บทที่ 14

Linkage and Recombination

จากการพิจารณาจากความจริงที่ว่ายีนส์ต่าง ๆ มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม ดังนั้น เมื่อกล่าวว่ายีนส์บางคู่มีความเป็นอิสระต่อกัน ก็หมายความว่ายีนส์คู่เหล่านั้นมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมต่างคู่กัน และจะมีการกระจายตัวอย่างเป็นอิสระในขณะที่มีการสร้าง gametes แต่ในความเป็นจริงแล้ว ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดนั้นมียีนส์อยู่เป็นจำนวนมากเกินกว่าจำนวนโครโมโซมที่มันมีอยู่ เพราะฉะนั้นแต่ละโครโมโซมจะต้องมียีนส์อยู่เป็นจำนวนมากด้วยกัน และยีนส์ที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมเดียวกัน จึงมีแนวโน้มที่จะไปอยู่ใน gamete เดียวกันมากกว่าที่จะกระจายไปอยู่ในต่าง gametes กันอย่างเป็นอิสระ จึงส่งผลให้ลักษณะต่าง ๆ ที่จะถูกถ่ายทอดไปยังชั่วต่อไปปรากฏออกมาแบบเดียวกับที่มีอยู่ในชั่วพ่อแม่ (parental combinations) มากกว่าที่จะปรากฏออกมาในแบบที่เกิดจากการจัดเรียงของยีนส์ในชุดใหม่ (new combinations or recombinations) เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า linkage of genes อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะมี alleles ของยีนส์คู่ต่าง ๆ ปรากฏอยู่บนโครโมโซมเดียวกัน ก็ไม่จำเป็นว่ามันจะต้องติดไปด้วยกันตลอดเวลาเสมอไป ทั้งนี้เนื่องจากว่าในขณะที่มีการแบ่งเซลแบบ meiosis นั้น จะมีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมที่เป็นคู่เดียวกันซึ่งเรียกว่า crossing over เกิดขึ้นได้ จะทำให้ alleles ที่เคยอยู่บนโครโมโซมเดียวกัน สามารถจะแยกไปอยู่ในต่างโครโมโซมกันได้ ทำให้เกิดลักษณะที่เป็นผลของ recombination ขึ้นมา การที่มี linkage และ crossing over จะทำให้ phenotypic ratio ที่เกิดจากการกระจายตัวในลักษณะต่าง ๆ ผิดแผกไปจากที่คาดว่าจะเกิดขึ้นตามกฎข้อที่สองของเมนเดล

ปรากฏการณ์ของ linkage เป็นเครื่องชี้ให้เห็นว่า ยีนส์จะมีตำแหน่งเรียงกันตามความยาวบนโครโมโซมเป็น linear arrangement การที่ยีนส์จะแสดง linkage ต่อกันได้มากน้อยแค่ไหนก็ขึ้นอยู่กับตำแหน่งของยีนส์เหล่านั้น ถ้ามันอยู่ใกล้ชิดกันมากก็จะมี linkage มาก แต่ถ้าอยู่ห่างกันก็มีโอกาสจะเกิด crossing over ได้มาก นอกจากนั้นยังสามารถจะทำ linkage map ขึ้นมาได้ด้วย เพื่อจะแสดงให้เห็นว่ามียีนส์อะไรอยู่บนโครโมโซมไหน และอยู่ห่างกันมากน้อยเท่าไร

โดยทั่วไปแล้วพืชหรือสัตว์ต่าง ๆ จะมีจำนวน linkage groups อยู่เท่ากับ haploid number ของโครโมโซมที่มันมีอยู่ โดยจำนวนของ linkage group จะต้องมีไม่เกินจำนวนคู่ของโครโมโซม เช่น แมลงหวี่ ข้าวโพด ถั่วลันเตา จะมีโครโมโซมอยู่ 4, 10, 7 คู่ จึงมี 4, 10, 7 linkage groups ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม จากการศึกษากับสิ่งมีชีวิต

บางอย่างอาจพบว่ามันมี linkage groups น้อยกว่าจำนวนคู่ของโครโมโซมที่มันมีอยู่ก็ได้

Complete linkage

เมื่อยีนส์มีตำแหน่งอยู่ใกล้ชิดกันมาก จนทำให้ alleles ที่อยู่บนโครโมโซมเดียวกันถูกถ่ายทอดไปด้วยกันตลอดเวลา เรียกว่ามันมี complete linkage ตัวอย่างได้แก่ยีนส์ต่าง ๆ ที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่สี่ของแมลงหวี่ จะมีการจัดเรียงกันใหม่ของ linked genes เกิดขึ้นน้อยมากหรือไม่เกิดขึ้นเลย จากการศึกษาโดยใช้ mutant ในลักษณะ bent-wings and shaven-bristles (bt svn/bt svn) ผสมกับพวกปกติ (bt^+ svn^+/bt^+ svn^+) จะได้ F_1 มีลักษณะปกติ แต่เป็น heterozygous ดังรูปที่ 14-1a เมื่อนำ F_1 ที่ได้ไปผสมต่อกับพวก bent shaven อีก จะได้ลูกเกิดขึ้นเพียงสองพวกเท่านั้น คือ bent shaven กับพวกปกติ โดยไม่มีพวก bent-winged normal-bristled หรือ normal-winged shaven-bristled เกิดขึ้นเลย การที่ไม่มีการจัดเรียงกันใหม่ของยีนส์เกิดขึ้นเช่นนี้ แสดงว่ามี strong linkage ระหว่างยีนส์ทั้งสองตำแหน่ง

นอกจากจะใช้แมลงหวี่ที่มี mutant genes ทั้งสองอยู่บนโครโมโซมเดียวกัน (coupling phase) แล้ว เมื่อทำการทดลองโดยใช้แมลงหวี่ที่มี mutant gene อยู่บนโครโมโซมเดียวกันกับ normal gene (repulsion phase) ก็ได้ผลเช่นเดียวกัน คือเมื่อใช้ F_1 heterozygote จากการผสมระหว่างพวก bent กับ shaven ไปผสมต่อกับพวก bent shaven ก็จะให้ลูกที่มี phenotypes เหมือนกับในชั่วพ่อแม่เพียงสองพวกเท่านั้น แต่ไม่มี recombination เกิดขึ้นเลย (รูปที่ 14-1b)

(a)

P: $\frac{bt\ \ svn}{bt\ \ svn}$ (bent, shaven) X $\frac{bt^+\ svn^+}{bt^+\ svn^+}$ (normal)

F_1: $\frac{bt\ \ svn}{bt^+\ svn^+}$ (normal) X $\frac{bt\ \ svn}{bt\ \ svn}$ (bent, shaven)

Testcross progenies: 1 $\frac{bt\ \ svn}{bt^+\ svn^+}$ (normal) : 1 $\frac{bt\ \ svn}{bt\ \ svn}$ (bent, shaven)

