

Dziedziczenie cech sprzężonych i mapy genetyczne

Piotr Łapa¹

¹Towarzystwo Naukowe Branży Zoologicznej „Animalian”

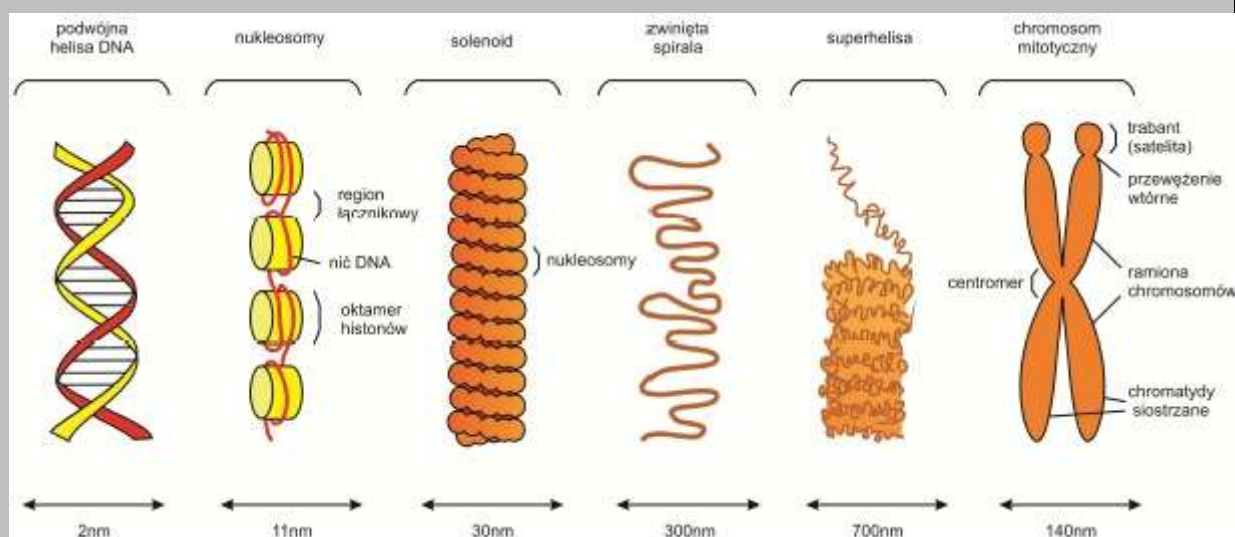
Uniwersalne mechanizmy dziedziczenia, które po raz pierwszy zostały opisane przez Grzegorza Mendla, poddawane były wielokrotnej weryfikacji i choć w większości badań potwierdzano wyniki twórcy tych praw, to jednak pojawiały się również rezultaty zgoła odmienne, czyli nie pasujące do teorii Mendla. Gdy Walter Sutton i niezależnie od niego Theodor Boveri, powiązali nowo odkryte struktury nazywane chromosomami z czynnikami dziedziczenia zwanymi obecnie genami, zapoczątkowana została chromosomowa teoria dziedziczenia. Początkowo teoria Mendla oraz chromosomowa teoria dziedziczenia, nie były spójne, gdyż skoro wszystkie geny miałyby być ułożone wzdłuż chromosomów, a te w kolejnych pokoleniach są dziedziczone w nieziennej formie, to wiele genów a tym samym cech fenotypowych, powinno być dziedziczone razem. Jednak fakt, iż większość doświadczeń potwierdzała wyniki Mendla, zaprzeczał teorii chromosomowej. Poprawne wyjaśnienie tych wyjątków podał Thomas Morgan, które jak się okazało nie przeczą prawom dziedziczenia lecz są z nimi ściśle związane. Początkowo był on sceptycznie nastawiony do chromosomowej teorii dziedziczenia i rozpoczynając swe badania planował ją obalić. Jednak siła nauki tkwi w obiektywnym sposobie badania i opisywania obserwowanych zjawisk. Testując prawdziwość chromosomowej teorii dziedziczenia, nie tylko jej nie obalił, ale znalazł dowody na jej prawdziwość. Potwierdził on w swych badaniach, że geny mają swoje loci w fizycznych strukturach nazwanych chromosomami, czyli grupa genów zlokalizowana na tym samym chromosomie, tworzy grupę genów sprzężonych tzn. wspólnie dziedziczonych. Wcześniejsze doświadczenia prowadzone przez Mendla, nie zostały zakłócone przez sprzężenia dlatego, że rozpatrywane przez niego cechy, były warunkowane genami zlokalizowanymi na różnych chromosomach.

Chromosomy podlegają podczas mejozy losowej segregacji, razem z genami na nich zlokalizowanymi czyli dziedziczą się zgodnie z prawami Mendla. Dzięki temu niezależna segregacja chromosomów, objawiała się w klasycznych doświadczeniach Mendla niezależnym dziedziczeniem genów. Grupy sprzężeń tworzą geny zlokalizowane na jednym

chromosomie, dlatego liczba grup sprzężeniowych odpowiada liczbie chromosomów charakterystycznej dla każdego gatunku. W przypadku gębacza trójbarwnego (*Astatotilapia burtoni* (Günther, 1894)) będzie to 20 grup sprzężeniowych czyli 20 par chromosomów, mniej czyli 15 par stwierdzono u proporczykowców z Kap Lopez (*Aphyosemion australe* (Rachow, 1921)), bocja wspaniała (*Chromobotia macracanthus* (Bleeker, 1852)) ma ich aż 49, a złote rybki (*Carassius auratus* (Linnaeus, 1758)) posiadają 50 par chromosomów. Więcej przykładów ilości grup sprzężeniowych zebrano w tabeli 1.

Tabela 1. Liczba par chromosomów (1N) u wybranych gatunków ryb akwariowych

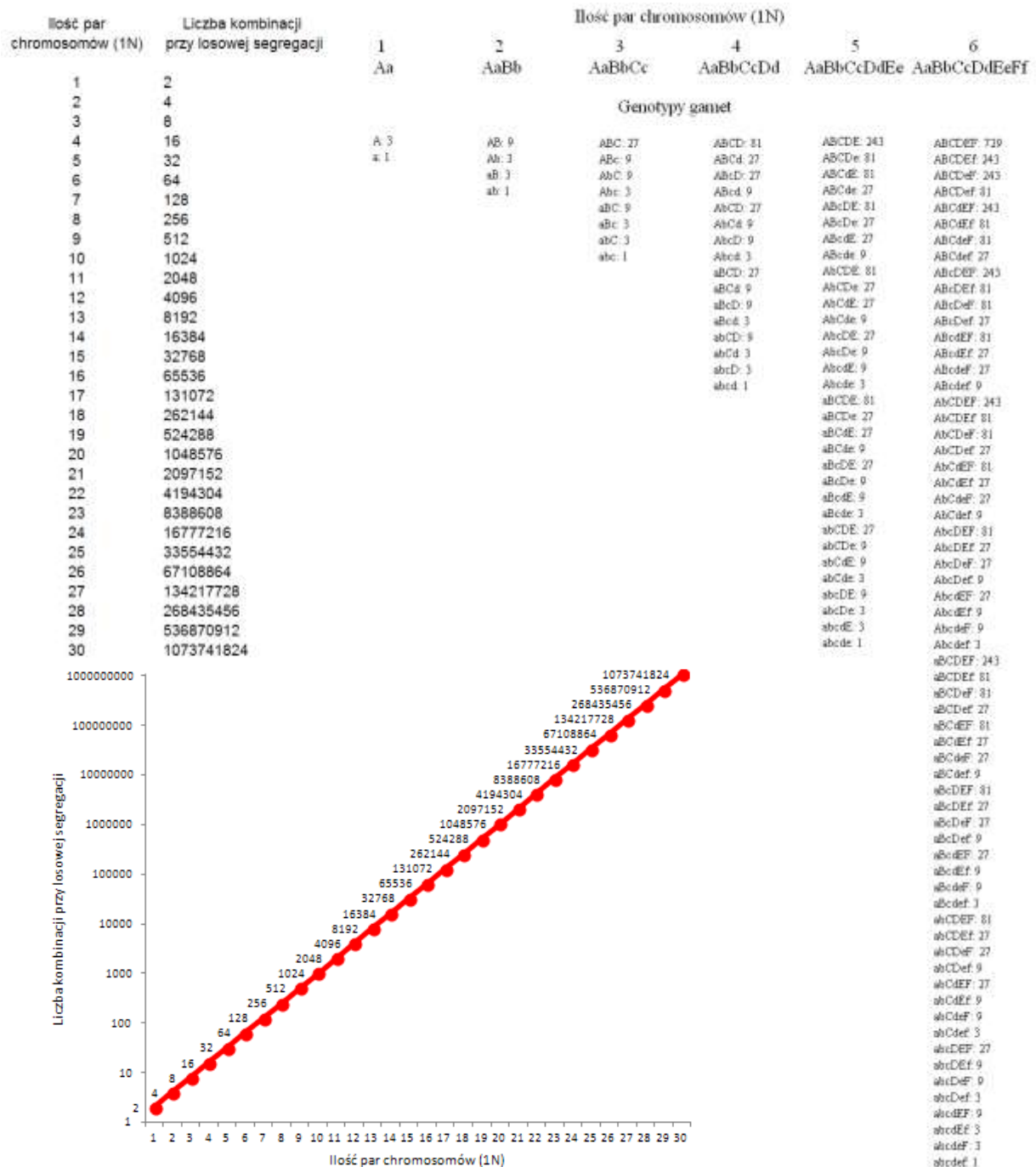
Nazwa polska	Nazwa systematyczna	1N
Akara czerwona	<i>Hemichromis bimaculatus</i> Gill, 1862	22
Barwniak czerwono brzuchy	<i>Pelvicachromis pulcher</i> (Boulenger, 1901)	24
Bocja wspaniała	<i>Chromobotia macracanthus</i> (Bleeker, 1852)	49
Bojownik syjamski	<i>Betta splendens</i> Regan, 1910	21
Brzanka różowa	<i>Pethia conchonius</i> (Hamilton, 1822)	25
Brzanka sumatrzańska	<i>Puntigrus tetrazona</i> (Bleeker, 1855)	25
Danio pręgowany	<i>Danio rerio</i> (Hamilton, 1822)	25
Drobniczka jednodniówka	<i>Heterandria formosa</i> Girard, 1859	24
Gębacz trójbarwny	<i>Astatotilapia burtoni</i> (Günther, 1894)	20
Głonojad syjamski	<i>Gyrinocheilus aymonieri</i> (Tirant, 1883)	24
Gupik	<i>Poecilia reticulata</i> Peters, 1859	23
Gurami mozaikowy	<i>Trichopodus leerii</i> (Bleeker, 1852)	23
Hokejówka amazońska	<i>Thayeria boehlkei</i> Weitzman, 1957	25
Karaś złocisty	<i>Carassius auratus</i> (Linnaeus, 1758)	50
Kirysek pstry	<i>Corydoras paleatus</i> (Jenyns, 1842)	22
Kolcobruch zielony	<i>Tetraodon fluviatilis</i> Hamilton, 1822	21
Mieczyk	<i>Xiphophorus helleri</i> Heckel, 1848	24
Molinezja ostropyska	<i>Poecilia sphenops</i> Valenciennes, 1846	23
Neon Innesa	<i>Paracheirodon innesi</i> (Myers, 1936)	18
Pielegnica zebra	<i>Amatitlania nigrofasciata</i> (Günther, 1867)	24
Pielegnica Pawiooka	<i>Astronotus ocellatus</i> (Agassiz, 1831)	24
Pielegniczka żółta	<i>Apistogramma borellii</i> (Regan, 1906)	23
Proporczykowiec z Kap Lopez	<i>Aphyosemion australe</i> (Rachow, 1921)	15
Rozbora klinowa	<i>Trigonostigma heteromorpha</i> (Duncker, 1904)	24
Skalar	<i>Pterophyllum scalare</i> (Schultze, 1823)	24
Szczelinowiec Leleupa	<i>Neolamprologus leleupi</i> (Poll, 1956)	24
Szczupieńczyk karłowaty	<i>Epiplatys annulatus</i> (Boulenger, 1915)	25



