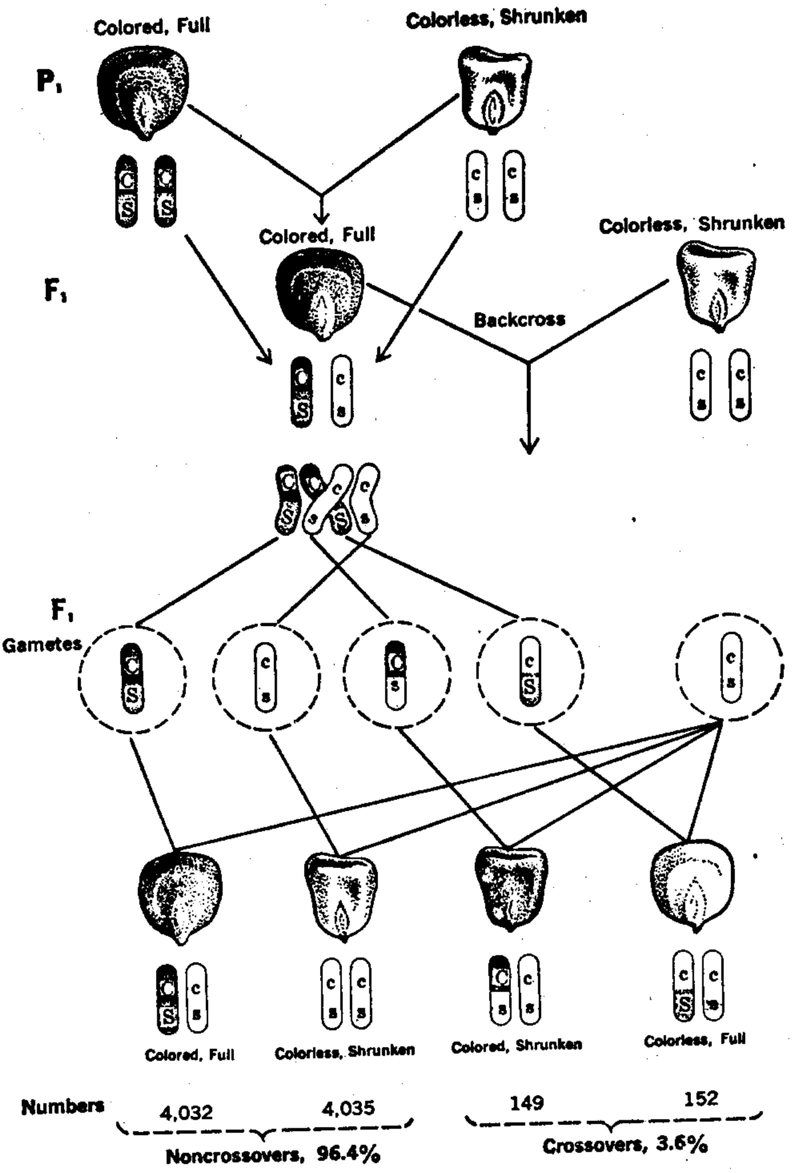


รูปที่ 14-9 linkage ของยีนส์สองคู่ที่ควบคุมลักษณะสี (colored or colorless aleurone) และลักษณะเมล็ด (full or shrunken endosperm) ของข้าวโพด แสดงให้เห็นถึงผลของ crossing over ที่เกิดขึ้น

คือมี dominant alleles อยู่ด้วยกันบนโครโมโซมอันหนึ่ง และ recessive alleles อยู่บนอีกโครโมโซมหนึ่ง ส่วน gametes ที่มี alleles C กับ s และ c กับ S อยู่ด้วยกันนั้น มีเพียง 3.6% โดยเป็นผลจาก crossing over ที่เกิดขึ้นระหว่างตำแหน่งของยีนส์ทั้งสองคู่

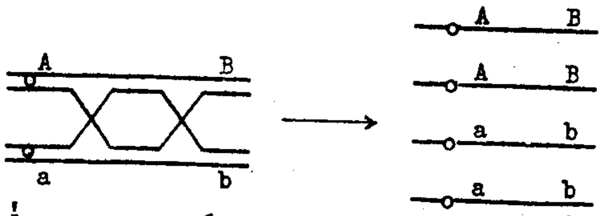
Hutchison ได้ทำการทดลองผสมข้าวโพดอีกชุดหนึ่งระหว่างพวกที่เมล็ดไม่มีสีและเมล็ดเรียบ กับพวกที่เมล็ดมีสีและเมล็ดย่น ซึ่งคราวนี้ยีนส์ที่ควบคุมลักษณะทั้งสองจะ link กันอยู่ในสภาพ repulsion phase คือบนโครโมโซมเดียวกันจะมี dominant allele ของยีนส์คู่หนึ่งอยู่กับ recessive allele ของยีนส์อีกคู่หนึ่ง เมื่อได้ F_1 CcSs ซึ่งให้เมล็ดมีสีและเมล็ดเรียบแล้วนำไป testcross กับ ccss ได้ผลดังนี้

Colored full	CS/cs	638
Colored shrunken	Cs/cs	21379
Colorless full	cS/cs	21906
Colorless shrunken	cs/cs	672
Total		44595

เมล็ดที่เป็น parental types นั้นจะเกิดขึ้นมาก และมีลักษณะตรงข้ามกับที่เกิดขึ้นในการทดลองคราวแรก เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ออกมาแล้วได้ $\frac{(21379 + 21906)}{44595} \times 100 = 97.06\%$ ส่วนพวก recombinations จะเกิดขึ้น $\frac{(638 + 672)}{44595} \times 100 = 2.94\%$ ซึ่งต่ำกว่าที่พบในการทดลองชุดแรกเล็กน้อย ดังนั้นวิธีที่ดีที่สุดในการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ recombinations ระหว่างยีนส์ต่าง ๆ คือทำการทดลองหลาย ๆ ครั้ง แล้วนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยอีกทีหนึ่ง