(b)

P: $\frac{bt\ \ svn^+}{bt\ \ svn^+}$ (bent) X $\frac{bt^+\ svn}{bt^+\ svn}$ (shaven)

F_1: $\frac{bt\ \ svn^+}{bt^+\ svn}$ (normal) X $\frac{bt\ \ svn}{bt\ \ svn}$ (bent, shaven)

Testcross progenies: 1 $\frac{bt\ \ svn^+}{bt\ \ svn}$ (bent) : 1 $\frac{bt^+\ svn}{bt\ \ svn}$ (shaven)

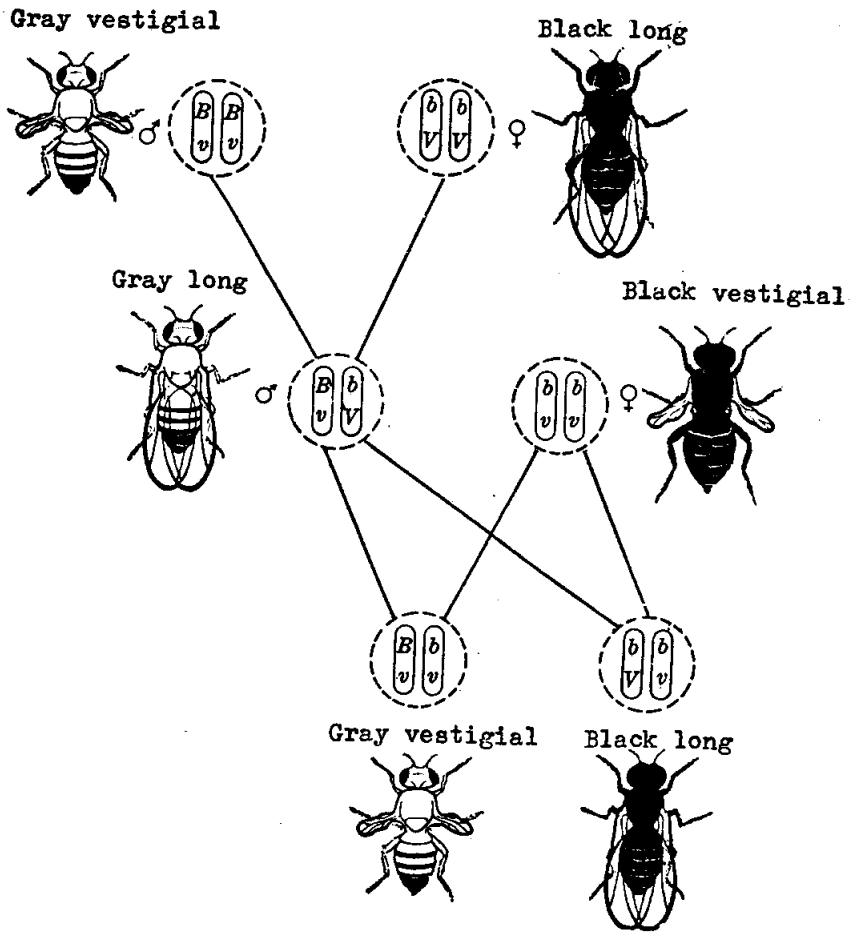
รูปที่ 14–1 Complete linkage ระหว่าง alleles ของ bent และ shaven genes เมื่อทำการผสมแมลงหวี่สองแบบด้วยกัน คือ (a) เมื่อ alleles อยู่ใน coupling phase และ (b) เมื่อ alleles อยู่ใน repulsion phase

Absence of crossing over in Drosophila males

ในบรรดาสิ่งมีชีวิตหลายชนิดด้วยกันที่ใช้ในการศึกษาทางพันธุศาสตร์ เช่น ข้าวโพด ถั่วลันเตา หนู ไก่ พบว่า recombination จะเกิดขึ้นได้ทั้งทางฝ่ายเพศผู้และเพศเมีย แต่จากการศึกษากับแมลงหวี่ species ต่าง ๆ กลับพบว่าในแมลงหวี่เหล่านี้ crossing over

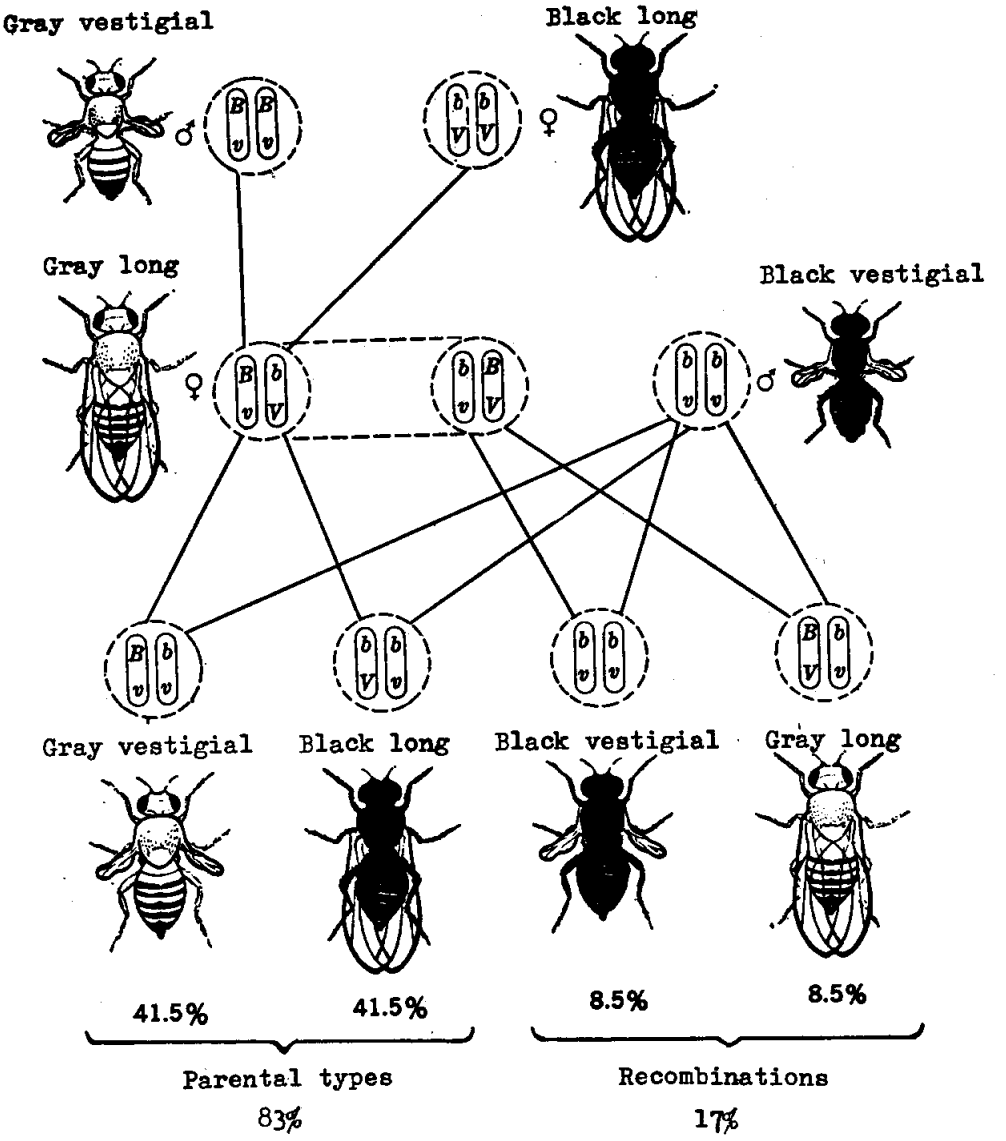
จะเกิดขึ้น เฉพาะทางฝ่ายตัว เมีย เท่านั้น ดังนั้นฝ่ายตัวผู้จึงแสดง complete linkage ไม่เพียง เฉพาะยีนส์ที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่สี่ เท่านั้น แต่กับยีนส์บนโครโมโซมคู่อื่น ๆ ด้วย