Rycina 1. Kolejne stopnie upakowania materiału genetycznego
(Anna Kurcek <http://www.e-biotechnologia.pl/Artykuly/chromosomy>)

Jądro komórkowe zawiera wiele cienkich i długich struktur, które fizycznie stanowią zapis informacji genetycznej w postaci sekwencji nukleotydowych cząsteczek DNA. Pojedyncza cząsteczka DNA zawiera geny, będące jedną grupą sprzężeniową. Długość nici DNA z jednego chromosomu jest zróżnicowana, np. 14 chromosom u *Danio pręgowanego* zawiera 54Mpz (54 miliony par zasad - 54 000 000 pz). Grubość liniowej cząsteczki DNA wynosi 20Å (Angstrom – jednostka długości równa 10^{-10} m), a odległość między płaszczyznami sąsiadujących nukleotydów w tym łańcuchu to 3,4Å. Oznacza to, że DNA z 14 chromosomu *Danio pręgowanego* ma długość 183600000Å (18,36 mm) i gdyby powiększyć łańcuch DNA do grubości nici (0,2mm) to jej długość wynosiłaby 1,84 kilometra. Zakładając wielkość jądra komórkowego na 10µm, powiększone proporcjonalnie do nici miałyby średnice 1 metra i w takiej objętości musi się zmieścić około 90 kilometrów nici (średnio 1,84 km × 25 par chromosomów). Upakowanie 90 kilometrów nici w worku średnicy 1 metra skończy się jej poplątaniem i podobnie nieuporządkowane upakowanie długich cząsteczek DNA w małej objętości jądra komórkowego, stwarzałyby ryzyko ich zapętlenia, dlatego też molekuly DNA zorganizowane są poprzez nawinięcie ich na białka stanowiące swego rodzaju szpulki. Właśnie to białkowe rusztowanie, wraz z cząsteczkami DNA tworzy struktury obserwowane jako chromosomy. Białka histonowe na które nawinięte są cząsteczki DNA, mają jeszcze jedną rolę. Struktura cząsteczki DNA to superhelisa, co wiąże się ze specyficznymi napięciami torsyjnymi, a obecność białkowego rdzenia nukleosomu stabilizuje strukturę superhelisy.

Zjawisko niezależnej segregacji chromosomów powoduje znaczne przetasowanie materiału genetycznego podczas mejozy, a tym samym dużą różnorodność produkowanych komórek rozrodczych. Za przykład posłużyć może skalar i jego 24 grupy sprzężeniowe, które w sposób losowy mogą utworzyć $2^{24} = 16\,777\,216$ kombinacji w gametach jednego osobnika. Przyrost możliwych zestawów grup sprzężeniowych w gametach, wraz ze wzrostem ilości tych grup ma charakter wykładniczy, czyli rośnie „lawinowo” (rycina 2).

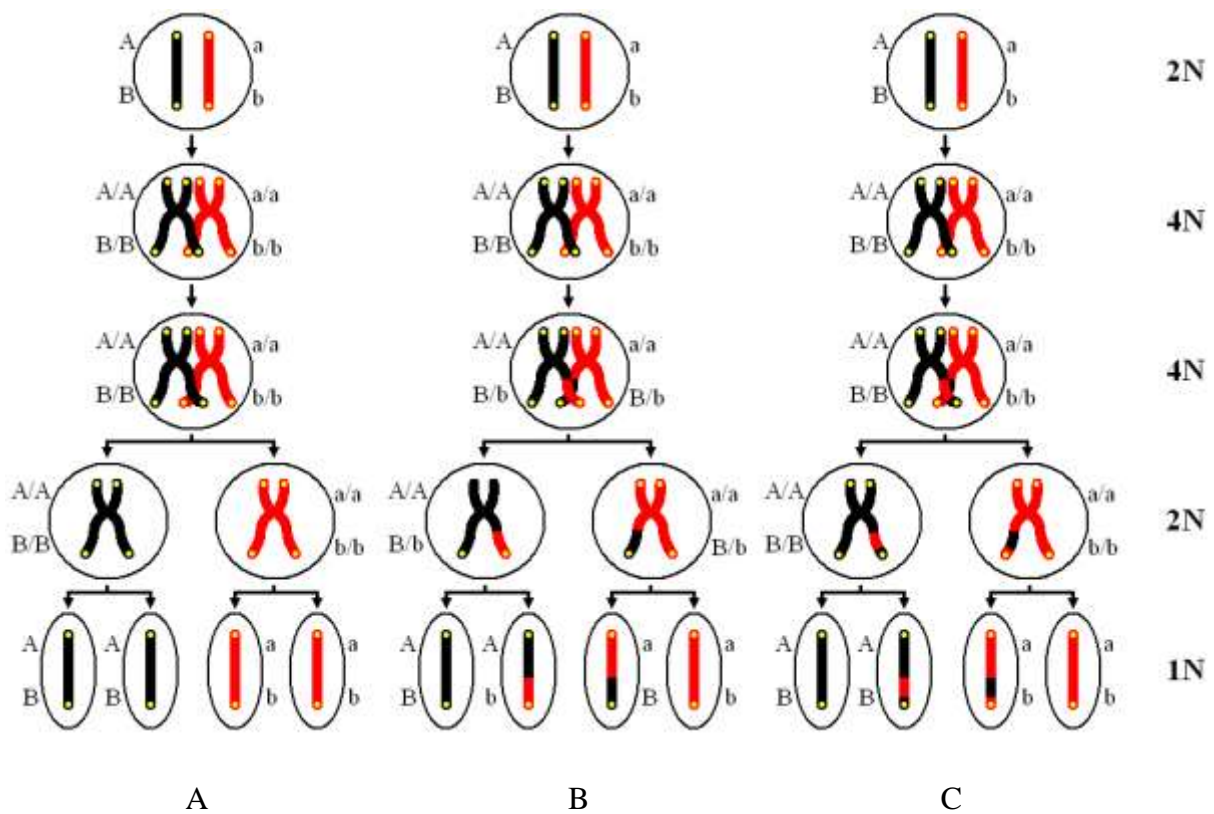


Rycina 2. Wykładniczy wzrost kombinacji chromosomowych wraz ze wzrostem ilości par chromosomów homologicznych (na osi Y skala jest logarytmiczna).

Jednak to nie koniec potencjalnej zmienności genetycznej, gdyż chromosomy homologiczne dość często wymieniają się odpowiadającymi sobie odcinkami, a zjawisko to nazywane jest crossing-over. Oznacza to, że chromosomy nie są dziedziczone w nieziennej formie w kolejnych pokoleniach, lecz podlegają zmianom. Wymiana odcinków między chromosomami stanowiącymi jedną parę, możliwa jest podczas mejozy gdy homologi znajdują się w bliskim kontakcie i często są połączone ze sobą w wielu miejscach. Ma to miejsce już w początkowym etapie przebiegu mejozy, gdy chromosomy homologiczne zbliżają się do siebie i jednocześnie każdy z nich podwaja się (replikuje), co razem daje strukturę składającą się z czterech chromatyd, zwaną tetradą lub biwalentem. Jest to ten moment, gdy w komórce chromosomy przyjmują kształt litery „X”, a każdy gen reprezentowany jest przez 4 allele ($4N$). Chromatydy tworzące tetradę w pewnych przypadkowych miejscach okręcając się wokół siebie ściśle przylegając i jest to zjawisko nazywane koniugacją chromosomów. W tym momencie często dochodzi do rozerwania dwóch lub więcej chromatyd, które po chwili znów dołączane są w struktury tetrady. Może się jednak zdarzyć, że oderwane dwa homologiczne odcinki zostaną wbudowane nie w swoje poprzednie miejsce, lecz zamienią się miejscami. Czyli, po rozerwaniu chromatyd do chromosomu ojcowskiego zostanie podłączony fragment matczynej, a do matczynego fragment chromosomu ojcowskiego. Należy pamiętać, że dwie spośród czterech chromatyd są pochodzenia ojcowskiego, a dwie matczynego. Jeśli więc do wymiany dojdzie między chromatydami ojcowskimi lub pomiędzy matczynymi, to nic się nie zmieni w strukturze chromatyd, gdyż są one identyczne. Jedynie wymiana pomiędzy fragmentami ojcowskimi a matczynymi prowadzi do zmian w strukturze chromatyd. W pierwszym podziale mejotycznym chromosomy homologiczne są od siebie rozdzielane ($2N$), a w drugim podziale chromatydy siostrzane tego samego chromosomu są rozdzielane jako jednochromatydowe chromosomy ($1N$) w gametach (rycina 3). Odkrycie zjawiska crossing-over scaliło chromosomową teorię dziedziczenia oraz prawa Mendla.

Dzięki zjawisku crossing-over nawet geny zlokalizowane na jednym chromosomie mogą być rozdzielone do różnych komórek rozrodczych. Prawdopodobieństwo rozdzielania jest tym większe im dalej od siebie na chromosomie znajdują się loci tych genów. Dzieje się tak dlatego, że większa odległość między loci powoduje, że bardziej prawdopodobne jest iż gdzieś na tym długim odcinku dojdzie to pęknięcia chromatyny. Wymiana fragmentów chromosomów homologicznych jest dość częstym zjawiskiem i znacznie oddalone od siebie geny z dużym prawdopodobieństwem zostaną rozdzielone i dziedziczone będą tak, jakby były niesprężone. Między parami genów sprzężonych, zjawisko crossing-over zachodzi

z określoną i stałą częstością. Co więcej jeśli odległość między genami jest duża, to może nawet dojść do podwójnego crossing-over, czyli do pęknięcia chromatyd dojdzie w dwóch miejscach, czego efektem będzie wymiana fragmentu chromosomu na odcinku dzielącym oba geny. W ten sposób rozpatrywane loci nadal będą sprzężone ze sobą, mimo tego że duży fragment chromosomu między nimi, zostanie wymieniony (rycina 3C). Może też dojść do kilku wymian jednej pary chromosomów homologicznych, ale prawdopodobieństwo trzech lub więcej crossing-over jest już relatywnie niższe.