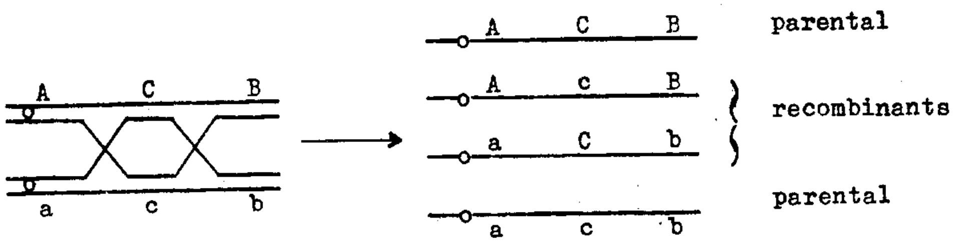
2. Three-point crosses

ในการที่ crossing over จะเกิดขึ้นได้ระหว่างยีนส์สองตำแหน่งใด ๆ นั้น ยีนส์ดังกล่าวจะต้องอยู่ห่างจากกันพอสมควร แต่ถ้ามันอยู่ห่างกันเกินไป อาจมี crossing over เกิดขึ้นมากกว่าหนึ่งแห่งก็ได้ เช่น ถ้าหากมันเกิดขึ้นสองแห่งด้วยกัน จะทำให้ chromatids ที่เกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนกันนั้นมียีนส์เหมือนกับ parental types ซึ่งแสดงให้เห็นได้ดังนี้



จะเห็นได้ว่าเมื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของ recombination ที่เกิดขึ้นจะได้ต่ำกว่าความเป็นจริง ดังนั้นแทนที่จะคำนวณโดยอาศัยผลจากการผสมระหว่างยีนส์ทั้งสองคู่โดยตรง ก็จะหา

ยีนส์อีกตำแหน่งหนึ่งที่อยู่ระหว่างกลางยีนส์ทั้งสองเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย เพื่อทำให้ระยะทางมันถูกแบ่งออกเป็นสองตอน จะทำให้มีความผิดพลาดเกิดขึ้นน้อยลง การผสมที่เกี่ยวข้องกับยีนส์สามคู่ด้วยกันได้รับความนิยมมากในการนำมาใช้หาลำดับ และระยะระหว่างยีนส์ต่าง ๆ ทั้งนี้เพราะว่ามันเปิดโอกาสให้มี recombination ที่เป็นผลจาก double crossover ปรากฏออกมาด้วย จึงจะทำให้ตรวจดูลำดับของยีนส์ที่เกี่ยวข้องได้



จากการผสมระหว่างแมลงหวี่ที่เป็น homozygous ใน sex-linked genes สามตำแหน่งด้วยกัน คือ scute (sc, certain bristles missing), echinus (ec,rough eye), crossveinless (cv, certain wing veins missing) กับ wild type เมื่อได้ F_1 แล้วนำเอาตัวเมียไปผสมต่อกับตัวผู้ที่เป็น mutant ในยีนส์ทั้งสามคู่ (เป็น hemizygous genotype เนื่องจากไม่มียีนส์ดังกล่าวอยู่บน Y-chromosome) นำลูกที่เกิดจาก testcross มาจำแนกออกตาม phenotypeต่าง ๆ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 14-1 จากแมลงหวี่ทั้งหมด 20785 ตัว จะเป็นพวก nonrecombinationsหรือ parental types 83.64% นอกนั้นเป็นพวก recombinations ซึ่งอาจเกิดขึ้นจาก single crossing over (SCO)หรือ double crossing over (DCO) ก็ได้

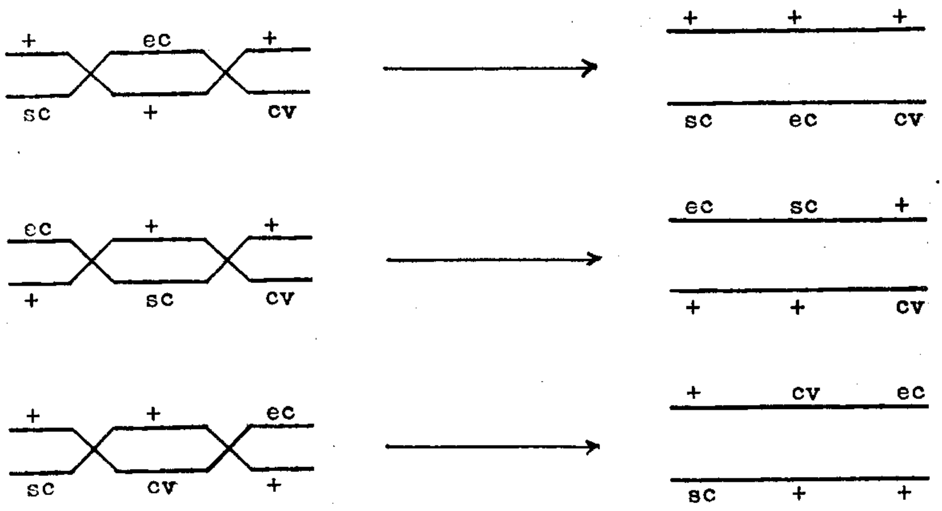
ตารางที่ 14-1 ผลของ crossing overs ที่เกิดขึ้นระหว่าง sex-linked genes scute, echinus, and crossveinless ในแมลงหวี่

F_1: $\frac{+\ ec\ +}{sc\ +\ cv}$ ♀ × *sc ec cv* ♂

F_2 Phenotypes	F_2 Genotypes Male	F_2 Genotypes Female	Observed No.	
echinus	+ *ec* +	$\frac{+\ ec\ +}{sc\ ec\ cv}$	8,576	$\frac{17{,}384}{20{,}785} = 83.64\%$ nonrecombinants
scute crossveinless	*sc* + *cv*	$\frac{sc\ +\ cv}{sc\ ec\ cv}$	8,808	
scute echinus	*sc ec* +	$\frac{sc\ ec\ +}{sc\ ec\ cv}$	681	$\frac{1397}{20{,}785} = 6.72\%$ recombinants: *sc···ec*
crossveinless	+ + *cv*	$\frac{+\ +\ cv}{sc\ ec\ cv}$	716	
echinus crossveinless	+ *ec cv*	$\frac{+\ ec\ cv}{sc\ ec\ cv}$	1,002	$\frac{1999}{20{,}785} = 9.62\%$ recombinants: *ec···cv*
scute	*sc* + +	$\frac{sc\ +\ +}{sc\ ec\ cv}$	997	
scute echinus crossveinless	*sc ec cv*	$\frac{sc\ ec\ cv}{sc\ ec\ cv}$	4	$\frac{5}{20{,}785} = .02\%$ double crossovers: *sc···ec···cv*
wild type	+ + +	$\frac{+\ +\ +}{sc\ ec\ cv}$	1	
			20,785	

recombination frequency *sc-ec* = 6.72 + .02 = 6.74
recombination frequency *ec-cv* = 9.62 + .02 = 9.64
recombination frequency *sc-cv* = 6.72 + 9.62 + 2(.02) = 16.38