ถ้าหากนำแมลงหวี่ลำตัวสี เทาปกติแต่ปีกกุด (gray-bodied, vestigial-winged) ไปผสมกับพวกที่มีลำตัวสีดำ แต่ปีกยาวปกติ (black-bodied, long-winged) จะได้ F_1 ที่มีลักษณะทั้งสอง เป็นปกติ เมื่อนำ F_1 ตัวผู้ไปผสมต่อกับตัว เมียที่มีลำตัวสีดำและปีกกุด จะได้ลูกสองชนิดเท่านั้น คือ พวกที่มีลำตัวสี เทา ปีกกุด และลำตัวสีดำ ปีกยาว จะไม่มี recombination เกิดขึ้น เลย (รูปที่ 14-2) แต่ถ้าหากนำเอา F_1 ตัว เมียไปผสมกับตัวผู้ลำตัวสีดำ



รูปที่ 14-2 Complete linkage ในแมลงหวี่ตัวผู้ เมื่อทำการผสมระหว่างตัวผู้ลำตัวสี เทา ปีกกุด กับตัว เมียลำตัวสีดำ ปีกยาว ได้ F_1 ปกติ ซึ่ง เมื่อนำ F_1 ตัวผู้ไปผสมต่อกับตัว เมียลำตัวสีดำ ปีกกุด จะได้ลูกที่มีลักษณะ เหมือนในชั่วพ่อแม่ เท่านั้น ไม่มี recombinations เกิดขึ้น

ปีกกุด จะได้ลูกออกมาถึงสี่ชนิดด้วยกัน แบ่งออกเป็น parental types ได้แก่ แมลงหวี่ที่มีลำตัวสีเทา ปีกกุด กับพวกที่มีลำตัวสีดำ ปีกยาว ซึ่งจะมีอยู่ประมาณ 83% และ recombination types ได้แก่ พวกที่มีลำตัวสีดำ ปีกกุด และพวกที่มีลำตัวสีเทา ปีกยาว ซึ่งจะมีอยู่ประมาณ 17% (รูปที่ 14-3)

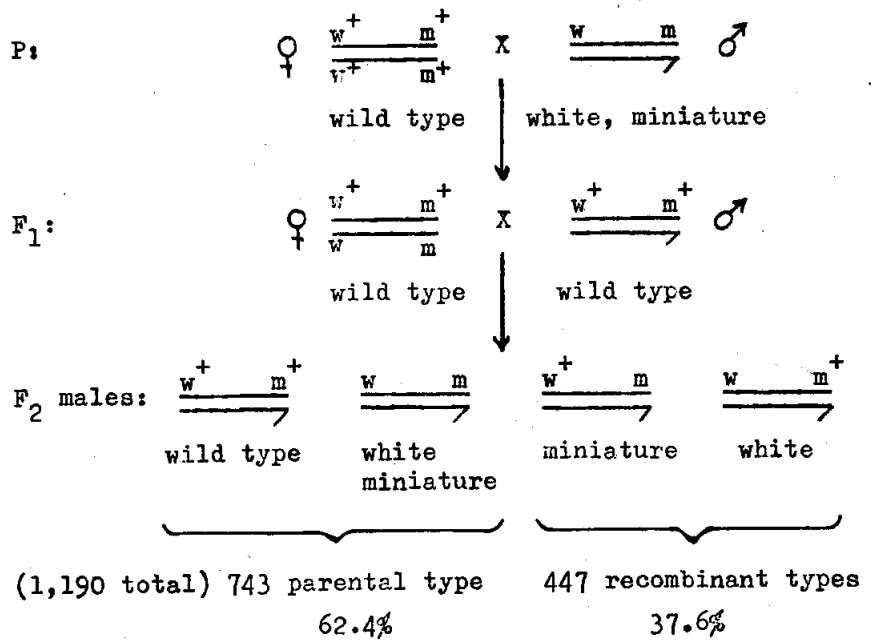


รูปที่ 14-3 การผสมระหว่างแมลงหวี่ที่มีลักษณะเช่นเดียวกันกับในรูปที่ 14-2 แต่ใช้ F_1 ตัวเมียไปผสมต่อกับตัวผู้ลำตัวสีดำ ปีกกุด จะได้ลูกที่เป็นทั้ง parental และ recombination types เกิดขึ้น

จากการทดลองดังกล่าว จะเห็นได้ว่ายีนส์ทั้งสองตำแหน่งคงไม่ได้อยู่ใกล้ชิดกันมาก เพราะมี recombination เกิดขึ้นทางฝ่ายตัวเมียถึง 17% การที่ไม่มีพวก crossovers เกิดขึ้นทางฝ่ายตัวผู้ สันนิษฐานว่าคงมีสาเหตุมาจากไม่มี chiasmata ใน spermatogenesis