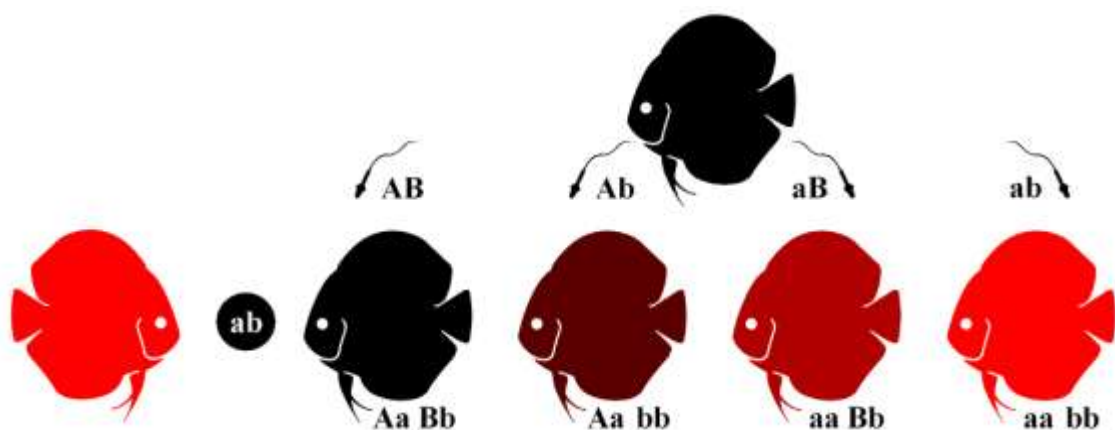


Rycina 3. Przebieg procesu mejozy. A – gametogeneza bez crossing-over, powstają gamety o 2 genotypach **AB** lub **ab**, B – gametogeneza z pojedynczym crossing-over, powstają gamety o 4 genotypach **AB**, **Ab**, **aB** i **ab**, C – spermatogeneza z podwójnym crossing-over, powstają gamety o 2 genotypach **AB** lub **ab**

Problem przed jakim stanął Thomas Morgan, to wymyślenie sposobu rozróżnienia osobników, których fenotyp jest kombinacją cech powstałych w wyniku zjawiska crossing-over, od osobników będących kombinacją cech powstałą w wyniku zjawiska losowej segregacji chromosomów podczas mejozy. Rozwiązaniem było zastosowanie kojarzeń zwanych krzyżówkami testowymi. W pracach swych łączył w pary osobniki heterozygotyczne pokolenia F₁ (**AaBb**) z homozygotami recesywnymi (**aabb**) i uzyskiwał

w ten sposób pokolenie F_2 (BC ang. back-cross). Zjawisko crossing-over nie powoduje powstania całkowicie nowych genotypów w pokoleniu potomnym, a więc nie pojawią się w nim osobniki spektakularnie wyróżniające się nowym fenotypem. Fenotypy pokolenia potomnego będą identyczne jak w przypadku dziedziczenia niezależnych genów, czyli na podstawie fenotypu danego osobnika nie określi się bezpośrednio czy jest on efektem zjawiska crossing-over czy też nie. Natomiast zjawisko to wpłynie na zmianę frekwencji fenotypów w pokoleniu potomnym rozpatrywanym łącznie. Oznacza to, że osobniki powstałe z gamet po crossing-over, od innych osobników rozpoznać można po częstości ich występowania w potomstwie, a więc i tutaj do wnioskowania w genetyce zastosowane zostaną obliczenia matematyczne.

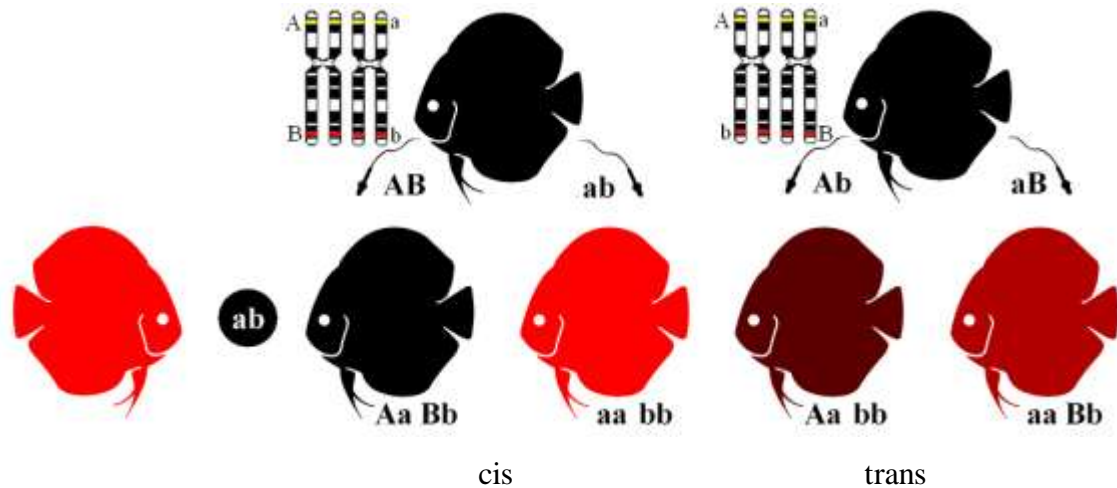
Punktem wyjścia dla naszych rozważań, będzie hipotetyczny gatunek ryb o czterech wyraźnie rozróżnialnych fenotypach, warunkowanych przez geny dwóch loci. Osobniki czarne to takie, które posiadają dominujące allele w obu rozpatrywanych loci, czyli ich genotyp to $A_B_$. Bordowa barwa warunkowana jest przez dominujący allele A , przy braku dominującego genu w drugim locus. Ciemnoczerwone osobniki to takie, w których genotypie obecny jest dominujący allele B przy braku dominującego genu w drugim locus. Natomiast podwójne heterozygoty $aabb$ to osobniki jasnoczerwone. Podobnie jak w doświadczeniach Morgana, podwójnie heterozygotyczny osobnik o czarnym ubarwieniu kojarzony będzie z podwójną homozygotą o barwie jasnoczerwonej.



Rycina 4. Kojarzenie testowe podwójnej heterozygoty $AaBb$ z podwójną homozygotą $aabb$. Jeżeli loci te nie stanowią grupę sprzężeniową to potomstwo takiej pary będzie miało wszelkie możliwe genotypy dla tych dwóch loci, a zgodnie z prawami Mendla stosunek genotypów pokolenia potomnego to 1 : 1 : 1 : 1.

Jeżeli oba loci tj. „A” i „B” zlokalizowane są na różnych chromosomach, czyli nie są sprzężone, to proporcja czterech genotypów a jednocześnie fenotypów w pokoleniu

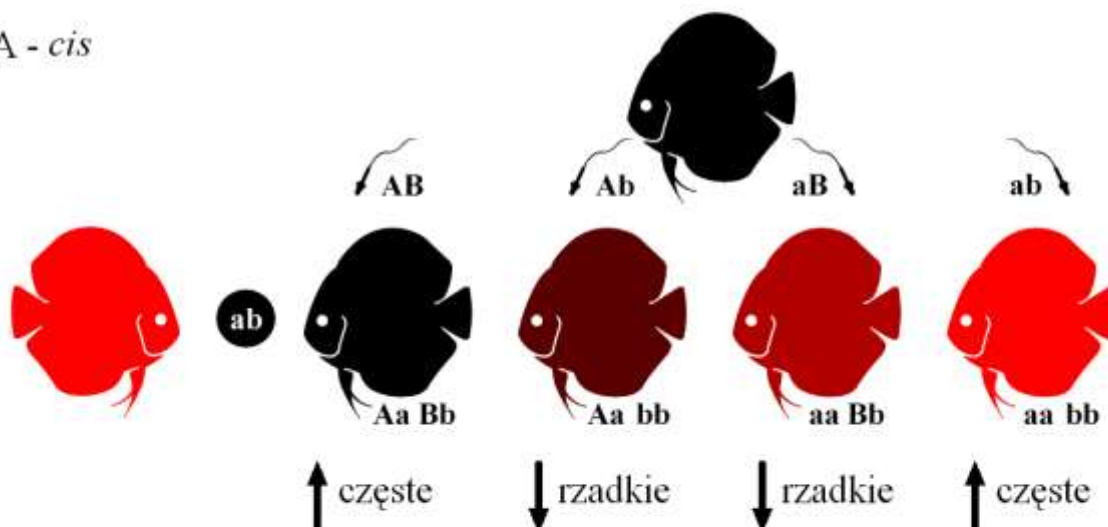
potomnym to 1:1:1:1, czyli po 25% (rycina 4). W tym przypadku fenotyp ojcowski podobnie jak matczyny reprezentowany jest przez 25% potomstwa. Pojawiają się jednak fenotypy pośrednie, czyli bordowe i ciemnoczerwone, również z częstością po 25% osobników.



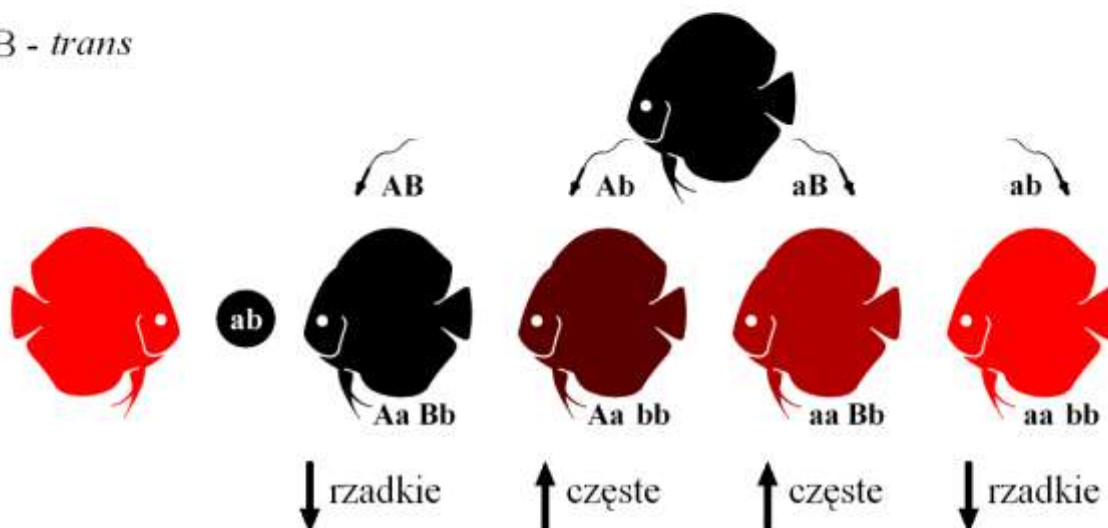
Rycina 5. Kojarzenie testowe podwójnej heterozygoty $AaBb$ z podwójną homozygotą $aabb$. Jeżeli loci są całkowicie ze sobą sprzężone czyli nie dojdzie do crossing-over to potomstwo takiej pary będzie miało tylko dwa spośród czterech teoretycznych, genotypy dla tych dwóch loci a stosunek genotypów pokolenia potomnego to 1 : 1. To które dwa genotypy się pojawią będzie zależało od tego jaki układ mają na chromosomach allele dominujące i recesywne.