โดยเหตุที่มียีนส์เข้าเกี่ยวข้องถึงสามคู่ด้วยกัน ลำดับของยีนส์อาจเป็น sc-ec-cv (หรือ cv-ec-sc) หรือ ec-sc-cv (หรือ cv-sc-ec) หรือ sc-cv-ec (หรือ ec-cv-sc) อันใดอันหนึ่ง และถ้าหากว่ายีนส์เหล่านี้อยู่ห่างกันพอสมควร จะมี DCO เกิดขึ้นได้ด้วย ดังนั้นในการที่จะหาว่าลำดับของยีนส์ที่ถูกต้องเป็นแบบไหน ให้หาพวก recombinations ที่เป็นผลจาก DCO เสียก่อน ซึ่งพวกนี้จะเกิดขึ้นในอัตราที่ต่ำสุดด้วยเหตุผลที่จะกล่าวถึงภายหลัง จากนั้นจึงนำ genotypes ของ F_1 มาจัดเรียงยีนส์ในลำดับต่าง ๆ แล้วลองดูว่าถ้าทำให้เกิด DCO ในแต่ละแบบแล้วมีแบบไหนที่ให้ recombinations เหมือนกับที่ได้จากการทดลองจริง ๆ ซึ่งลำดับนั้นแหละจะเป็นลำดับที่ถูกต้อง จากตารางที่ 14-1 จะเห็นว่า F_1 มี genotype เป็น +ec+/sc+cv ถ้านำมาจัดเรียงลำดับของยีนส์และทำให้เกิด DCO ดู จะได้ผลแตกต่างกันดังนี้ (แสดงไว้แต่ chromatids ที่เกี่ยวข้องกับ crossing over)



จะเห็นได้ว่า ลำดับของยีนส์ที่ถูกต้องคือ sc-ec-cv จากนั้นจึงทำการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของ recombinations ที่เกิดขึ้นระหว่างยีนส์ sc-ec และ ec-cv แยกกัน โดยจะต้องนำเอาพวก recombinations ที่เป็นผลจาก DCO เข้ามาคิดรวมเข้าไปด้วย เพราะว่ามันก็เป็นส่วนหนึ่งของ crossing over ที่เกิดขึ้นระหว่างยีนส์แต่ละคู่เช่นกัน แต่มี phenotypes แตกต่างไปจาก recombinations ที่เกิดจาก SCO ทั้งหลาย จากตารางที่ 14-1 SCO ระหว่างยีนส์ sc-ec จะให้ recombinations 6.72% เมื่อรวมผลจาก DCO เข้าไปด้วยจะมีเปอร์เซ็นต์ recombination ที่แท้จริงเป็น 6.72 + 0.02 = 6.74% และในทำนองเดียวกัน SCO ระหว่างยีนส์ ec-cv จะให้ recombinations 9.62% เมื่อรวมกับของ DCO ด้วยจะได้ 9.62 + 0.02 = 9.64% ดังนั้นเปอร์เซ็นต์ recombination ระหว่างยีนส์ sc-cv จึงเท่ากับ 6.74 + 9.64 = 16.38%

Interference and coincidence

จากตัวอย่างของ three-point crosses จะเห็นว่ามีพวก double crossovers เกิดขึ้นในอัตราค่อนข้างต่ำมาก ถ้าหาก crossing over ที่เกิดขึ้นในระหว่างยีนส์สองตำแหน่งใด ๆ ไม่มีผลต่อ crossing over ที่จะเกิดขึ้นระหว่างยีนส์ที่อยู่ถัดไป และถ้าหากการเกิด crossing over ในแต่ละแห่งเป็นไปโดยสุ่ม คาดว่า probability ที่จะมี DCO เกิดขึ้นจะเท่ากับผลคูณระหว่าง probabilities หรือ frequencies ของ SCO ทั้งสองแห่ง จากตารางที่ 14-1 ในจำนวนแมลงหวี่ทั้งหมด 20,785 ตัว มี frequencies ของ crossovers

ที่จะเกิดขึ้นระหว่างยีนส์ sc-ec อยู่ 0.0674 และระหว่างยีนส์ ec-cv อยู่ 0.0964 ดังนั้น probability ที่จะเกิด DCO ในที่ทั้งสองพร้อมกัน ควรจะเท่ากับ 0.0674 x 0.0964 = 0.0065 ซึ่งถ้าคิดออกมาเป็นจำนวนแมลงหวี่พวก double crossovers แล้ว จะได้ 20,785 x 0.0065 = 135 ตัว แต่ที่มันเกิดขึ้นจริง ๆ นั้นมีเพียง 5 ตัว หรือคิดเป็น frequency เท่ากับ 0.00024 ซึ่งน้อยกว่าที่คาดไว้มาก และไปสอดคล้องกับผลการทดลองอีกเป็นจำนวนมากที่ยืนยันว่า DCO จะเกิดขึ้นน้อยกว่าที่คาดไว้เสมอ แสดงว่าถ้าเกิด crossing over ขึ้นในที่แห่งใดแห่งหนึ่งบนโครโมโซมแล้ว มันจะไปรบกวนหรือขัดขวางไม่ให้เกิด crossing over ขึ้นพร้อมกันในบริเวณข้างเคียง Muller ได้เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า interference

ถ้าหากทำการคำนวณหาอัตราส่วนระหว่าง observed frequency of double crossovers กับ expected frequency of double crossovers ค่าที่ได้คือ coincidence coefficient จะเป็นเครื่องชี้ให้เห็นว่ามี interference เกิดขึ้นมากน้อยแค่ไหน

$$\text{Coincidence coefficient} = \frac{\text{observed frequency of double crossovers}}{\text{expected frequency of double crossovers}}$$

$$= \frac{\text{Observed DCO}}{\text{Expected DCO}}$$

$$\text{Interference} = 1\text{-coincidence coefficient}$$

เมื่อระยะระหว่างยีนส์ต่าง ๆ ลดลง ค่าของ coincidence coefficient จะลดลงด้วย แต่ค่าของ interference จะเพิ่มขึ้น ดังนั้นถ้ายีนส์สามตำแหน่งอยู่ใกล้ชิดกันมาก อาจมี DCO เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย หรือไม่เกิดขึ้นเลยก็ได้