Incomplete linkage and recombination

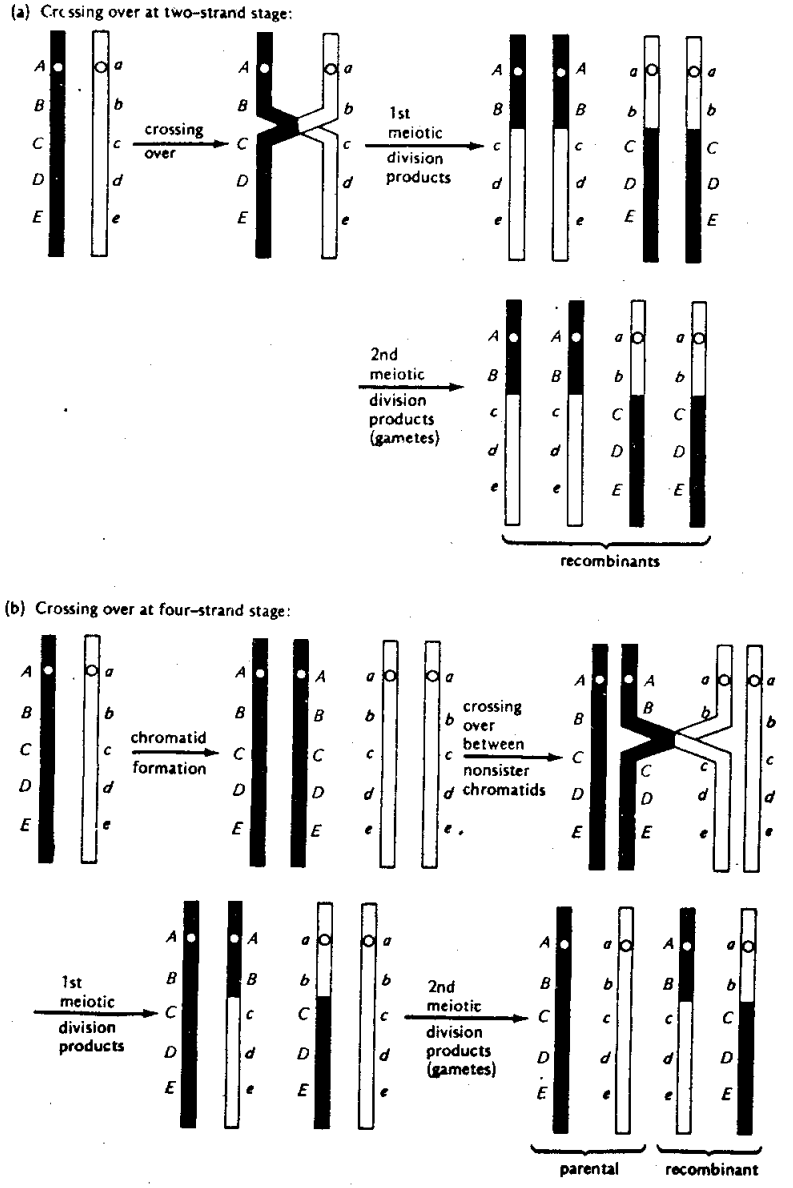
ในสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ที่มีการสืบพันธุ์แบบใช้เพศ ยีนส์ที่อยู่บนโครโมโซมเดียวกันใน linkage groups ต่าง ๆ จะแสดง complete linkage น้อยมาก มักจะมีการจัดเรียงกันใหม่ของ alleles ต่าง ๆ เกิดขึ้นได้เสมอ Morgan เป็นคนแรกที่ได้สังเกตพบว่ามีการจัดเรียงกันใหม่ของ alleles ที่อยู่บนโครโมโซมเดียวกันเกิดขึ้น เมื่อเขาทำการผสมพันธุ์ระหว่างแมลงหวี่ที่เป็นปกติกับ mutants ที่มีตาสีขาวและปีกสั้น (white-eyed and miniature-winged) โดยลักษณะตาสีขาวและปีกสั้นเป็นลักษณะด้อยที่ควบคุมโดยยีนส์ที่มีตำแหน่งอยู่บน x-chromosome ดังนั้นในแมลงตัวผู้จึงเป็น hemizygous เมื่อมี mutant alleles ปรากฏอยู่เพียงตัวเดียวก็สามารถแสดงลักษณะของมันออกมาได้ เมื่อ Morgan ปล่อยให้ตัวผู้ตาสีขาว ปีกสั้น ผสมกับตัวเมียปกติ F_1 ตัวเมียที่เกิดขึ้นมีลักษณะปกติ แต่เป็น heterozygous และเมื่อปล่อยให้ F_1 ผสมกันเองต่อไป จนได้ F_2 จึงแยกเอาเฉพาะตัวผู้มาตรวจดูลักษณะตาและปีก เขาพบว่ามีแมลงหวี่เกิดขึ้นสี่พวกด้วยกัน คือ พวกที่เป็นปกติ พวกที่มีตาสีขาวและปีกสั้น พวกที่มีแต่ตาสีขาว หรือมีแต่ปีกสั้น ขึ้นอยู่กับว่ามันได้รับ x-chromosome ที่มี alleles ใดไปจาก F_1 ตัวเมีย ในทางทฤษฎีแล้ว ถ้าหากว่ายีนส์ทั้งสองคู่เป็นอิสระต่อกัน คาดว่า F_2 ตัวผู้ทั้งสี่พวกจะมีอยู่ในอัตราส่วนเท่า ๆ กัน แต่ถ้าหากว่ายีนส์ทั้งสองตำแหน่งแสด complete linkage ก็ควรจะได้แต่ F_2 ตัวผู้ที่มีลักษณะเหมือนพ่อแม่ในชั่วแรกเพียงสองพวกเท่านั้น จากผลการทดลองที่เกิดขึ้นจริง ปรากฏว่าใน F_2 ตัวผู้ที่นำมาจำแนกทั้งหมด 1,190 ตัว มีพวกที่มีลักษณะเหมือนพ่อแม่ (parental types) คือเป็นปกติ หรือมีตาสีขาวและปีกสั้น เกิดขึ้น 62.4% และมีพวกใหม่ (recombinant types) คือมีตาสีขาว หรือมีปีกสั้น เกิดขึ้น 37.6% (รูปที่ 14-4) แสดงว่าต้องมี crossing over หรือมีการแลกเปลี่ยนสารกรรมพันธุ์ระหว่าง x-chromosomes ทั้งสองอันเกิดขึ้นในแมลงหวี่ F_1 ตัวเมียจึงทำให้ alleles ซึ่งเคยอยู่ด้วยกันบนโครโมโซมเดียวกันมีการย้ายที่ไปอยู่บนโครโมโซมอีกอันหนึ่งซึ่งเป็นคู่เดียวกันได้