Jeżeli oba loci są całkowicie ze sobą sprzężone, czyli znajdują się na tym samym chromosomie i brak jest zjawiska crossing-over, to genotypy a zarazem fenotypy, będą tylko dwa w stosunku 1:1 czyli po 50% (rycina 5.) Brak crossing-over może być spowodowane tym, że oba geny leżą na chromosomie bardzo blisko siebie. To które dwa fenotypy pojawią się wśród potomstwa, zależeć będzie od tego, jaki układ na chromosomach homologicznych przyjmują rozpatrywane allele, tzn. związane jest z tym, jak fizycznie rozmieszczone są allele dominujące i recesywne. W przypadku podwójnych homozygot możliwości są dwie. Zgodnie z pierwszą, na jednym chromosomie homologicznym, znajdują się oba geny w wariacie dominującym, a na drugim oba geny to recesywne allele. Układ taki nazywa się – *cis* i zapisywany jest jako AB/AB i ab/ab . Druga możliwość jest taka, że pierwszy chromosom homologiczny, zawiera allel dominujący jednego lokus oraz recesywny allel w lokus drugim, natomiast drugi z pary chromosom homologiczny ma odwrotny układ alleli, recesywnego i dominującego w obu loci. Sytuacje taką nazywa się – *trans* i zapisuje się jako Ab/Ab i aB/aB . Zapis sugerujący obecność czterech alleli w loci wynika z faktu, że crossing-over zachodzi na etapie czterech chromatyd ($4N$).

A - *cis*



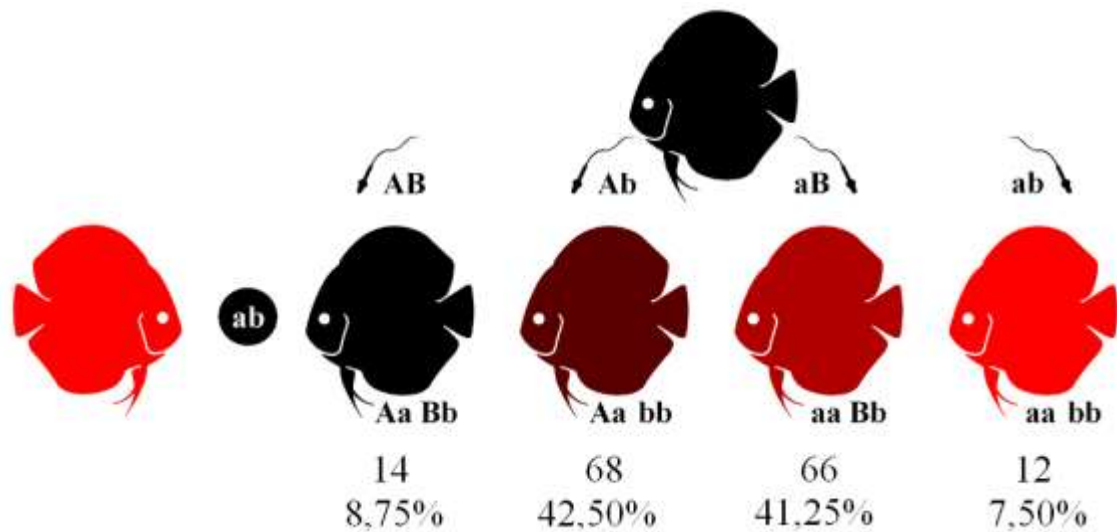
B - *trans*



Rycina 6. Kojarzenie testowe podwójnej heterozygoty $AaBb$ z podwójną homozygotą $aabb$. Częstość poszczególnych gamet a w związku z tym poszczególnych genotypów w pokoleniu potomnym zależy będzie od tego czy układ genów u podwójnej homozygoty rodzicielskiej był *cis* czy *trans*.

Jakie są konsekwencje układu *cis* i *trans*? Sprzężenie *cis* oznacza, że podwójna heterozygota $AaBb$ będzie częściej produkowała gamety AB i ab , a rzadsze będą gamety rekombinowane Ab i aB . Sprzężenie *trans* powoduje, że częstsze będą gamety Ab i aB , a rzadsze będą gamety AB i ab . To czy dana heterozygota jest w układzie *cis* czy *trans* można wywnioskować na podstawie potomstwa, gdyż w wyniku kojarzenia osobnika o genotypie $AaBb$ w układzie *cis* z podwójną homozygotą $aabb$, powstaje potomstwo w większości o genotypach $AaBb$ i $aaBb$, a rzadsze są genotypy $Aabb$ i $aabb$ (rycyna 6A). Jeśli heterozygota $AaBb$ jest w układzie *trans*, to po kojarzeniu z podwójną homozygotą $aabb$

powstaje potomstwo w większości o genotypach *Aabb* i *aaBb*, a rzadsze są genotypy *AaBb* i *aabb* (rycina 6B).



Rycina 7. Kojarzenie testowe podwójnej heterozygoty *AaBb* z podwójną homozygotą *aabb*. Jeżeli loci te stanowią grupę względnie sprzężoną to potomstwo takiej pary będzie miało wszelkie możliwe genotypy dla tych dwóch loci, natomiast ich frekwencje odbiegają od proporcji 1:1:1:1.

Jeżeli oba loci znajdują się na tym samym chromosomie, czyli stanowią grupę sprzężeniową ale zachodzi między nimi crossing-over, to sprzężenie to jest względne, czyli pojawią się wszystkie cztery możliwe genotypy, choć proporcje odbiegają od stosunku 1:1:1:1. Na rycinie 7 przedstawiono wyniki takiego przykładowego kojarzenia testowego. Gdyby loci nie były sprzężone, to procentowa reprezentacja każdego genotypy wynosiłaby po 25% , jednak obserwowane częstości odbiegają znacznie od tego oczekiwanego rozkładu. W powyższym przykładzie rozbieżność obserwowanych częstości i częstości oczekiwanych dla braku sprzężenia , jest wysoce istotne. Statystyka testowa testu χ^2 wynosi 73 co oznacza, że zaobserwowane licznosci odbiegają znacznie od rozkładu jednorodnego, czyli geny są względnie sprzężone (tabela 2).

Jak dokonać obliczeń pozwalających stwierdzić czy rozkład już odbiega od założeń teoretycznych, czy jest jeszcze na tyle do niego podobny, że obserwowane pewne odstępstwa można traktować jako błędy losowe? Od obserwowanej liczebności danego genotypu, odejmujemy liczebność oczekiwaną. Uzyskany wynik jest dodatni lub ujemny, ale po podniesieniu do kwadratu jest już zawsze dodatni. Dzielimy go przez liczebność oczekiwaną i mamy już częściowy wynik naszego testu. Identyczne obliczenia wykonujemy dla każdego z genotypów i na końcu sumujemy wszystkie 4 wyniki. Otrzymana suma czyli 73, jest statystyką testową testu χ^2 . W ten sposób bez żadnych wzorów udało nam się

dokonać obliczeń statystycznych. Wynik 73 jest wyższy od granicznej wartości 7,81, czyli obserwowane liczebności odbiegają znacznie od rozkładu jednorodnego. Uzasadniony jest więc wniosek o sprzężeniu rozpatrywanych genów.

Tabela 2. Obserwowane i oczekiwane częstości genotypów oraz test zgodności χ^2

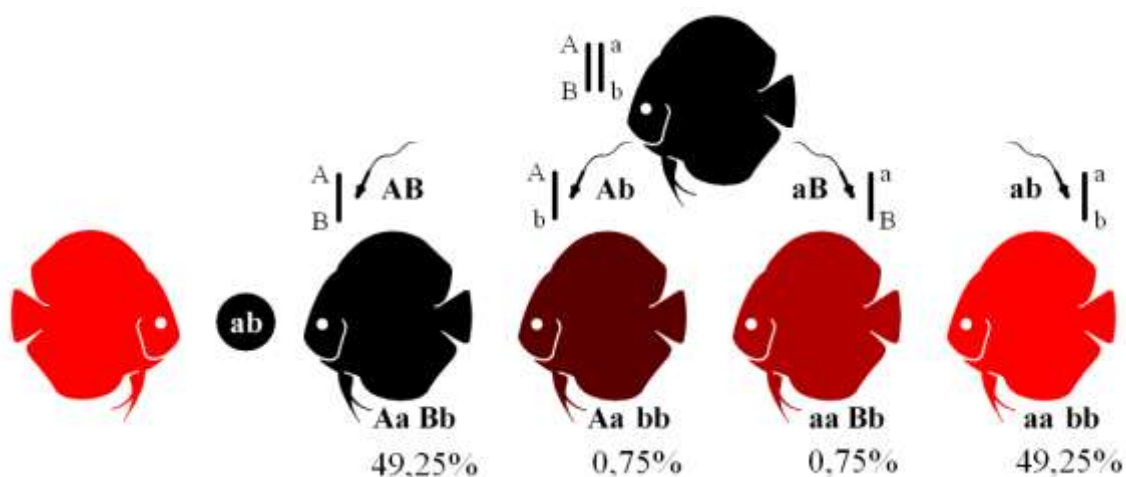
Genotyp	Obserwowane (O)		Oczekiwane (T)		$((O-T)^2)/T$	Tablicowe χ^2
	Liczebność	Procent	Liczebność	Procent		
AaBb	14	8,75	40	25	16,9	$\alpha=0,05$ df=3 $\chi^2=7,81$
Aabb	68	42,5	40	25	19,6	
aaBb	66	41,25	40	25	16,9	
aabb	12	7,5	40	25	19,6	
Suma	160	100	160	100	$\chi^2=73$	

Przez wartość wyliczonego χ^2 rozumieć można liczbę, która określa jak bardzo wartości obserwowane różnią się od oczekiwanych. Wynik ten należy porównać z liczbą zawartą w odpowiednich tablicach statystycznych. Tablicowe χ^2 pozwoli nam poznać graniczną różnicę między wartościami obserwowanymi i oczekiwanymi jaka jest jeszcze „dopuszczalna”. Jeśli obliczone dla danego stosunku liczbowego χ^2 jest mniejsze od tego granicznego to przyjmuje się, że obserwowane liczebności są zgodne z oczekiwanymi, a jeśli obliczone dla danego stosunku χ^2 jest większe od tego granicznego (tablicowego) to liczebność i obserwowane uznaje się za zbyt odbiegające od teoretycznych, by uznać je za zgodne. Wartość statystyki χ^2 dla $\alpha = 0,05$ i trzech stopni swobody wynosi $\chi^2 = 7,81$. Stopnie swobody obliczymy odejmując 1 od liczby grup (fenotypów). W naszym przykładzie mamy cztery fenotypy, więc $4-1=3$ stopnie swobody. Alfa to poziom istotności, który w statystyce nosi nazwę błędu I rodzaju. Szczegółowe omówienie tego zagadnienia przekracza ramy niniejszego opracowania, ale dla naszych celów wystarczy wiedzieć, że w naukach przyrodniczych najczęściej przyjmuje się wartość 0,05 jako graniczną, co oznacza w znacznym uproszczeniu, że wniosek statystyczny będzie błędny z prawdopodobieństwem 5%. Dla jednego stopnia swobody tablicowe (graniczne) $\chi^2=3,84$ a dla dwóch stopni swobody $\chi^2=5,99$. Choć tablice rozkładu χ^2 są rozbudowane to w praktyce wystarczy znać trzy wartości czyli 3,84 (gdy analizuje się dwie grupy ryb), 5,99 (gdy analizuje się trzy grupy ryb) i 7,81 (gdy analizuje się cztery grupy ryb).