จากผลการทดลองในตารางที่ 14-1 จะได้ค่า coincidence coefficient = $\frac{0.00024}{0.00650} \times 100$ หรือ $\frac{5}{135} \times 100 = 3.7\%$ นั่นก็หมายความว่ามี double crossovers เกิดขึ้นจริง ๆ เพียง 3.7% ของที่คาดไว้เท่านั้น และมีผลจาก interference มากจนทำให้อีก 96.3% ของ double crossovers ที่คาดไว้ไม่เกิดขึ้น

ถ้าหากทำการทดลองแบบ three-point crosses กับยีนส์ชุดต่าง ๆ กันจะพบว่ามันมี interference เกิดขึ้นมากน้อยไม่เท่ากัน เช่น จากการทดลองอีกชุดหนึ่งระหว่าง F_1 ตัวเมียที่เป็น heterozygous ใน sex-linked genes สามตำแหน่งด้วยกัน คือ vermilion (v, bright scarlet eyes), cut (ct, cut wings), garnet (g, purplish

eye color) กับตัวผู้ที่เป็น mutant ในยีนส์ทั้งสาม โดยดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 14-2 และมีลำดับของยีนส์เป็น ct-v-g โดยมีพวก double crossovers เกิดขึ้นจริงใน frequency 0.005 แต่ที่คาดว่าจะเกิดขึ้นนั้นเป็น 0.160 x 0.111 = 0.0178 ดังนั้นจึงมี coincidence coefficient = $\frac{0.005}{0.0178}$ = 0.28 หรือ 28% และมี interference เกิดขึ้น 1-0.28 = 0.72 หรือ 72% ซึ่งต่ำกว่าที่เกิดขึ้นระหว่างยีนส์ sc-ec-cv มาก

<u>ตารางที่ 14-2</u> ผลของ crossing overs ที่เกิดขึ้นระหว่าง sex-linked genes vermilion, cut, and garnet ในแมลงหวี่

$F_1: \frac{v\ ct\ g}{+\ +\ +}$ ♀ × $v\ ct\ g$ ♂

F_2 (Males and Females)		Observed No.	
vermilion cut garnet	($v\ ct\ g$)	1015	$\frac{2385}{3249}$ = 73.4% nonrecombinants
wild type	(+ + +)	1370	
cut	(+ ct +)	249	$\frac{503}{3249}$ = 15.5% recombinants: $v \cdots ct$
vermilion garnet	(v + g)	254	
garnet	(+ + g)	185	$\frac{344}{3249}$ = 10.6% recombinants: $v \cdots g$
vermilion cut	($v\ ct$ +)	159	
cut garnet	(+ $ct\ g$)	8	$\frac{17}{3249}$ = .5% double crossovers: $ct \cdots v \cdots g$
vermilion	(v + +)	9	
		3249	

recombination frequency v-ct = 15.5 + .5 = 16.0
recombination frequency v-g = 10.6 + .5 = 11.1
recombination frequency ct-g = 15.5 + 10.6 + 2(.5) = 27.1

Linkage maps

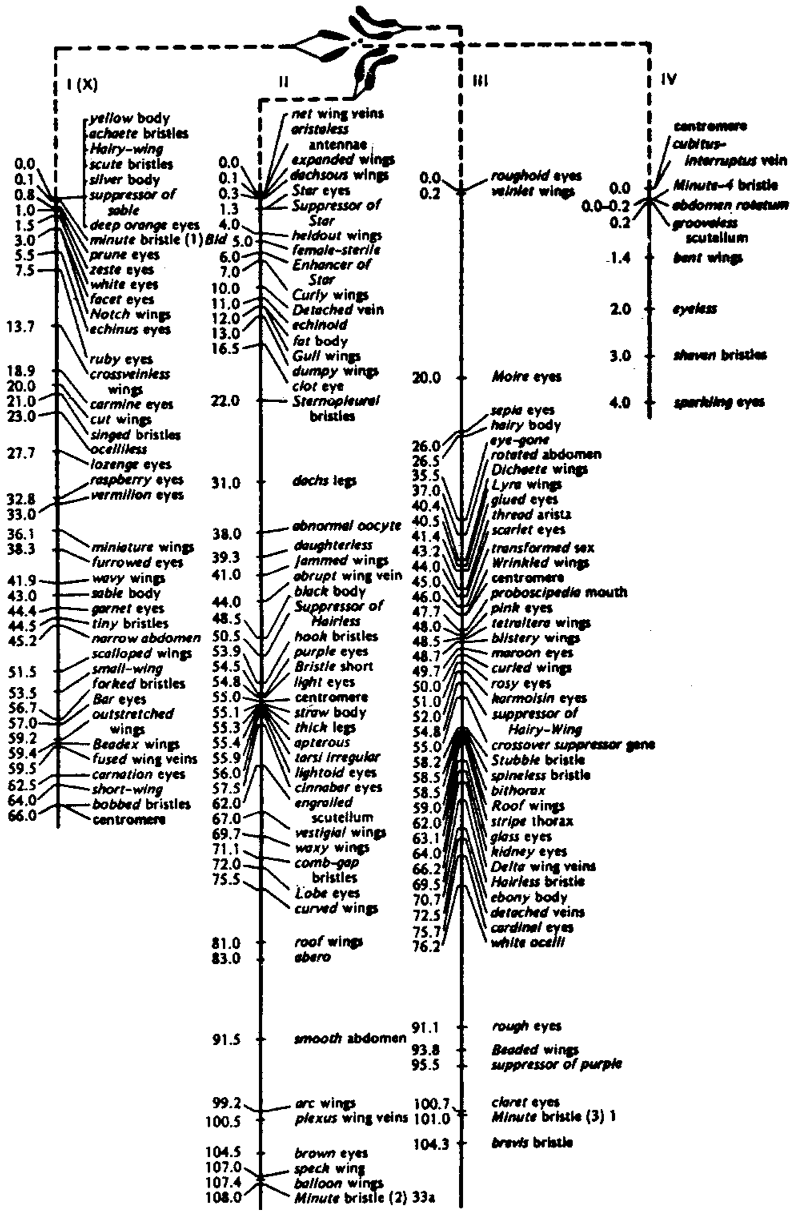
จากความรู้ที่ว่ามียีนส์เป็นจำนวนมากด้วยกันเรียงเป็นลำดับอยู่บนแต่ละโครโมโซม จึงมีผู้พยายามที่จะทำแผนที่แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งของยีนส์เหล่านั้น ซึ่งก็สามารถจะทำได้โดยการนำเอายีนส์มาแยกทดสอบเป็นกลุ่ม ๆ โดยแต่ละครั้งจะให้มียีนส์ตำแหน่งหนึ่งที่เคยอยู่ในการทดสอบกลุ่มอื่นรวมอยู่ด้วย เช่น จากการทดลองของ Bridges และ Olbrycht