รูปที่ 14-4 Recombination ที่เกิดขึ้นระหว่างยีนส์สองตำแหน่งบน x-chromosome

Four-strand crossing over

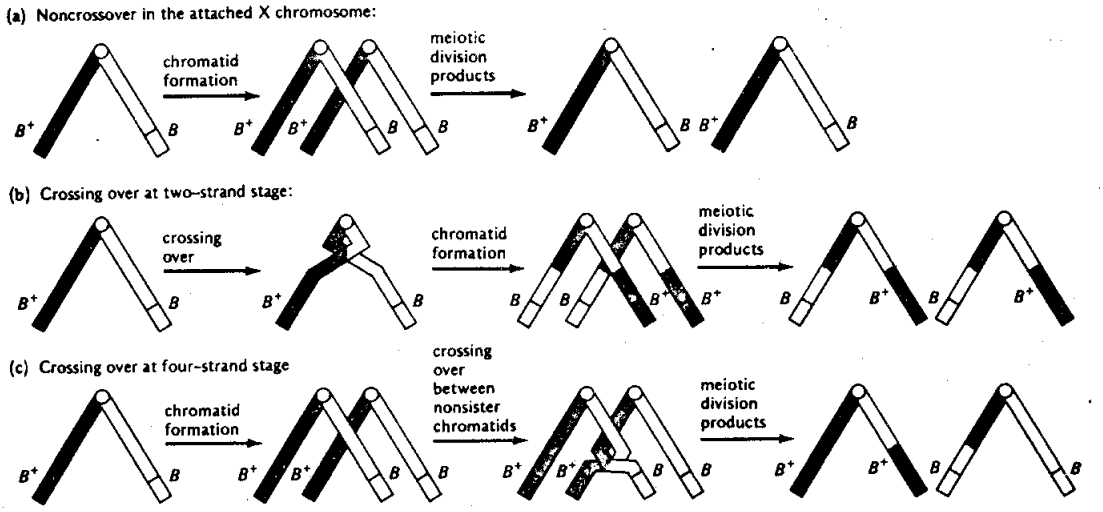
เมื่อเป็นที่ทราบแน่ชัดว่ามี crossing over เกิดขึ้นกับ homologous chromosomes ใน meiosis แล้ว ก็มีปัญหาต่อไปอีกว่ามันเกิดขึ้นในระยะใดกันแน่ คือมันเกิดขึ้นในขณะที่ homologous chromosomes มาเข้าคู่กัน แต่ยังไม่มี replication เกิดขึ้น แต่ละ bivalent จึงมีเพียงสอง strands (two-strand stage) เท่านั้น หรือว่ามันไปเกิดขึ้นภายหลังจากที่โครโมโซมทั้งคู่ได้ double เป็นสี่ chromatids (four-strand stage) แล้ว ถ้าหากว่ามันเกิดขึ้นใน two-strand stage แต่ละ crossing over ที่เกิดขึ้นจะทำให้มี recombinant gametes ขึ้นได้ถึงสี่อัน (รูปที่ 14-5a) แต่ถ้าหากมันเกิดขึ้นใน four-strand stage จะได้ gametes ที่เป็น recombinant types เพียงสองอัน และ parental types อีกสองอัน (รูปที่ 14-5b) ดังนั้นในการที่จะตอบปัญหานี้ได้ จึงจำเป็นจะต้องมีการทดลองที่เปิดโอกาสให้ตรวจดู gametes ที่เป็นผลจากแต่ละ crossing over ได้



รูปที่ 14-5 ความแตกต่างที่เกิดจาก crossing over ใน (a) two-strand stage และ (b) four-strand stage

จากการศึกษากับ attached-X chromosomes ของแมลงหวี่ซึ่งมันจะถูกถ่ายทอดไปด้วยกันคล้ายกับเป็นโครโมโซมเพียงอันเดียว ถ้าหากทำให้ยีนส์ตำแหน่งหนึ่งบนโครโมโซมทั้งสองอันมี alleles อยู่ไม่เหมือนกัน (เป็น heterozygous genotype) เช่น

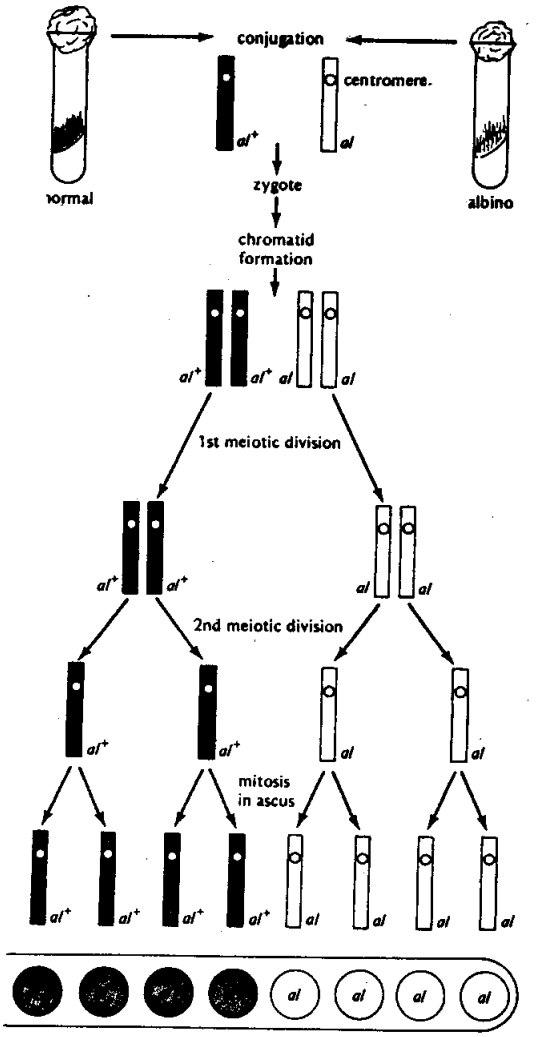
ลักษณะ bar eye ควบคุมโดย allele B^+ เป็น semidominant ต่อ allele B ที่นำลักษณะปกติ แมลงหวี่ที่เป็น B^+ B เมื่อเกิด two-stranded crossover ในโครโมโซมที่คิดกันทั้งสองอัน มันจะยังคงสร้าง parental-type gametes ได้เหมือนกับไม่มี cross-over เกิดขึ้น คือเป็น gamete ที่มี alleles B^+ กับ B อยู่ด้วยกัน (รูปที่ 14-6a และ b) แต่ถ้าหากเกิด four-stranded crossover ขึ้นจะได้ gametes ที่มีแต่ allele B^+ หรือ B อยู่ด้วยกันบน attached-X chromosomes (รูปที่ 14-6c) และเนื่องจากว่าลักษณะ bar เป็น semidominant ดังนั้นในแมลงหวี่ตัวเมียที่เป็น $\widehat{XX}Y$ พวกที่เป็น homozygous bar จะมีลักษณะตาที่ยิดไปจากพวก heterozygous bar สามารถจะตรวจสอบดูได้ ซึ่งจากการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า crossing over นั้น เกิดขึ้นใน four-strand stage



รูปที่ 14-6 ผลของ noncrossing over และ crossing over ที่เกิดขึ้นใน two-and four-strand stages ในแมลงหวี่ตัวเมียที่มี attached-X chromosomes และเป็น heterozygous B^+B