Praktyczne określanie odległości między genami w grupie sprzężeniowej

Krzyżówka testowa omawiana powyżej nazywana dwupunktową, to metoda służąca mapowaniu, polegająca na kojarzeniu podwójnej heterozygoty ($AaBb$) z podwójną homozygotą recesywną ($aabb$), czyli dotyczy dwóch loci. Częstość fenotypów u potomstwa odpowiada wtedy częstości gamet wytwarzanych przez heterozygotę.

Na podstawie obserwowanej częstości crossing-over, można oszacować względną odległość między rozpatrywanymi loci na chromosomie. Miarą względnej odległości między badanymi genami jest procent (centymorgan cM) wymian między chromosomami homologicznymi i jest to stosunek liczby osobników zwanych rekombinantami do ogółu potomstwa.

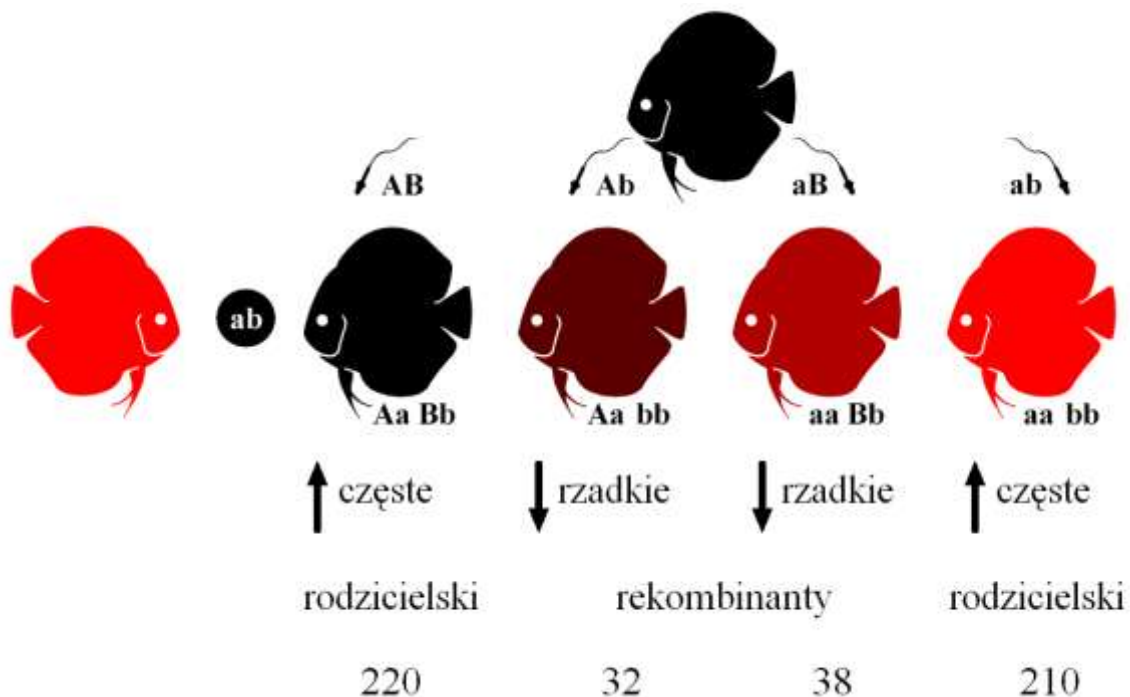


Rycina 8. Wyniki przykładowe kojarzenia testowego podwójnej heterozygoty $AaBb$ z podwójną homozygotą $aabb$.

Nie znamy tej odległości wcześniej, ale w celach dydaktycznych prześledzić można procesy, jakie stoją za wynikiem kojarzenia testowego. Jeżeli odległość między dwoma genami to 1,5 cM, to wtedy w procesie mejozy 1,5% komórek rozrodczych będzie rekombinowana w czasie crossing-over, natomiast pozostałe 98,5% gamet ma genotypy zgodne ze sprzężeniem. Rekombinowane gamety zawsze stanowią mniejszość, a częstość każdej z nich, jest zawsze niższa od 25%. Gdyby częstość wynosiła 25%, to byłaby to sytuacja braku sprzężenia. Gdy rekombinacja zachodzi z częstością 1,5%, to tyle właśnie powstaje gamet rekombinowanych to oznacza, że 1,5% potomstwa uzyskanego w wyniku takiego kojarzenia, będzie miała genotyp rekombinowany. Oba genetyczne rekombinanty,

będę występowały z częstością 0,75%, gdyż rekombinacja powoduje powstanie dwóch równolicznych genotypów gamet **Ab** i **aB**, czyli dwóch genotypów potomstwa **Aabb** i **aaBb**. Natomiast genotypy rodziców występują wśród potomstwa z częstością między 25% a 50%. W powyższym przykładzie pozostałe 98,5% gamet rekombinowanych, daje dwie równoliczne grupy gamet o genotypach **AB** i **ab** czyli dwóch genotypów potomstwa **AaBb** i **aabb** po 49,25% grupy potomstwa (rycina 8).

W rzeczywistych warunkach liczebności rekombinantów i osobników o genotypach rodzicielskich nie będzie identyczna. Procesy rekombinacji oraz proces zapłodnienia jest zjawiskiem losowym i nie przebiega zgodnie ze ścisłym schematem. Przykładowe wyniki takiego kojarzenia to 500 osobników pokolenia F₂, w którym rodzicielskie układy genetyczne czyli **AaBb** (220) i **aabb** (210) są częste, a genotypy **Aabb** (32) i **aaBb** (38) to nowe układy alleli inne niż u rodziców, czyli są to rekombinanty (rycina 9).



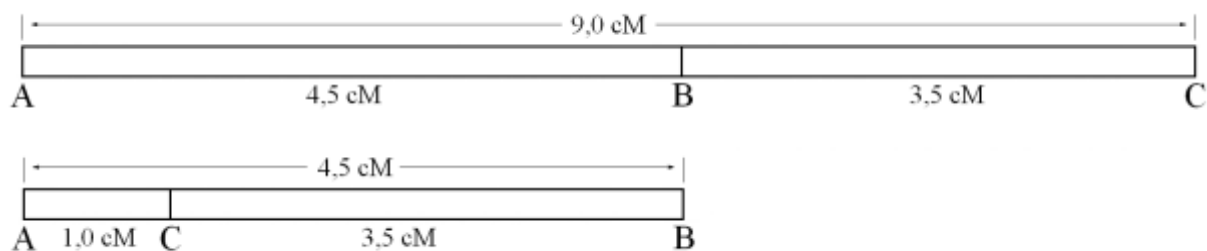
Rycina 9. Wyniki przykładowe kojarzenia podwójnej heterozygoty **AaBb** z podwójną homozygotą **aabb**.

W sytuacji gdy spośród 500 osobników 70 sztuk stanowią rekombinanty (32 **Aabb** + 38 **aaBb**) to częstość rekombinacji wynosi $(70/500)=0,14$ czyli 14%, co oznacza że odległość

między genem a i b wynosi 14 jednostek mapowych 14 cM. Wynik ten może być zakłócony poprzez podwójny crossing-over, czyli jeśli odległość jest duża, to może być znacznie niedoszacowana. Z tego też względu, konstruując mapy genetyczne trzeba się ograniczać do odległości kilku lub kilkunastu jednostek.

W praktyce hodowlanej ze zjawiska sprzężenia częściej korzystamy w sposób „odwrotny”. Znając już częstość rekombinacji (oznaczana jako r) chcemy wyliczyć frekwencje poszczególnych genotypów i fenotypów w pokoleniu potomnym. Częstość każdego z rekombinantów wynosi $r/2$, czyli połowę z częstości rekombinacji, a częstość każdego z fenotypów rodzicielskich wynosi $(1-r)/2$. Wiedząc, iż częstość rekombinacji między loci A i B wynosi 0,14, przewidujemy, iż rekombinanty pojawiać się będą z częstością $0,14/2=0,07$ tj. 7%, a fenotypy rodzicielskie z częstością $(1-0,14)/2=0,43$ tj. 43%. W ten sposób można szacować frekwencje poszczególnych fenotypów wśród potomstwa, czyli tak dobierać pary do rozrodu, by uzyskiwać potomstwo o pożądanym cechach.

Określenie odległości rekombinacyjnej między dwoma loci to najprostszy przypadek takich analiz. Można je rozbudowywać o kolejne loci. Przykładowo, jeśli na podstawie eksperymentalnych kojarzeń testowych ustalono, że odległość między genem A i B wynosi 4,5 cM, a odległość między B i C wynosi 3,5 cM, to ile wynosi odległość między A i C? Hipotetycznie możliwości są dwie, czyli albo będzie to 8 cM albo 1 cM, czyli że gen C może znajdować się między genami A i B, albo mieć położenie skrajne w stosunku do genów A i B (rycina 10).



Rycina 10. Możliwe wzajemne położenia trzech genów A, B i C przy znanych odległościach B i C oraz A i C

By upewnić się który z wariantów z ryciny 10 jest rzeczywisty, można wykonać dodatkowy eksperyment dla analizy odległości między genami A i C. Dokładniejsze wyniki uzyskuje się jednak stosując analizy segregacji trzech genów równocześnie, czyli stosując krzyżówki trójpunktowe. Trójpunktowa krzyżówka testowa uwzględnia wpływ wielokrotnego

crossing-over. W tym przypadku potrójną heterozygotę *AaBbCc* kojarzy się z potrójną homozygotą recesywną *aabbcc*. Jeśli geny te nie są sprzężone, to w pokoleniu potomnym częstość wszystkich fenotypów jest sobie równa. Znaczne zróżnicowanie liczebności poszczególnych klas potomstwa, wskazuje na sprzężenie między tymi genami (tabela 3).

Tabela 3. Wyniki przykładowego eksperymentu krzyżówki trójpunktowej

Genotyp gamet	Genotypy potomstwa	Liczba osobników	Klasy potomstwa
ABC	AaBbCc	347	Rodzicielskie
ABc	AaBbcc	52	Pojedyncze crossing-over
AbC	AabbCc	7	Podwójne crossing-over
Abc	Aabbcc	92	Pojedyncze crossing-over
aBC	aaBbCc	90	Pojedyncze crossing-over
aBc	aaBbcc	6	Podwójne crossing-over
abC	aabbCc	49	Pojedyncze crossing-over
abc	aabbcc	357	Rodzicielskie

Osobniki, które reprezentują fenotypy identyczne z rodzicielskim pokoleniem powstały z gamet w których w czasie mejozy nie doszło do crossing-over i gamety te nie były rekombinowane lecz dziedziczyły się w układzie sprzężonym. Są to osobniki o genotypie *AaBbCc* i *aabbcc* (gamety *ABC* i *abc*). Grupa potomstwa o fenotypie rodziców jest najliczniejsza, natomiast najmniej liczna jest grupa w której doszło do podwójnego crossing-over. W naszym przykładzie najmniej liczne są grupy o genotypie *AabbCc* i *aaBbcc* (gamety *AbC* i *aBc*). Pozostałe osobniki to rekombinanty o pojedynczym crossing-over w dwóch wariantach. Pierwszy wariant rekombinacji pojedynczej to *AaBbcc* i *aabbCc* (gamety *ABc* i *abC*), a drugi wariant rekombinacji pojedynczej to *aaBbCc* i *Aabbcc* (gamety *aBC* i *Abc*).