โดยวิธี three-point crosses กับยีนส์ echinus crossveinless cut ได้ลำดับของยีนส์เป็น ec-cv-ct โดยมี recombination ระหว่างยีนส์ cv-ct 8.4% เมื่อนำมาพิจารณารวมถึงผลการทดลองในตารางที่ 14-1 และ 14-2 จึงได้ linkage map ของยีนส์ทั้งหกตำแหน่งเป็น sc-ec-cv-ct-v-g และถ้าให้ scute มีตำแหน่งอยู่ที่จุด 0.0 จะได้ตำแหน่งของยีนส์อื่น ๆ เมื่อคิดตามความสัมพันธ์กับยีนส์ scute แล้วเป็นดังนี้

recombination intervals:	(6.7)	(9.6)	(8.4)	(16.0)	(11.1)	
gene:	sc	ec	cv	ct	v	g
linkage position:	0.0	6.7	16.3	24.7	40.7	51.8

ระยะทางระหว่างยีนส์ต่าง ๆ จะคิดจากเปอร์เซ็นต์ของ recombination โดยตรง นักพันธุศาสตร์บางท่านได้ใช้คำว่า morgan มาเรียกหน่วยวัดระยะระหว่างยีนส์ โดยถือว่า 1 morgan = 1 percent recombination และ 1 centimorgan = 0.01 morgan แต่บางท่านก็ถือเอาว่า 1 percent recombination = 1 map unit จะเห็นได้ว่าการคำนวณหาระยะทางโดยวิธีนี้เป็นผลจากการศึกษากับ genetic crossover data นอกจากวิธีนี้แล้วยังสามารถจะหาลำดับของยีนส์ได้จากการศึกษาทาง cytology อีก โดยการอาศัยโครโมโซมที่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างเข้าช่วย ซึ่งผลจากการศึกษาเกี่ยวกับลำดับของยีนส์ทั้งสองวิธีจะออกมาเหมือนกัน แต่การคิดระยะทางระหว่างยีนส์เหล่านั้นจะได้ไม่เหมือนกัน

พวกแมลงหวี่ถือได้ว่าเป็นสิ่งมีชีวิตพวกหนึ่งที่ได้รับการนำมาศึกษายีนส์ต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง และสามารถจะทำแผนที่แสดงตำแหน่งของยีนส์เหล่านั้นบนโครโมโซมทั้งสี่คู่ได้ (รูปที่ 14-10)



<u>รูปที่ 14-10</u> linkage map ของยีนส์บางส่วนบนโครโมโซมทั้งสี่ของแมลงหวี่ (<u>Drosophila</u> <u>melanogaster</u>) จะสังเกตุเห็นว่ามียีนส์หลายตำแหน่งควบกันที่มีผลต่อลักษณะเดียวกัน เช่น ลักษณะสีของตา รูปร่างของปีก bristles เป็นต้น

<u>ปัจจัยที่มีผลกระทบกระเทือนต่อ crossing over</u>

การที่ crossing over ระหว่างยีนส์ต่าง ๆ จะเกิดขึ้นได้มากน้อยเพียงไร มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องอยู่หลายอย่างด้วยกัน เช่น

1. <u>เพศ</u> โดยทั่วไปแล้วสิ่งมีชีวิตที่มีโครโมโซมเพศพวกที่เป็น heterogametic จะมีอัตราการเกิด crossing over ต่ำ เช่น ในแมลงหวี่ตัวผู้จะไม่มี crossing over และใน silk worm ตัวเมียก็เช่นเดียวกัน

2. <u>อายุ</u> ในแมลงหวี่ตัวเมียถ้ามีอายุมากขึ้น crossing over มีแนวโน้มที่จะลดลง

3. <u>อุณหภูมิ</u> ในบริเวณที่มีอุณหภูมิซึ่งต่ำหรือสูงกว่า 22 องศาเซลเซียส อัตราของ crossing over จะเพิ่มขึ้น

4. <u>Centromere</u> ในบริเวณที่อยู่ใกล้ชิดกับ centromere มาก จะมี crossing over เกิดขึ้นน้อย จากการศึกษากับ structural chromosome aberrations เมื่อย้ายบางส่วนของโครโมโซมซึ่งมี marker genes บางตัวอยู่ให้ไปอยู่ใกล้กับ centromere พบว่าอัตราการเกิด crossing over ระหว่าง marker genes จะลดลง แม้ว่ายีนส์ดังกล่าวจะอยู่ห่างกันเท่าเดิมก็ตาม

5. <u>การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโครโมโซม</u> จะทำให้ลำดับของยีนส์เปลี่ยนไป ซึ่งจะส่งผลให้อัตราของ crossing over เปลี่ยนแปลงไปด้วย และบางกรณีอาจทำให้ crossing over ไม่เกิดขึ้นเลย หรือเกิดขึ้นได้น้อยลง เช่น กรณีของ crossover suppressors ซึ่งเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของโครโมโซมที่จะได้กล่าวถึงในบทต่อไป