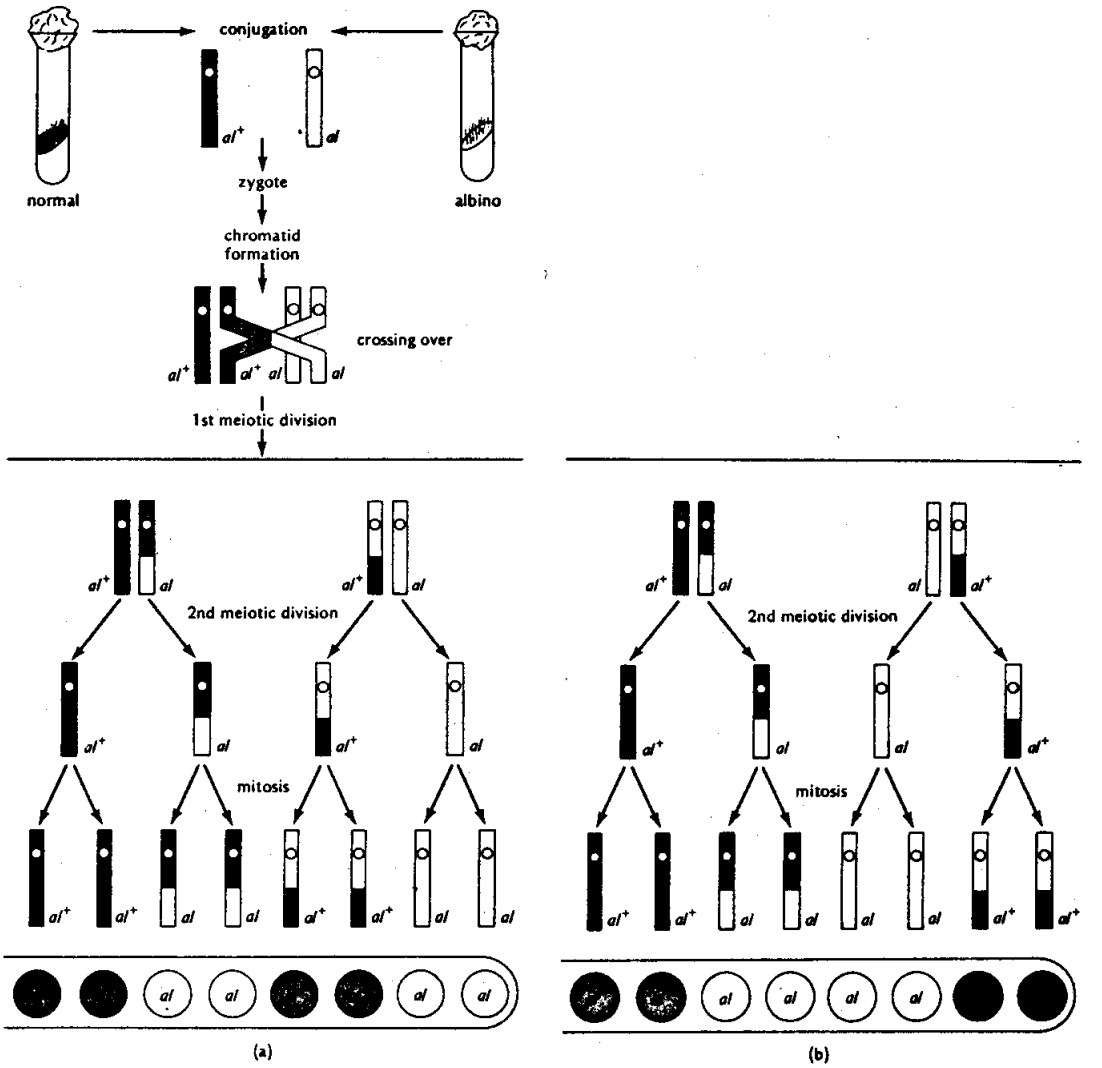
ในสิ่งมีชีวิตที่เป็น haploid ซึ่งสามารถจะทำ tetrad analysis คือตรวจดู tetrad products ของ meiosis ได้ จะมีประโยชน์มากในการนำมาใช้ศึกษาถึง recombination ที่เกิดขึ้น เช่น ถ้าศึกษากับ Neurospora ผลของ meiosis ที่เกิดขึ้นแต่

ละครั้งจะเป็น ascospores ที่เรียงเป็นลำดับอยู่ใน ascus ถ้าหากทำการตรวจดูลักษณะที่เกิดขึ้นใน ascospores เหล่านั้นโดยตรง หรือนำมันไปเพาะเลี้ยงดูแยกกัน ก็สามารถจะบอกได้ว่ามันมีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมเกิดขึ้นหรือไม่ ตัวอย่าง ถ้าหากทำการผสมระหว่างพวก albino (al) กับ normal (al^+) ถ้าหากว่าไม่มี crossing over เกิดขึ้น จะมี albino spores กับ normal spores เรียงกันแบบสี่คอสี่ (รูปที่ 14-7) และถ้าหากว่ามี crossing over เกิดขึ้นระหว่าง al gene กับ centromere ใน two-strand stage



รูปที่ 14-7 ผลจากการผสมระหว่าง Neurospora สอง strains คือ normal (al^+) กับ albino (al) เมื่อไม่มี crossing over เกิดขึ้นระหว่าง al gene กับ centromere จะทำให้ chromatids ที่มี al อยู่ แยกออกจาก chromatids ที่มี al^+ ได้ใน first meiotic division จึงเป็น first division segregation

ก็ควรจะได้ลำดับการเรียงของ albino และ normal spores เป็นแบบ 4:4 เช่นเดียวกัน แต่ถ้าหากว่า crossing over เกิดขึ้นใน four-strand stage ระหว่าง nonsister chromatids ใน first meiotic division (รูปที่ 14-8) ลำดับของ spores จะเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้น