Jak na podstawie crossing-over określić położenie genów względem siebie, czyli określić który jest „w środku”? Wiadomo, że podwójny crossing-over spowoduje rekombinacje środkowego genu w stosunku do pozostałych dwóch. Skoro w naszym przykładzie zidentyfikowaliśmy podwójne rekombinanty jako osobniki o genotypie *AabbCc* i *aaBbcc* (gamety *AbC* i *aBc*), to porównując to do genotypu osobników o fenotypie rodzicielskim czyli osobników *AaBbCc* i *aabbcc* (gamety *ABC* i *abc*) stwierdzamy, że loci

genu B znajduje się gdzieś między loci genów A i C. Podwójne rekombinanty stanowią więc łącznie $7+6=13$ osobników. Analogiczne porównanie pozwala nam stwierdzić, że w pojedynczych rekombinantach *AaBbcc* i *aabbCc* (gamety *ABc* i *abC*) doszło do crossing-over między genami B i C, a osobników takich jest $52+49=101$. Natomiast w pojedynczych rekombinantach *aaBbCc* i *Aabbcc* (gamety *aBC* i *Abc*) doszło do crossing-over między genami A i B, a osobników takich jest $90+92=182$.

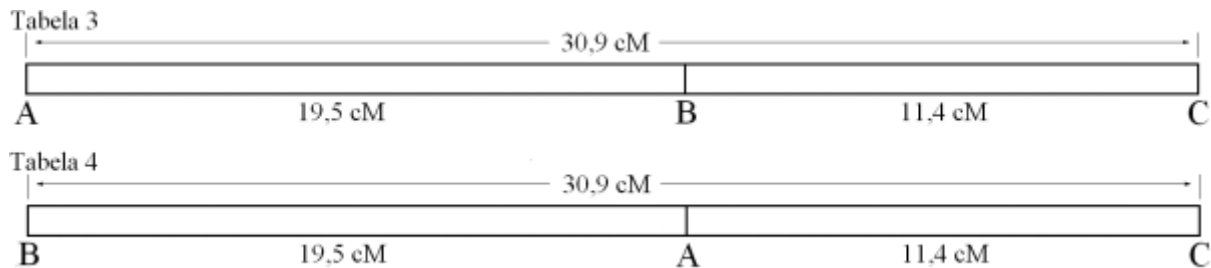
Obliczamy teraz odległość między genami A i B. Suma pojedynczych rekombinantów między genami A i B wynosi 182, ale podwójne crossing-over też musi być wzięte pod uwagę, czyli mamy dodatkowo 13 takich przypadków. Łącznie mamy $182+13=195$ osobników u których doszło do pęknięcia i wymiany chromatyd siostrzanych podczas mejozy. Te 195 osobników spośród 1000 wszystkich przypadków stanowi 19,5%, czyli odległość między genami A i B wynosi 19,5cM. Obliczamy teraz odległość między genami B i C. Suma pojedynczych rekombinantów między genami B i C wynosi 101, ale podwójne crossing-over też musi być wzięte pod uwagę, czyli mamy dodatkowo 13 takich przypadków. Łącznie mamy $101+13=114$ osobników, u których doszło do pęknięcia i wymiany chromatyd siostrzanych podczas mejozy. Te 114 osobników spośród 1000 wszystkich przypadków stanowi 11,4%, czyli odległość między genami B i C wynosi 11,4cM. Suma obu obliczonych odległości, czyli 19,5 i 11,4 stanowi dystans między skrajnymi genami czyli między A i C, wynoszący 30,9 cM.

W powyższym przykładzie układ liniowy genów A, B i C odpowiadał alfabetycznemu ich zapisowi ale tak być nie musi (tabela 4).

Tabela 4. Wyniki przykładowego eksperymentu krzyżówki trójpunktowej

Genotyp gamet	Genotypy potomstwa	Liczba osobników	Klasy potomstwa
ABC	AaBbCc	347	Rodzicielskie
ABc	AaBbcc	52	Pojedyncze crossing-over
AbC	AabbCc	92	Pojedyncze crossing-over
Abc	Aabbcc	6	Podwójne crossing-over
aBC	aaBbCc	7	Podwójne crossing-over
aBc	aaBbcc	90	Pojedyncze crossing-over
abC	aabbCc	49	Pojedyncze crossing-over
abc	aabbcc	357	Rodzicielskie

Na podstawie wyników zamieszczonych z tabeli 4 wnioskuje się, że podwójne rekombinanty to osobniki o genotypie *aaBbCc* i *Aabbcc* (gamety *aBC* i *Abc*). Oznacza to, że podwójna rekombinacja wymieniła miejscami gen A, czyli to on jest „w środku”. Dalsze obliczenia są analogiczne do prezentowanych dla danych z tabeli 3.



Rycina 11. Liniowe ułożenie genów ABC i BAC przykładów z tabel 3 i 4

Należy też wspomnieć, iż w pewnych miejscach częstość rekombinacji jest wyższa niż w innych, czyli względne odległości między loci nie mają bezpośredniego odwzorowania w fizycznej odległości między sekwencjami genetycznymi, choć czasami przyjmuje się pewną przybliżoną odległość na kilka tysięcy par zasad (czyli nukleotydów w cząsteczce DNA).

W rozpatrywanych analizach cały czas zakłada się, że prawdopodobieństwo zajścia crossing-over jest równie prawdopodobne w każdym miejscu chromosomu. Tak jednak nie jest, gdyż połączone chromatyny stanowiące chiazmy, lokalnie zwiększają sztywność chromatyd, więc w najbliższym sąsiedztwie nie dojdzie to takiego zagięcia chromatyny by zaraz obok mogło swobodnie dojść do powstania kolejnego miejsca rekombinacji. Innymi słowy rekombinacja w konkretnym miejscu zmniejsza prawdopodobieństwo kolejnej rekombinacji w najbliższym sąsiedztwie. Oznacza to, że częstość podwójnego crossing-over nie jest równa prostemu ilorazowi dwóch zdarzeń, czyli dwóch niezależnych pojedynczych crossing-over. Zjawisko to nazywamy interferencją (I) i jest ono przeciwieństwem koincydencji (K). Współczynnik koincydencji to stosunek obserwowanej częstości podwójnych crossing-over do częstości teoretycznej, wynikającej z iloczynu dwóch niezależnych crossing-over. W naszym przykładzie, częstość podwójnego crossing-over to $13/1000=0,013$. Częstość pojedynczych crossing-over to $(101+13)/1000=0,114$ oraz $(182+13)/1000=0,195$, czyli iloczyn tych dwóch niezależnych zdarzeń wynosi $0,114 \times 0,195 = 0,02223$. Stosunek obserwowanej częstości $0,013$ do teoretycznej częstości $0,02223$ to $0,013/0,02223=0,58$. Oznacza to, że podwójny crossing-over zajdzie w 58% spodziewanych przypadków, a to oznacza, że interferencja wynosi 42%. W naszym

przykładzie obserwowana ilość rekombinacji podwójnych jest niższa niż teoretyczna, dlatego wnioskujemy, że jedno z tych crossing-over zmniejsza szanse zajścia drugiego z nich i zjawisko to nazywamy interferencją pozytywną. Jednak jeśli pierwszy crossing-over zwiększa szanse zajścia drugiego crossing-over, to nazywamy to interferencją negatywną, wtedy ilość obserwowanych podwójnych crossing-over będzie wyższa, niż ta wyliczona teoretycznie (równa iloczynowi prawdopodobieństwa pojedynczych crossing-over).

Rozważania takie oraz kojarzenia testowe, można rozwijać poszerzając ilość rozpatrywanych genów oraz zwiększając ilość analizowanych pokoleń. Wraz ze wzrostem złożoności takiego eksperymentu, rośnie skomplikowanie obliczeń, jakie należy przeprowadzić, co staje się zbyt uciążliwe dla przeciętnego hodowcy. Tak jak w wielu innych przypadkach, tak i dla zagadnienia sprzężenia genów, powstały ogólnie dostępne programy komputerowe, przeznaczone do wykonania żmudnych obliczeń, a badaczowi pozostaje tylko poprawne zinterpretowanie uzyskanych wyników.

Bifido Punnett Square Calculator Professional

File Genetics Calculators Options Help

Genes and phenotypes

	Dominant gene	Recessive gene
1	A	a
2	B	b
3	C	c

Two Genes Three Genes

Calculate Phenotypes Clear Genes

	Phenotype	Amount
1	ABC	347
2	Abc	52
3	AbC	7
4	Abc	92
5	aBC	90
6	aBc	6
7	abC	49
8	abc	357

Calculate Results Clear Phenotypes

Results

	Genes	Frequency (%)
1	ab	19,5
2	bc	11,4
3	ac	30,9

Map Distance (m.u.)

48,116734

Parents genotypes

(abc)(abc)

(ABC)(abc)

Genes localization map

a-b-c

Double crossig-over (teor.): 0,022230

Double crossig-over (prac.): 0,013000

Coincidence: 0,584795

This Recombination calculator can be used to determine recombination frequency (RF) between two or three loci. For small distance, the recombination frequency (RF) is proportional to the map distance. For large distance, multiple cross-overs must be taken into account. It is calculated using the following steps:
 1) Select number of genes.
 2) Insert dominant and recessive genes and push Calculate Phenotypes.
 3) Insert amounts of phenotypes and push Calculate Results.
 Using recombination frequency (RF) between two loci you can determinate map distance. It is calculated using the following formula:
 $RF = (1 - e^{-(2 * \text{map distance})}) / 2$

Rycina 12. Wyniki przykładowego eksperymentu krzyżówki trójpunktowej z tabeli 3, obliczone za pomocą programu Bifido Punnett Square Calculator Professional

