雌雄個體出現的頻率也不同)，加上 Y 染色體-體染色體癒合不會與同源染色體發生重組，使雄性個體可以長期維持在異結合型的狀態，其效應較 X 染色體-體染色體癒合強，故在族群中 Y 染色體-體染色體癒合的頻率上升的較快，並據此推論在自然族群中 Y 染色體-體染色體癒合應該比 X 染色體-體染色體癒合的機會高，然而在果蠅的研究中並沒有這樣的現象，再加上 *D. miranda* (Y 染色體-第三對體染色體癒合) 與 *D. americana* (X 染色體-第四對體染色體癒合) 兩個例子中另一型的癒合型染色體並未出現，所以無從比較兩種癒合型染色體在族群中的變化情形，因此如果要比較這兩種癒合型染色體在族群中的頻率變化情況，以及其固定化的可能性，建立一個兩種癒合型染色體皆為多態性的族群來分析可能的結果是有必要的。在前次研究中，A 族群的結果顯示第一個癒合的染色體會維持多態性。C 族群的結果則顯示當第一個癒合的染色體達固定化之後，後續產生的另一型癒合型染色體也會朝向固定化的最終命運前進 (Yu *et al.*, 1999)。但是第一次癒合的染色體由多態到固定這一段仍然未知。雖然 C 族群的結果只能間接證明選汰力的存在，這樣的結果非常重要。因為建造一個包含四種染色體的族群非常複雜需要考慮許多條件，再加上牽涉的作用力較多，因此需要較長時間 (亦即較多的果蠅世代數) 才能看出顯著的結果。若不先證明這些選汰力的存在，是不可貿然去進行實驗。目前我們已經有了足夠的基礎資料

可以進一步直接驗證紅果蠅的染色體進化假說。在本計畫中，我們建立一個族群起始狀態包含四種染色體的族群（在此稱為 E 族群），以試圖了解當 X Y 性染色體在族群中都是多態性時，是否這些癒合的染色體也將進一步地在族群中發生固定化 (fixation)？根據“階段性染色體進化”假說 E 族群中的兩種癒合型染色體在族群中應會達到固定化。若此假說成立則可以解答一些輝顏果蠅種亞群 (species subgroup) 進化研究上的矛盾與爭議 (issues)。例如：在種化過程中若要靠連續兩次的遺傳浮動來達成紅果蠅目前的核型，其機率小到幾乎不可能發生。同時也可驗證 Charlesworth and Charlesworth (1980) 的推論是否正確，因為在前次的研究中我們雖然已知紅果蠅的 3-X 較 3-Y 先出現且較易在族群中以多態性的狀態保留下來 (Yu *et al.*, 1999)，但並不代表在 3-Y 出現後 3-X 的頻率就會上升得較快。而在 E 族群中我們可以知道在 X 和 Y 染色體均為多態的情況下，那一種癒合型染色體的頻率會上升較快。

三、結果與討論

本實驗建立兩組族群，第一組族群採用泰國清邁的紅果蠅 *D. albomicans* (# 161.3) 與肯亞的輝顏果蠅 *D. nasuta* (# 252.21) 雜交，另一組族群採用日本沖繩的紅果蠅 *D. albomicans* (# 163.5) 與印度的輝顏果蠅 *D. nasuta* (# 193.7) 雜交。為了模擬較複雜的情況，將紅果蠅雌蟲與輝顏果蠅雄蟲雜交，以及將紅果蠅雄蟲與輝顏果蠅雌蟲雜交，均以每管 3 對做配對，共配 15 管。分別收集這兩種配對所產生的未交尾雌、雄蟲後代 (5 日齡) 各 10 隻，混合飼養於同一培養管。共配 15 管 (每管 20 對)，分成 3 群。此為本實驗的起始族群 (G_0 , generation 0)。其後代即為族群第一代 (G_1 , generation 1)，經一次轉管後每群共 10 管，逢機自每管中各取 20 隻雌、雄果蠅，平均分裝在 10 隻培養管中