6. <u>Genotypes</u> ในสิ่งมีชีวิต species เดียวกัน แต่ต่าง strains กันจะมีอัตราของ crossing over ที่เกิดขึ้นระหว่างยีนส์เดียวกันสองตำแหน่งไม่เท่ากัน สันนิษฐานว่าคงเกิดจากความแตกต่างในยีนส์เป็นจำนวนมากด้วยกัน และอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การทดลองที่ทำซ้ำขึ้นได้ผลแตกต่างไปจากเดิม จากการศึกษาของนักวิทยาศาสตร์บางท่านก็ได้พบว่ามี mutant genes เป็นจำนวนมากที่มีผลต่อ recombination frequencies ใน

แมลงหวี่ตัวเมีย โดยยีนส์บางตัวอาจแสดงผลในช่วงที่โครโมโซมกำลังเข้าคู่กัน และบางตัวอาจมีผลในขณะที่กำลังมีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนกันอยู่

7. **Cytoplasm** ได้มีการทดลองโดยการคัดเลือกแมลงหวี่ตัวเมียที่มีอัตราของ crossing over เกิดขึ้นต่ำไปใช้ในการผสมพันธุ์ต่อ พบว่ามันจะถ่ายทอดลักษณะดังกล่าวไปให้แก่ลูกตัวเมียอีก จึงมีผู้สันนิษฐานว่าคงมี crossing-over factors ปรากฏอยู่ใน cytoplasm ของแมลงด้วย

8. **ปัจจัยอื่น ๆ เช่น แร่ธาตุ สารเคมีที่อยู่ในอาหาร และรังสีต่าง ๆ**

การปรากฏอยู่ของ metallic ions บางตัว เช่น แคลเซี่ยม และแมกนีเซี่ยม ในอาหารที่ใช้เลี้ยงแมลงหวี่ จะทำให้มี crossing over เกิดขึ้นน้อยลง

การอดอาหารของตัวหนอนในบางระยะ จะเพิ่มอัตราของ crossing over

การทดลองใช้สารปฏิชีวนะบางอย่าง เช่น mitomycin C และ actinomycin D ฉีดเข้าไปในตัวแมลง จะเพิ่ม crossing over

การฉาย x-ray ให้แก่แมลงหวี่ทั้งตัวผู้และตัวเมีย พบว่านอกจากจะทำให้เพิ่ม crossing over ในแมลงหวี่ตัวเมียแล้ว ยังทำให้เกิดขึ้นได้ในตัวผู้อีกด้วย

Cytological demonstration of crossing over

Chiasma เป็นปรากฏการณ์ทาง cytology ที่มีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนระหว่าง chromatids ที่สามารถจะมองเห็นได้จากกล้องจุลทัศน์

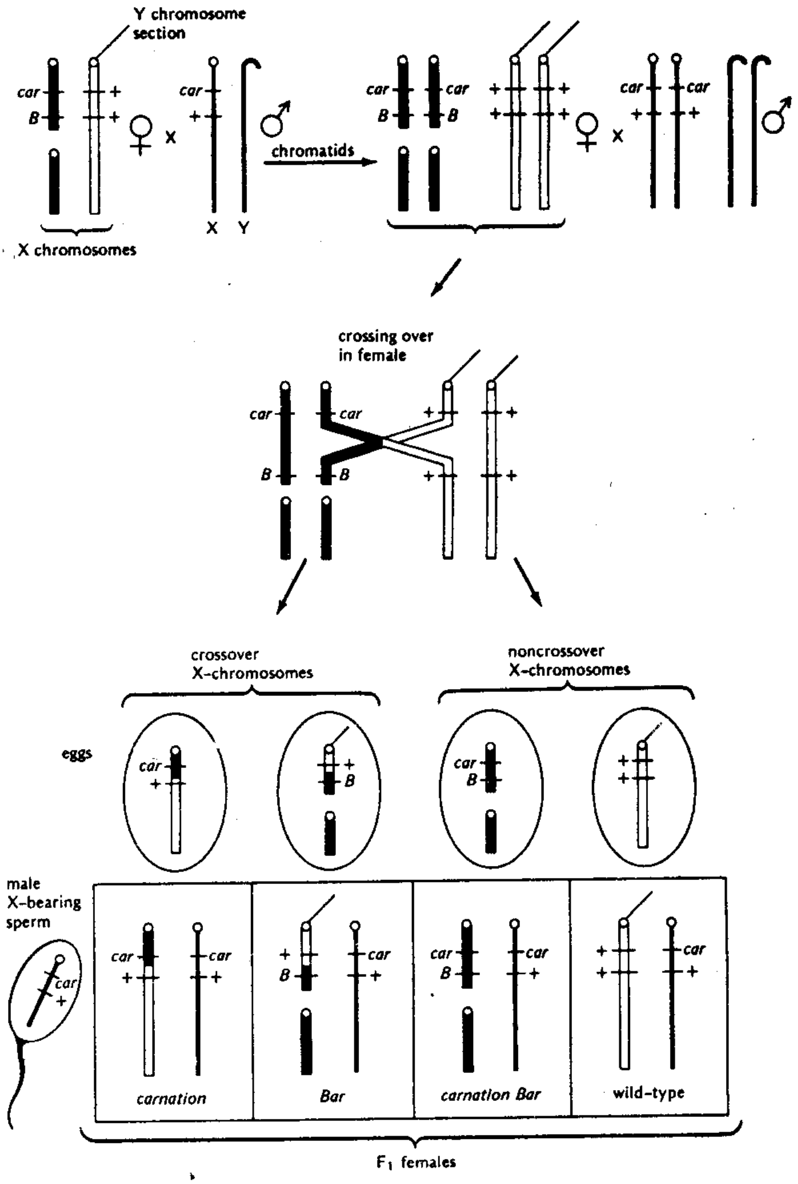
Recombination หรือ crossing over เป็นปรากฏการณ์ทาง genetics ที่มีลักษณะซึ่งเกิดจากการจัดเรียงใหม่ของ linked genes เกิดขึ้น

หลังจากที่ได้มีผู้ให้คำอธิบายว่ายีนส์จะเรียงกันอยู่เป็นลำดับบนโครโมโซม และสามารถจะเกิด crossing over ขึ้นได้จากการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนระหว่าง homologous chromosomes แล้ว จึงทำให้มีผู้หาทางทำการพิสูจน์ให้เห็นว่า เมื่อมี recombination เกิดขึ้น จะต้องมีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมเกิดขึ้นด้วย แต่ถ้าหากจะทำการพิสูจน์