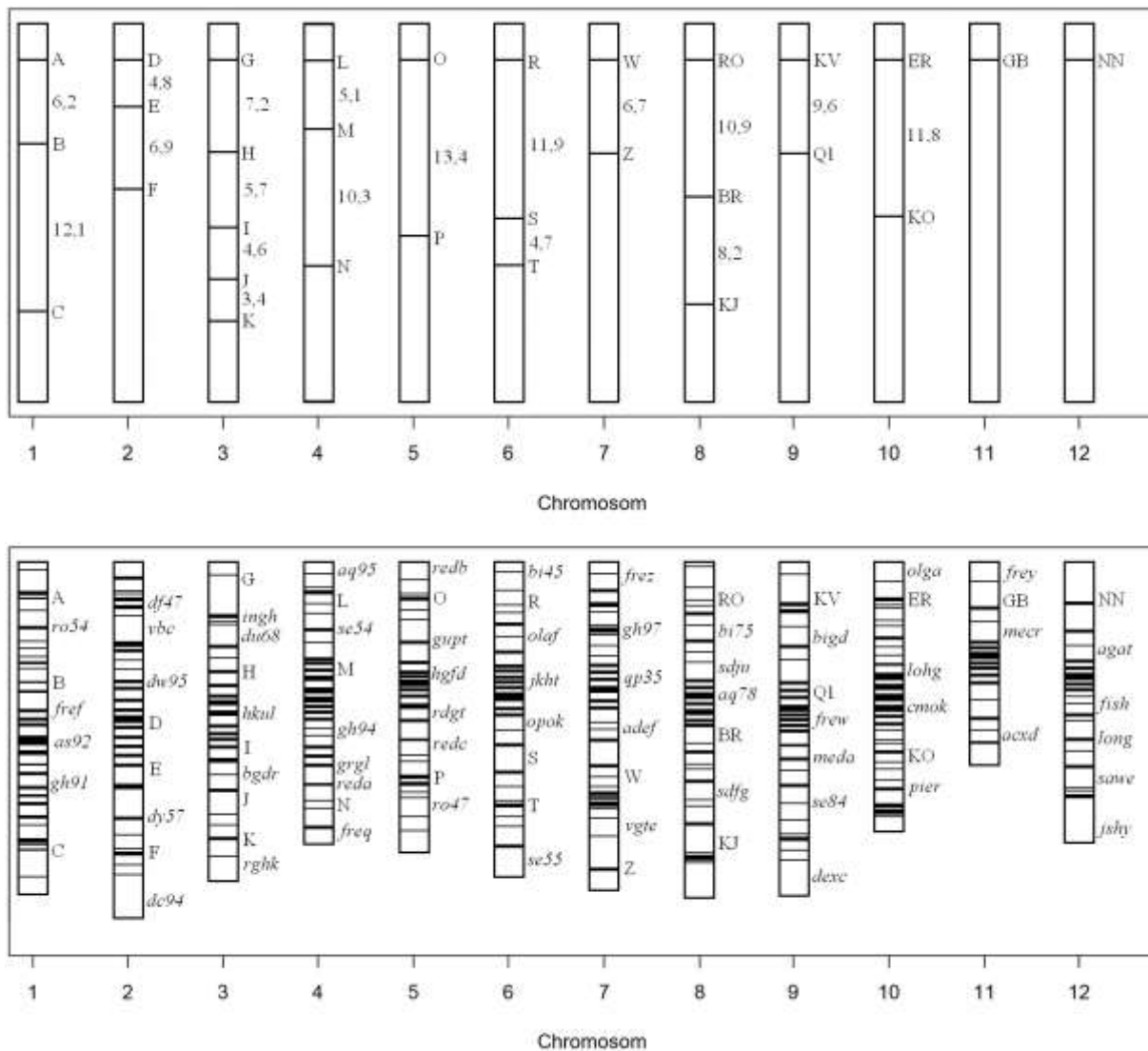
Podstawy genetyki prowadzą to do map genetycznych

Mapowanie genów, polega na ustalaniu wzajemnego położenia i odległości loci na chromosomach i jest to najniższy z poziomów poznania genomu. Podstawowa mapa genomu zawiera przede wszystkim informacje o genetycznych odległościach pomiędzy loci, występującymi w układach sprzężonych. Miarą odległości między poszczególnymi loci nie jest wielkość fizyczna, porównywalna z takimi miarami jak skala metryczna. Odległość między dwoma genami leżącymi na tym samym chromosomie, mierzy się jako częstość zachodzenia rekombinacji między rozpatrywanymi genami. Jeżeli między dwoma genami częstość zachodzenia rekombinacji odpowiada 1%, to na mapie genetycznej oznacza to 1 centyMorgan (1cM), czyli taki dystans, w którym crossing-over zachodzi jeden raz na 100 mejoz. Wszystkie geny w pojedynczym chromosomie stanowiłyby łącznie dziedziczącą się grupę sprzężeniową, gdyby nie proces crossing-over. Prawdopodobieństwo rozerwania chromosomu i rekombinacji między chromatydami chromosomów homologicznych, czyli crossing-over między dwoma loci, rośnie wraz ze wzrostem fizycznej odległości między tymi loci. Wynika z tego, że geny leżące na chromosomie blisko siebie mają większą szansę, by razem zostać przekazane potomstwu. Oznacza to, że wielkość oddalenia fizycznego mniej więcej pokrywa się z odległością rekombinacji. Przyjmuje się nawet orientacyjnie, że wielkość 1 cM, czyli 1% rekombinacji, można przeliczyć na fizyczną odległość 1 miliona par nukleotydowych. Pamiętać jednak należy, że relacje takie są prawdziwe jedynie dla małych odległości.

Poza odległościami mapa genetyczna zawiera również informacje na temat kolejności położenia sprzężonych loci. Budowa tych map opiera się na analizie segregacji alleli w tzw. rodzinach referencyjnych. Po ustaleniu genotypów dla wszystkich członków analizowanej rodziny wykorzystuje się metody statystyczne, pozwalające na wykrywanie sprzężenia oraz ustalanie odległości między sprzężonymi loci. Obliczenia takie dla kojarzeń testowych przedstawiono powyżej, natomiast w przypadku gdy kojarzeń testowych przeprowadzić nie można, obliczenia stają się bardziej złożone.

Pierwsze proste mapy genetyczne tworzono na początku ubiegłego wieku. Wtedy ustalano wzajemną lokalizację kilku loci w grupach sprzężeniowych. Ich wzajemne położenia i odległość genetyczną ustalono np. jako $A \leftarrow 12,4 \rightarrow B \leftarrow 25,2 \rightarrow C$ co stanowiło jedną grupę sprzężeniową i opisywało pierwszy chromosom. Inne rozpatrywane geny stanowić mogły np. grupę o układzie $D \leftarrow 7,2 \rightarrow E \leftarrow 13,7 \rightarrow F$. Nowo zmapowane geny ulokowane były na drugim chromosomie. Wraz z poznawaniem i analizą nowych genów, mapa taka powiększała

się o nowe grupy sprzężeniowe. Opis taki, najczęściej nie obejmował wszystkich chromosomów, gdyż mapowaniu takiemu podlegały tylko genu warunkujące łatwo wyróżnialne cechy fenotypowe jak, np. warianty ubarwienia ciała lub kształtu płetw. Dlatego mapy takie, składały się najczęściej z kilku do kilkudziesięciu genów na kilku chromosomach. Chromosomy na których nie znajdowały się geny bezpośrednio wpływające na pojedyncze cechy fenotypowe, były „ukryte” przed takim mapowaniem.

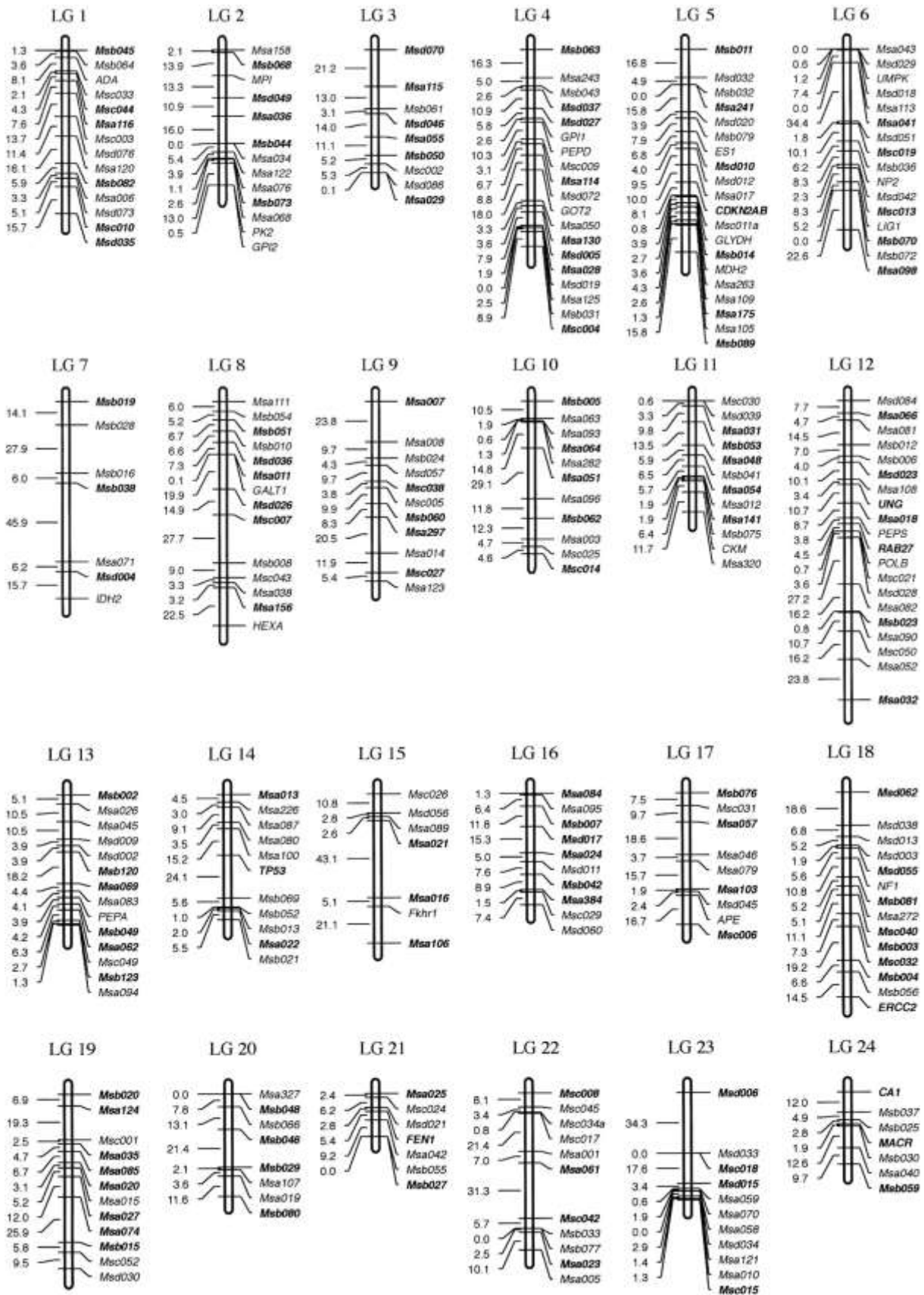


Rycina 13. Przykładowa mapa sprzężeniowa (na górze) oraz cytogenetyczna (na dole)