飼養，之後每代族群量均維持在 400 隻，以世代不重疊的方式累代培養。這種配對方式族群起始狀態為 3-X 及 3-Y (紅果蠅型) 與 3,X 及 3,Y (輝顏果蠅型) 染色體各半，若紅果蠅型之 3-X 及 3-Y 染色體的組合具選汰上的優勢，預期在累代培養的過程中紅果蠅型 3-X 及 3-Y 染色體的頻率會逐代上升，最後會在族群中達到固定化 (fixation)。由於在之前的研究顯示日本沖繩的紅果蠅 (# 163.5) 雌蟲與印度的輝顏果蠅 (# 193.7) 雄蟲雜交時第二子代出現性比偏雌 (Chang and Ayala, 1989; Yu *et al.*, 1997)，經過初步分析我們推測可能是日本沖繩紅果蠅的 3-X 染色體帶有減數分裂驅動因子 (meiotic driver)，為了避免造成實驗族群性比偏差進而影響起始族群的狀態，因此在第二組的配對流程中我們採用實驗室中已達固定的雜交品系的雄蟲代替雜交第一代雄蟲以減輕該效應。

第一個紅果蠅 (# 161.3) 與輝顏果蠅 (# 252.21) 雜交 E1 族群建立多代後分別在第一、第五、第十代、第二十代記錄癒合型染色體 3-X 及 3-Y 頻率的變化，結果顯示 3-X 與 3-Y 染色體變化趨勢不一致。3-X 染色體的頻率較穩定，重複試驗間沒有太大差異 (表一) (沒有上升的趨勢，世代平

表一、E1 族群中 3-X 染色體頻率的變化

3-X 染色體 頻率(%)	G1	G5	G10	G20
重複一	54	46	48	58
重複二	42	56	45	38
重複三	35	44	49	46

均的頻率為 46.75 ± 7.05)，而 3-Y 染色體的頻率在三個重複試驗則表現出極大的差異 (表二)，在第十與二十代

表二、E1 族群中 3-Y 染色體頻率的變化

3-Y 染色體 頻率(%)	G1	G5	G10	G20
重複一	70	53	76	72.4
重複二	33	60	26	33
重複三	59	52	54	18.8

的 SE 值分別高達 25.06 與 27.77 (世代平均的頻率為 50.6 ± 19.05)，顯然 3-Y 染色體的頻率與 3-X 染色體頻率的變化無太大關係。另外在第二個紅果蠅 (#163.5) 與輝顏果蠅 (#193.7) 雜交 E2 族群中，3-X 與 3-Y 染色體頻率的變化有明顯下降趨勢；另外重複試驗間沒有太大差異 (世代平均的頻率分別為 22.36 ± 7.69 以及 16.53 ± 8.32)。(表三、四)

表三、E2 族群中 3-X 染色體頻率的變化

3-X 染色體 頻率(%)	G1	G5	G10	G20
重複一	26	13.5	14	10
重複二	32	33.3	15.7	16.9
重複三	55	28.4	13.5	10

表四、E2 族群中 3-Y 染色體頻率的變化

3-Y 染色體 頻率(%)	G1	G5	G10	G20
重複一	29	13.5	6.5	0
重複二	51	32.3	13.3	6.9
重複三	24	18.8	3	0

綜合兩類雜交族群的結果來看，E1 與 E2 族群中 3-X 與 3-Y 染色體的頻率變化有明顯的不同。E1 族群的 3-X 與 3-Y 染色體的頻率在累代飼養的過程中並沒有太大的變化；相對地，E2 族群的 3-X 與 3-Y 染色體的頻率在累代飼養的過程中則都有累代下降的現象。由於建立 E1 與 E2 族群的紅果蠅品系採集地點分別是泰國與日本琉球，而輝顏果蠅則都是採集於印度，故推測 E1 與 E2 族群結果的差異可能與所使用的紅果蠅的採集地點有關，所以當兩地的紅果蠅分別與印度的輝顏果蠅雜交時，3-X 與 3-Y 染色體在兩個雜交族群中有截然不同的命運。由於日本琉球的紅果蠅品系的 3-X 染色體上可能具有減數分裂驅動因子，因此推測在進化過程中減數分裂驅動作用可能是一個重要的選汰力。