โดยการใช้โครโมโซมที่มีรูปร่างปกติ ก็ไม่สามารถจะติดตามผลได้ เพราะแม้ว่ามันจะมีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนเกิดขึ้นจริง โครโมโซมที่เกี่ยวข้องก็ยังคงมีรูปร่างเหมือน ๆ กันอยู่ จึงจำเป็นจะต้องใช้โครโมโซมที่มีรูปร่างผิดปกติหรือมี marker อยู่ด้วยมาศึกษา

Stern ได้พบแมลงหวี่ stock หนึ่งมี X-chromosome ซึ่งปกติเป็น rod shape กลายเป็น L-shape ขึ้นมา เนื่องจากมีชิ้นส่วนของ Y-chromosome ที่ขาดออกแล้วไปแปะติดกับปลายหนึ่งของ X-chromosome และเขายังพบแมลงหวี่อีก stock หนึ่งที่มี X-chromosome ขาดออกเป็นสองท่อนเกือบเท่า ๆ กัน ท่อนหนึ่งยังคงมี centromere ติดอยู่ ส่วนอีกท่อนหนึ่งซึ่งไม่มี centromere จะไปติดกับโครโมโซมคู่ที่สี่ซึ่งมีขนาดเล็กมาก แมลงหวี่พวกนี้ยังคงมีชีวิตอยู่ได้เพราะว่ายังมียีนส์ที่จำเป็นใน X-chromosome อยู่ครบ แม้มันจะขาดออกเป็นสองท่อนก็ตาม เมื่อนำแมลงหวี่ทั้งสองพวกมาผสมพันธุ์กัน จะทำให้ได้แมลงหวี่ตัวเมียที่มี X-chromosomes รูปร่างผิดปกติทั้งสองอันมาอยู่ด้วยกัน เมื่อนำไปทดลองก็สามารถจะติดตามพิสูจน์โครโมโซมแต่ละอันได้

Stern ได้ใช้ sex-linked genes ที่อยู่บน X-chromosome สองตำแหน่งด้วยกันมาศึกษา คือ ลักษณะสีของตา carnation = car เป็นลักษณะด้อยต่อ wild typr or red = + และลักษณะรูปร่างของตา Bar = B เป็นลักษณะเด่นต่อ wild type = + เขาได้สร้างแมลงหวี่ตัวเมียที่มีโครโมโซมรูปร่างผิดปกติทั้งสองอันให้เป็น heterozygous genotype โดยให้ alleles car และ B อยู่บนโครโมโซมที่ขาดออกเป็นสองท่อน และ alleles + และ + อยู่บนโครโมโซมที่เป็น L-shape จากนั้นนำตัวเมียที่ได้ไปผสมกับตัวผู้ที่มี recessive alleles ของทั้งสองลักษณะอยู่บน X-chromosome รูปร่างปกติ ถ้าหากว่าไม่มี crossing over เกิดขึ้น ตัวเมียจะสร้าง gametes ได้เพียงสองชนิดเท่านั้น คือ car B กับ ++ และในชั่วลูกที่เป็นตัวเมีย ควรจะมีสองพวกเท่านั้น คือ carnation and bar-eyed (car B/car +) กับ wild type (++/car +) แต่เมื่อเขาทำการตรวจดูลักษณะของลูกตัวเมีย พบว่านอกจากจะมี noncrossovers สองชนิดดังกล่าวแล้ว ยังพบว่ามี crossovers เกิดขึ้นอีกสองพวกด้วย คือ carnation (car +/car +) และ bar-eyed (+ B/car +) ดังแสดงไว้ในรูปที่ 14-11 เมื่อนำโครโมโซมของลูกตัวเมียทั้งหมดไปตรวจดูได้ผลออกมาว่า แต่ละตัวนั้นจะมี X-chromosome อยู่อันหนึ่งมีรูปร่างปกติ เพราะได้รับมาจากฝ่ายพ่อ ส่วนอีกอันหนึ่งนั้นในลูกที่เป็น noncrossovers จะไปเหมือนกับอันใดอันหนึ่งของแม่ แต่ในลูกที่เป็น crossovers นั้น พวกหนึ่งจะมีส่วนของ Y-chromosome ที่เคยติดอยู่กับ X-chromosome ที่เป็นปกติก็



<u>รูปที่ 14-11</u> การทดลองของ Stern ที่พิสูจน์ให้เห็นถึงความสัมพันธ์โดยตรงระหว่าง genetic and cytological crossing over ของยีนส์สองตำแหน่งบน **X-chromosome** โดยอาศัยแมลงหวี่ตัวเมียซึ่งมี X-chromosomes ทั้งสองอัน รูปร่างแตกต่างไปจากปกติ และไม่เหมือนกันด้วย

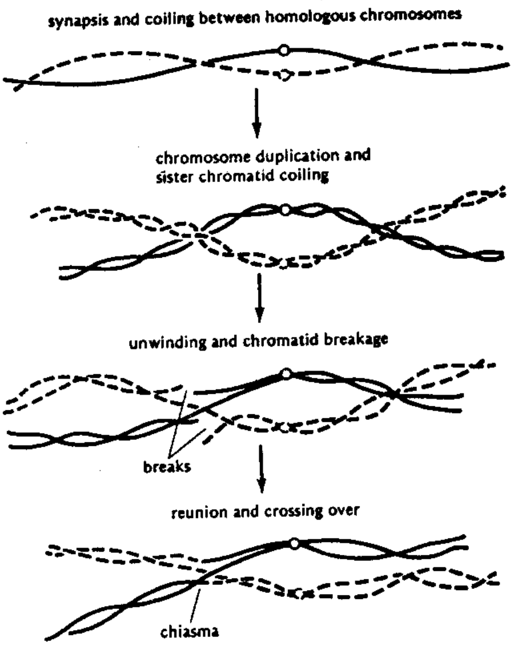
เปลี่ยนไปแปะติดกับโครโมโซมที่ขาดออกเป็นสองท่อนแทน และอีกพวกหนึ่งจะมี X-chromosome อีกอันหนึ่งมีรูปร่างปกติ ซึ่งเกิดจากการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนกันกับโครโมโซมที่ขาดเป็นสองท่อนในตัวแม่ ดังนั้นผลจากการทดลองจึงพิสูจน์ได้ว่า genetic recombination ที่เกิดขึ้นนั้นสอดคล้องกับผลการตรวจทาง cytology แสดงว่ามีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมเกิดขึ้นจริง