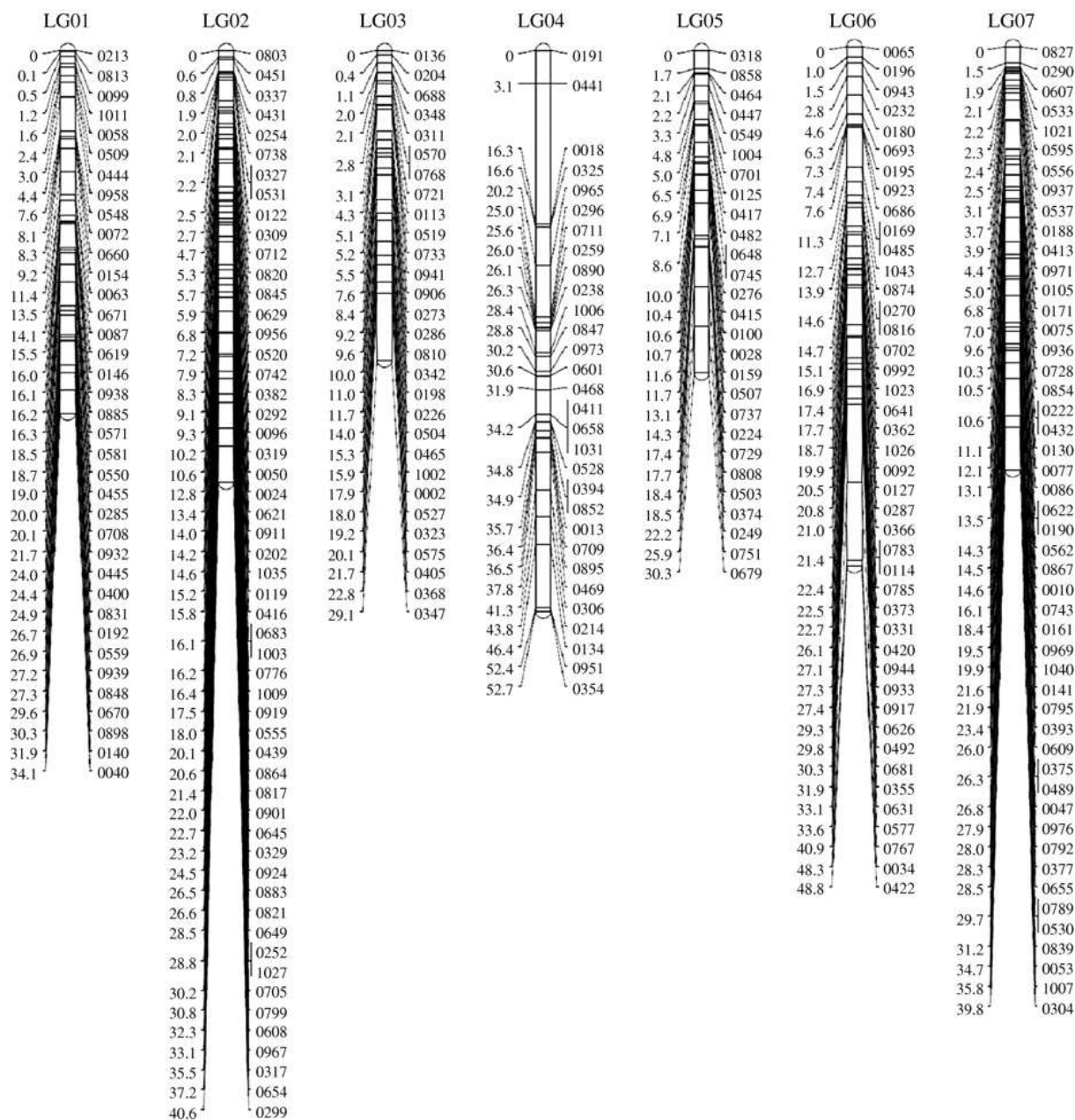
Kolejne etapy szczegółowego poznania genomu to mapa cytogenetyczną genomu, która dostarczy informacji o chromosomowych pozycjach wszystkich znanych genów i markerów genetycznych. Mapa cytogenetyczna jest rodzajem, a raczej „nośnikiem” mapy fizycznej. Konstruowanie fizycznych map genomu, bazuje na wykorzystaniu technik

cytogenetycznych i molekularnych, stąd też mapy fizyczne mogą posiadać różne stopnie rozszyfrowania. Mapa cytogenetyczna pokazuje charakterystyczny pasmowy wzorec chromosomów, wybarwionych różnymi technikami. Fizyczna mapa genomu, zawiera szczegółowe informacje o chromosomowym położeniu analizowanych loci, czyli wskazuje, na którym chromosomie i w którym rejonie tego chromosomu, znajduje się locus konkretnych genów. Mapy fizyczne oparte są na podstawie międzynarodowego wzorca kariotypu danego gatunku. We wzorcu, każdy chromosom ma przyporządkowany numer oraz ponumerowane są jego rozróżnialne obszary chromosomu, identyfikowane na podstawie barwienia prążkowego. Schemat tak uporządkowanego kariotypu nazywa się idiogramem. Lokalizacje genów na takiej mapie zapisuje się odpowiednim kodem. Ramiona chromosomu oznaczone są literami „p” dla ramienia krótkiego oraz „q” dla ramienia długiego. Te dzielą się na regiony, a w nich kolejno numeruje się prążki w kierunku od centromeru (przewężenie pierwotne chromosomu) do telomeru (końca chromosomu). Opis konkretnego miejsca na chromosomie zaczyna się od numeru chromosomu, następnie jest oznaczenie ramienia (p lub q), region chromosomu oraz numer prążka w obrębie regionu. Przykładowo prążek 3 w regionie 2 długiego chromosomu 4 opisany jest jako 4q23.

Odpowiednie nasycenie mapy markerami w połączeniu z dokładną identyfikacją ich położenia na chromosomach, pozwala na stworzenie genomowej mapy markerowej. Markery genetyczne to różnorodne cechy kontrolowane przez pojedynczy gen, których fenotyp można łatwo wykryć za pomocą dostępnych technik analitycznych. Markery genetyczne dzieli się zazwyczaj na dwie klasy. Do pierwszej należą kodujące sekwencje warunkujące różnorodne białka. Są to markery, które identyfikuje się na podstawie analizy produktu jaki warunkują. Druga klasa obejmuje zaś wysoko polimorficzne sekwencje nukleotydowe, które nie podlegają transkrypcji, takie jak sekwencje minikrosatelitarne i mikrosatelitarne. Są to sekwencje, które identyfikuje się na podstawie ich sekwencji, gdyż na ich podstawie nie powstaje żaden produkt białkowy. Szerokie wykorzystywanie w badaniach genomu markerów drugiej klasy, wynika m.in. z podstawowej ich zalety, jaką jest występowanie we wszystkich chromosomach oraz tego, że ich loci rozproszone są w miarę równomiernie po całym genomie. Pojawia się pytanie „po co nam w praktyce znać lokalizacje sekwencji minikrosatelitarnych i mikrosatelitarnych skoro niczego one nie kodują?”. Mimo, że same nie warunkują cech fenotypowych, to dzięki ich sprzężeniu z najbliższymi leżącymi genami, stanowią markery dla cech warunkowanych nawet przez nieznaną jeszcze sekwencję kodującą.



Rycina 14. Mikrosatelitarna mapa sprzężeniowa mieczonoszy (*Xiphophorus*) [Walter i in. 2004].



Rycina 15. Siedem spośród dwudziestu trzech układów sprzężeniowych w genomie gupików (*Poecilia reticulata*) [Tripathi i in. 2009]. Mapa ta jest stosunkowo gęsto nasycona markerami genetycznymi, jednak początkowe mapy były znacznie mniej gęsto usiane znanymi genami.

Mapy fizyczne o wyższym stopniu rozszyfrowania, uzyskuje się poprzez sekwencjonowanie cząsteczek DNA, czyli poznanie zapisu genetycznego nukleotydów po nukleotydzie. Pierwszym etapem sekwencjonowania jest pofragmentowanie chromosomalnego DNA na krótsze odcinki przy pomocy enzymów restrykcyjnych. Fragmenty te są namnażane oraz szczegółowo analizowane, a jednocześnie bardzo ważnym

zadaniem jest ustalenie wzajemnego położenia poszczególnych odcinków. Odcinki te podlegają właściwemu procesowi sekwencjonowania jedną z dostępnych metod.

Zaawansowanie prac nad poprawną sekwencją genomu, mierzone jest zazwyczaj współczynnikiem pokrycia (ang. genome coverage). Wskaźnik ten informuje, ile razy każdy odcinek DNA pojawił się podczas etapu rekonstrukcji pierwotnej sekwencji genomu. Im wskaźnik ten jest wyższy, tym więcej kopii danej sekwencji brało udział w procesie jej składania. Przykładowo u trzech wybranych gatunków ryb współczynniki pokrycia wynoszą $\sim 8,7\times$ u roźdzymki tygrysiej (*Takifugu rubripes* (Temminck & Schlegel, 1850)), $\sim 7,9\times$ u kolcobrucha zielonego (*Tetraodon nigroviridis* Marion de Procé, 1822) i $\sim 6,7\times$ u ryżanki japońskiej (*Oryzias latipes* (Temminck & Schlegel, 1846)). Inne gatunki dla których znane są w różnym stopniu sekwencje genomu, to m.in. danio pręgowany, gębacz trójbarwny, pyszczak zebra (*Maylandia zebra* (Boulenger, 1899)), zmienniak plamisty (*Xiphophorus maculatus* (Günther, 1866)), przydenka żebrowata (*Fundulus heteroclitus* (Linnaeus, 1766)), lirniczka (*Neolamprologus brichardi* (Poll, 1974)) i *Haplochromis nyererei* Witte-Maas & Witte, 1985.

Poznanie sekwencji DNA, nukleotyd po nukleotydzie, jest najwyższym poziomem poznania genomu. Na tej podstawie wskazuje się na konkretne nukleotydy, rozpoczynające i kończące sekwencje każdego z genów oraz lokalizowane są również sekwencje niekodujące. W przypadku map sprzężeniowych geny to czynniki „teoretyczne” a jednostkami odległości są centymorgany (cM), natomiast mapy fizyczne operują rzeczywistymi sekwencjami DNA, a odległości między genami to ilość nukleotydów nazywana parami zasad (pz).

Literatura:

1. Anwar, M. Z., Sehar, A., Rehman, I., & Khalid, M. H.: 2012. Gene Locater: Genetic linkage analysis software using three-point testcross. *Bioinformation*, 8(5), 243–245,
2. Grzesiak W., Kawęcki A.M.: 1998. *Genetyka zwierząt. Przewodnik do ćwiczeń.* Akademia Rolnicza w Szczecinie, Szczecin,
3. Kosowska B., Moska M., Strzała T.: 2008. *Genetyka ogólna dla biologów.* Wydawnictwo uniwersytetu przyrodniczego we Wrocławiu, Wrocław,
4. Purdom C.E.: 1992. *Genetics and Fish Breeding.* Springer Science & Business Media
5. Rogalska S., Walerych W.: 1994. *Podstawowe mechanizmy dziedziczenia.* Wydawnictwo Akademii Rolniczej Poznaniu, Poznań,
6. Sadakierska-Chudy A., Dąbrowska G., Goc A.: 2004. *Genetyka ogólna. Skrypt do ćwiczeń dla studentów biologii.* Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń,
7. Tripathi N, Hoffmann M, Willing EM, Lanz C, Weigel D, Dreyer Ch.: 2009. Genetic linkage map of the guppy, *Poecilia reticulata*, and quantitative trait loci analysis of male size and colour variation. *Proc Biol Sci* 276, 2195-208.
8. Walter R.B., Rains J.D., Russell J.E., Guerra T.M., Daniels C., Johnston D.A., Kumar J., Wheeler A., Kelnar K., Khanolkar V.A., Williams E. L., Hornecker J. L., Hollek L., Mamerow M. M., Pedroza A., Kazianis S.: 2004. A Microsatellite Genetic Linkage Map for *Xiphophorus*. *Genetics* 168:363-372,