此外在之前的研究中 (Yu *et al.*, 1997) 22 個雜交品系中 3-X 染色體 (來自紅果蠅) 的頻率平均高達 66.59%，而本次實驗的 E1 族群中來自紅果蠅的 3-X 染色體則始終維持在 50% 上下，E2 族群甚至有明顯下降趨勢，明顯低於之前 22 個雜交品系的結果，但因為之前配的啟始族群只有兩隻蟲，亦即一隻輝顏果蠅雄蟲配一隻紅果蠅雌蟲，而這次實驗的啟始族群有 90 隻蟲，而且同時包含雙向交配，狀況較複雜；由此推測所建立的雜交族群中遺傳變異的多寡會影響癒合型染色體的頻率；另一個可能的原因是之前的 22 個雜交品系中並沒有 3-Y 染色體，也就是 3-Y 染色體的出現對 3-X 染色體頻率的提升不但沒有幫助 (E1 族群)，甚至會造成 3-X 染色體頻率的下降。

四、計畫成果自評

這次的實驗將啟始狀態 (遺傳背景) 設定在較複雜的情況。目前的結果顯示，我們在實驗設計中刻意迴避的減數分裂驅動作用可能在紅果蠅染色體進化過程中扮演重要的角色。因此我們接下去的研究重點放在釐清減數分裂驅動因子與紅果蠅染色體進化間的關係。

本實驗室長期以來對於紅果蠅與輝顏果蠅間的演化關係一直有著高度的興趣，也曾以雜交的方式建立雜交族群以分析兩者之間染色體的演化關係 (Yu *et al.*, 1997)，紅果蠅癒合染色體的形成與演化過程是一個相當有趣的研究課題，利用紅果蠅與其同胞種輝顏果蠅 雜交族群的建立與分析癒合型染色體的變化情形應該有助於釐清紅果蠅癒合型染色體的演化歷程。

五、參考文獻

- Chang, H. and F.J. Ayala 1989 On the origin of incipient reproductive isolation: the case of *Drosophila albomicans* and *D. nasuta*. *Evolution* 43:1614-1624.
- Charlesworth, D., and B. Charlesworth. 1980. Sex differences in fitness and selection for centric fusions between sex-chromosomes and autosomes. *Genet. Res.* 35:205-214.
- Hägele, K., and H. A. Ranganath. 1982. A centric fusion in *D. nasuta albomicana*. *DIS* 58:70
- King, M. 1993. *Species Evolution: the role of chromosome change*. Cambridge University, Cambridge. 366pp.
- Meera, R. P. and H. A. Ranganath 1991 Karyotype differentiation among members of the *immigrans* species group of *Drosophila*. *Genetica* 83:145-152.
- Paika, I. J., and D. D. Miller. 1974. Distribution of heterochromatin in type-III Y and other chromosomes of *Drosophila athabasca*. *J. Hered.* 65:238-240.
- Ramachandra, N. B. and H. A. Ranganath 1986 The chromosomes of two *Drosophila* races: *D. nasuta nasuta* and *D. nasuta albomicana*. IV. Hybridization and karyotype repatterning. *Chromosoma* 93:243-248.
- Ramachandra, N. B. and H. A. Ranganath 1990 The chromosomes of two *Drosophila* races: *D. nasuta nasuta* and *D. nasuta albomicana*. V. Introgression and the evolution of new karyotypes. *Zeitschrift fuer Zoologische systematik und evolutionsforschung* 28:62-68.
- Ramachandra, N. B. and H. A. Ranganath 1996. Evolution of new karyotypic strains (cytoraces) through hybridization in *Drosophila nasuta* system. *DIS* 77: 86-88.
- Wang, T. C., C. C. Chen, and F. J. Lin. 1988. Intraspecific polymorphism of karyotype in *Drosophila albomicans*. *Bull. Inst. Zool., Acad. Sinica* 27:127-131.
- White, M. J. D. 1973. *Animal Cytology and Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge. 961pp
- Yu, Y. C., F. J. Lin, and H. Chang. 1997. Karyotype polymorphism in hybrid populations of *Drosophila nasuta* and *D. albomicans*. *Zoological Studies* 36:251-259.
- Yu, Y. C., F. J. Lin, and H. Chang. 1999. Stepwise chromosome evolution in *Drosophila albomicans*. *Heredity* 83:39-45