<u>Theories of chromosomal crossing over</u>

ในปัจจุบันแม้ว่าจะเป็นที่ทราบกันดีถึงความสำคัญของ crossing over หรือ recombination แต่ก็ยังไม่เป็นที่ทราบกันแน่ชัดว่า crossing over เกิดขึ้นมาได้โดยวิธีใด จึงทำให้มีการแลกเปลี่ยนส่วนของโครโมโซมเกิดขึ้นได้ตรงจุดเดียวกันของโครโมโซมอย่างถูกต้องแน่นอน โดยไม่ทำให้บางส่วนของโครโมโซมขาดหายไป (deletion) หรือเกินเลยมา (addition) ในโครโมโซมที่เกี่ยวข้อง

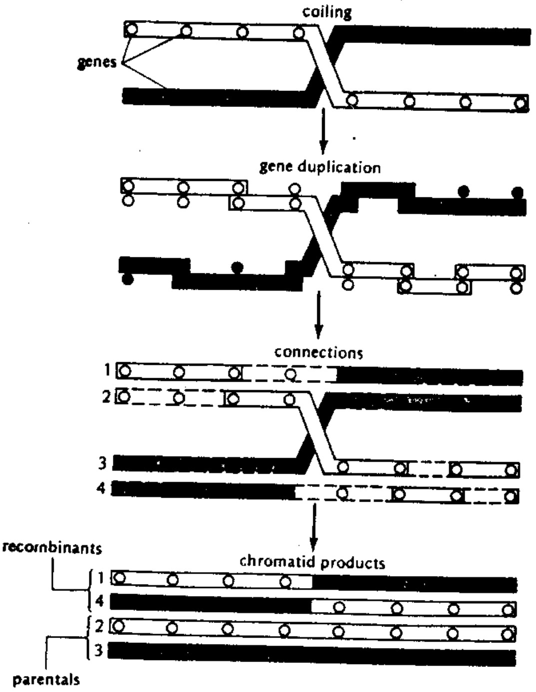
ได้มีผู้เสนอทฤษฎีขึ้นมาอธิบายการเกิด crossing over หลายทฤษฎีด้วยกัน ซึ่งต่างก็ยังมีข้อบกพร่องที่สามารถจะโต้แย้งได้อยู่ และจำเป็นจะต้องค้นคว้าหาหลักฐานมาสนับสนุนเพิ่มเติมต่อไป แต่อย่างไรก็ตามสามารถจะแบ่งทฤษฎีเหล่านั้นอย่างกว้าง ๆ ได้เป็นสองพวกด้วยกัน คือ breakage and reunion theories และ copy choice theories

ทฤษฎีฝ่ายแรกอธิบายว่าการแลกเปลี่ยนส่วนของโครโมโซมจะเกิดขึ้นในระยะ pachytene ของ first meiotic division และเป็น four-strand stage ที่ทั้งสองโครโมโซม (4 chromatids) ยังพันกันอยู่ เมื่อทั้งโครโมโซมและ chromatids คลายเกลียวแยกออกจากกัน จะทำให้เกิดแรงดึงและบิด ซึ่งถ้าหากมีมากพอ จะทำให้ chromatids ขาดออกจากกัน และถ้าหากมีการขาดออกเกิดขึ้นกับ chromatids สองอันที่จุดเดียวกัน ก็จะเปิดโอกาสให้ส่วนที่ขาดออกนั้นเชื่อมสลับที่กันได้ เมื่อการแลกเปลี่ยนส่วนดังกล่าวเกิดขึ้นกับ sister chromatids จะไม่มี genetic recombination แต่ถ้าเป็นการแลกเปลี่ยนระหว่าง nonsister chromatids จะได้ recombinant chromatids ขึ้นมา (รูปที่ 14-12) ดังนั้น จากทฤษฎีนี้จึงจำเป็นที่ homologous chromosomes จะต้องมาเข้าคู่กันอย่างใกล้ชิดเสียก่อน จึงจะเกิด crossing over ได้ เมื่อไหร่ที่การเข้าคู่ของมันทำได้ลำบาก เช่น ในกรณีที่มีการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของโครโมโซมเกิดขึ้น crossing over จะถูกจำกัดไว้



<u>รูปที่ 14-12</u> การเกิด crossing over ที่เป็นผลจากการขาดออกของ chromatids ในขณะที่โครโมโซมและ chromatids เริ่มคลายเกลียวและแยกออกจากกัน

ทฤษฎีฝ่ายหลังอธิบายว่า crossing over เกิดขึ้นเพราะมีการเชื่อมยีนส์ที่เพิ่งสร้างเสร็จใหม่ ๆ จาก homologous chromosomes เข้าด้วยกัน ตามทฤษฎีนี้ chromosome duplication จะเกิดขึ้นสองตอนด้วยกัน คือ (1) the replication of genes (2) the formation of new connections between these genes (รูปที่ 14-13) โดยในขั้นแรก gene duplication ที่เกิดขึ้นในระยะ pachytene จะทำให้เกิด daughter genes ของยีนส์ต่าง ๆ ที่อยู่บนโครโมโซมทั้งคู่ขึ้นมา แต่ daughter genes เหล่านี้จะยังไม่เชื่อมเข้าด้วยกันกับยีนส์ที่อยู่ข้าง ๆ เป็น strands ใหม่ทันที ต่อมาจึงจะมีการเชื่อม daughter genes เข้าด้วยกัน ถ้าหากว่า homologous chromosomes ทั้งสองพันกันอยู่ในขณะที่กำลังจะมีการเชื่อมยีนส์ใหม่เข้าด้วยกัน อาจทำให้มีการเชื่อมยีนส์ของทั้งสองฝ่ายเกิดขึ้นใน strand เดียวกันเป็น recombination ขึ้นมา



<u>รูปที่ 14-13</u> การเกิด crossing over ที่เป็นผลจากการเชื่อมยึนส์ที่เพิ่งสร้างขึ้นมาใหม่โดยโครโมโซมทั้งสอง ซึ่งพาดกันอยู่เข้าด้วยกัน