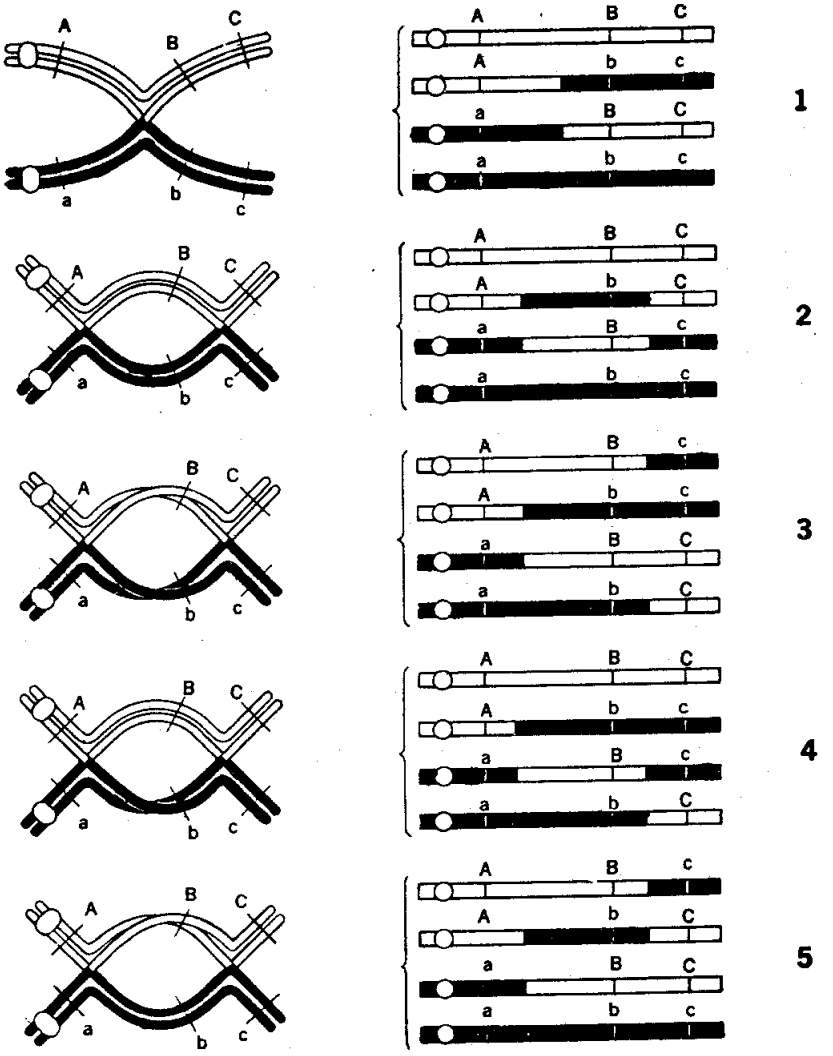
รูปที่ 14-8 ผลจากการผสมระหว่าง Neurospora สองพวก เช่นเดียวกับในรูปที่ 14-7 แต่มี crossing over เกิดขึ้นระหว่าง al gene กับ centromere การเรียงตัวของ first meiotic division products จะมีผลต่อเนื่องไปทำให้การเรียงตัวของ chromatids ที่มี genotypes ต่างกัน (ก่อนที่จะมี mitosis ตามมา) เป็นไปได้หลายแบบ คือ al^+ al al^+ al ดังแสดงไว้ใน (a) หรือเป็น al^+ al al al^+ ใน (b) หรือเป็น al al^+ al^+ al (ไม่ได้แสดงไว้) จะเห็นว่าการแยกตัวของ chromatids ที่มี al ออกจากพวกที่มี al^+ จะยังไม่เกิดขึ้นจนกว่าจะมี second meiotic division จึงเป็น second division segregation

แล้วแต่ว่าการจัดเรียงของโครโมโซมในระยะ metaphase ของ second meiotic division จะเป็นแบบไหน มันอาจมี albino กับ normal spores เรียงสลับกันทีละสอง หรืออาจจะมี albino อยู่ตรงกลางสี่อัน และมี normal กระหนาบอยู่ข้างละสองอัน หรืออาจเป็น normal อยู่กลางสี่อัน และมี albino กระหนาบอยู่ข้างละสองอันก็ได้ จากการทดลองโดย Lindegren ก็ปรากฏผลออกมาว่ามีการเปลี่ยนแปลงในลำดับของ spores เกิดขึ้นจริง จึงเป็นการยืนยันอีกทางหนึ่งว่า crossing over จะเกิดขึ้นระหว่าง nonsister chromatids ใน four-strand stage

นอกจากนั้นยังมีการทดลองกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ มาสนับสนุนอีกว่า recombination นั้นเป็นผลจากการแลกเปลี่ยน blocks of genes ระหว่าง homologous chromosomes คือระหว่างสอง chromatids ของแต่ละ bivalent ดังนั้น crossing over ที่เกิดขึ้น ณ จุดใด ๆ ก็ตามของโครโมโซมจะมี chromatids เพียง 50% เท่านั้นที่เกี่ยวข้อง โดยแต่ละ crossing over ที่เกิดขึ้นจะให้ recombinant chromatids สองอันและ parental chromatids อีกสองอัน ดังนั้น recombination ที่เกิดขึ้นได้อย่างมากที่สุดจึงไม่เกิน 50%

Double crossing over

นอกจากจะมีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนเกิดขึ้นระหว่าง chromatids คู่ใดคู่หนึ่งของ homologous chromosomes ที่จุดใดจุดหนึ่งซึ่งเรียกว่า single chiasma หรือ single crossover แล้ว ยังอาจมี crossing over เกิดขึ้นพร้อมกันได้มากกว่าหนึ่งแห่ง เช่น ถ้ามันเกิดขึ้นสองแห่งกับ chromatids คู่เดียวกัน ก็เรียกว่า two-strand double crossovers ถ้ามันเกิดขึ้นสองแห่งและมี chromatids เกี่ยวข้องสามอัน เรียกว่า three-strand double crossovers และถ้าหากมี chromatidsทั้งสี่อันเข้าเกี่ยวข้อง ก็เรียกว่า four-strand double crossovers (รูปที่ 14-8)



รูปที่ 14-8 การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนระหว่าง chromatids แบบต่าง ๆ และผลที่เกิดขึ้น ตามมา 1. Single chiasma. 2. Two-strand double crossover. 3. Four-strand double crossover. 4 and 5. Three-strand double crossover.

Detection of linkage

ในการที่จะตรวจดูความแตกต่างระหว่าง random assortment กับ linkage นั้น วิธีที่ง่ายที่สุดคือ ตรวจนับจำนวนลูกที่เกิดขึ้นจริงจากการทดลองในแต่ละ phenotypic class และคำนวณหาจำนวนที่คาดว่าจะเกิดขึ้นตามทฤษฎี แล้วทำการทดสอบความแตกต่างที่เกิดขึ้นโดย chi-square test เช่น ในกรณีของ testcross หรือ backcross เมื่อสมมุติว่าทำการผสมระหว่าง AaBb x aabb ถ้าหากยีนส์ทั้งสองคู่เป็นอิสระต่อกัน และเกิด random assortment ควรมีลูกเกิดขึ้นสี่พวกด้วยกัน คือ AaBb, Aabb, aaBb และ aabb ในอัตราส่วน 1:1:1:1 หรือในกรณีของการผสมตัวเองให้แก่ AaBb คาดว่าควรจะได้ลูกสี่พวก คือ A-B-, A-bb, aaB-, และ aabb ในอัตราส่วน 9:3:3:1 แต่ถ้าหากยีนส์ทั้งสองคู่แสดง linkage จะไม่ได้ลูกในอัตราส่วนดังกล่าว อย่างไรก็ตาม นอกจากผลของ linkage จะทำให้อัตราส่วนที่คาดไว้เปลี่ยนแปลงแล้ว ยังมีสาเหตุอื่นอีกด้วย ได้แก่ การที่ลูกต่าง genotypes กันมีความสามารถในการอยู่รอดได้ไม่เหมือนกัน (viability effect) เช่น Aa กับ aa ถ้าหากมันมีความอยู่รอดได้ไม่เท่ากัน ในการผสมระหว่าง Aa กับ aa จะไม่ได้ 1Aa:1aa หรือการผสมระหว่าง Aa กับ Aa จะไม่ได้ 3A-:1aa ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องมีการทดสอบหาสาเหตุดังกล่าวด้วย คือทดสอบแยกกันเสียก่อนว่าในยีนส์แต่ละคู่นั้นมีการกระจายตัวตามที่คาดไว้หรือไม่ แล้วจึงมาทดสอบอีกทีว่ายีนส์ทั้งสองคู่นั้นเป็นอิสระต่อกันหรือไม่

เพื่อความเข้าใจจะขอยกตัวอย่างจากการผสมระหว่าง AABB x aabb หลังจากที่ได้ F_1 AaBb แล้วนำไป testcross กับ aabb ต่อ ได้ผลดังนี้

	AaBb	Aabb	aaBb	aabb	Total
Observed	140	38	32	150	360
Expected (1:1:1:1)	90	90	90	90	360

χ^2 3df = 135.19

เมื่อนำค่า chi-square ที่ได้ไปทดสอบ ปรากฏว่าค่าที่ตรวจนับได้จริงกับค่าที่คาดว่าจะได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง จึงจำเป็นจะต้องตรวจดูต่อไปว่าความแตกต่างดังกล่าวเกิดจากสาเหตุอะไรแน่

ในการทดสอบการกระจายตัวของยีนส์แต่ละคู่แยกกัน เมื่อพิจารณาจาก Aa x aa คาดว่าควรจะได้ 1Aa:1aa หาค่า chi-square ได้ดังนี้

	Aa	aa	Total
Observed	140 + 38 = 178	32 + 150 = 182	360
Expected (1:1)	180	180	360

$\chi^2_{1df} = 0.025$

เมื่อตรวจสอบค่า chi-square พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างค่าที่ตรวจนับได้กับค่าที่คาดว่าจะได้ตามทฤษฎี

การทดสอบการกระจายตัวที่เกิดจาก Bb x bb ก็ทำได้เช่นเดียวกัน

	Bb	bb	Total
Observed	140 + 32 = 172	38 + 150 = 188	360
Expected (1:1)	180	180	360

$\chi^2_{1df} = 0.62$

เมื่อตรวจสอบค่า chi-square ก็พบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างค่าที่ตรวจนับได้ กับค่าที่คาดว่าจะได้ตามทฤษฎีเช่นเดียวกัน

ในการพิจารณาจากยีนส์ทั้งสองคู่รวมกันว่ามันมี random assortment หรือไม่ จะเห็นว่า F_1 AaBb นั้น เกิดจากการรวมระหว่าง gametes AB กับ ab เมื่อนำมันไปผสมกับ aabb แล้วได้ลูกสี่ชนิดแสดงว่า AaBb จะต้องสร้าง gametes ขึ้นมาสี่ชนิดด้วยกัน คือ AB, ab, Ab, aB ถ้าให้ AB กับ ab เป็น parental types และ Ab กับ aB เป็น recombinant types จะเห็นว่าในกรณีของ random assortment พวกที่มีลักษณะเป็น parental types ควรจะเกิดขึ้นพอ ๆ กับพวก recombinant types ซึ่งสามารถจะทดสอบได้ดังนี้

	Parental	Recombinant	
	AB + ab	Ab + aB	Total
Observed	140 + 150 = 290	38 + 32 = 70	360
Expected	180	180	360

$\chi^2_{1df} = 133.22$

ค่า chi-square ที่คำนวณได้ แสดงว่าค่าที่ตรวจนับได้นั้นแตกต่างไปจากค่าที่คาดไว้อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ดังนั้นจากการทดสอบทั้งหมดจึงมีความเชื่อมั่นว่าการที่อัตราส่วนของลูกทั้งสี่พวกแตกต่างไปจากอัตราส่วน 1:1:1:1 ที่คาดไว้นั้น เป็นผลมาจาก linkage ของยีนส์ทั้งสองคู่

Calculation of recombination frequencies

1. Two-point crosses

Hutchison ได้ศึกษา linkage ของยีนส์สองคู่ที่ควบคุมลักษณะ เมล็ดของข้าวโพด คือ ลักษณะ เมล็ดมีสี (C = colored) เป็นลักษณะ เด่นต่อ เมล็ดไม่มีสี (c = colorless) และลักษณะ เมล็ดเรียบ (S = full) เป็นลักษณะ เด่นต่อ เมล็ดยุบ (s = shrunken) เขาได้ผสมข้าวโพดสองพันธุ์เข้าด้วยกัน คือพันธุ์หนึ่ง เมล็ดมีสี และ เมล็ดเรียบ (CCSS) กับอีกพันธุ์หนึ่ง เมล็ดไม่มีสี และ เมล็ดยุบ (ccss) เมื่อได้ F_1 CcSs ซึ่ง เมล็ดมีสีและเรียบแล้วได้นำไป testcross กับ ccss ซึ่งถ้าหากว่ายีนส์ทั้งสองคู่เป็นอิสระต่อกันแล้ว ควรจะได้ลูกเกิดขึ้นสี่ชนิดด้วยกัน ในอัตราส่วน 1:1:1:1 แต่จากการทดลองจริง ๆ ได้ผลดังนี้

Colored full	CS/cs	4032
Colored shrunken	Cs/cs	149
Colorless full	cS/cs	152
Colorless shrunken	cs/cs	4035
Total		8368

จะพบว่า เมล็ดที่มีลักษณะมีสีและ เมล็ดเรียบ กับ เมล็ดที่ไม่มีสีและ เมล็ดยุบนั้น มีลักษณะ เหมือนพันธุ์พ่อแม่ และจะเกิดขึ้นได้มากกว่า จึงเป็นพวก parental types หรือ noncrossovers ส่วน เมล็ดอีกสองพวกนั้น เป็นผลจากการจัดเรียงกันใหม่ของยีนส์ จึงเป็น recombinations หรือ crossovers เมื่อคำนวณเป็น เปอร์เซ็นต์ออกมา พบว่า เมล็ดที่มีลักษณะของ parental types เกิดขึ้น $= \frac{(4032 + 4035)}{8368} \times 100 = 96.4\%$ ส่วนพวกที่เป็น recombinations จะเกิดขึ้น $= \frac{(149 + 152)}{8368} \times 100 = 3.6\%$ (รูปที่ 14-9) แสดงว่ายีนส์ทั้งสองคู่ของข้าวโพดไม่ได้เป็นอิสระต่อกัน แต่อยู่บนโครโมโซมเดียวกัน โดยในการสร้าง gametes นั้น alleles C กับ S และ c กับ s จะไปอยู่ใน gametes เดียวกันถึง 96.4% ของ gametes ทั้งหมด เรียกสภาพของ linkage แบบนี้ว่า coupling phase