

**Dreifni og mislitni í lengdarbreytileika mtDNA yfir eina
kynslóð í þorski, *Gadus morhua***

Katrín Halldórsdóttir

Ritgerð fyrir 6 eininga rannsóknarverkefni (09.51.88-016) til BS gráðu í líffræði

Leiðbeinandi: Prófessor Einar Árnason



líffræðiskor

raunvísindadeild

HÁSKÓLI ÍSLANDS

júní 2003

Hér með lýsi ég því yfir að ritgerð þessi er byggð á mínum eigin athugunum, er samin af mér og að hún hefur hvorki að hluta né í heild verið lögð fram áður til hærri prófgráðu.

Katrín Halldórsdóttir, höfundur

Dagsetning

Háskóli Íslands
júní 2003

Dreifni og mislitni í lengdarbreytileika mtDNA yfir eina kynslóð í þorski, *Gadus morhua*

Höfundaréttur © 2003

Katrín Halldórsdóttir

Útdráttur

Dreifni og mislitni í lengdarbreytileika mtDNA yfir eina kynslóð í þorski, *Gadus morhua*

eftir

Katrínu Halldórsdóttur

Í þorski sem og ýmsum öðrum dýrategundum er lengdarbreytileiki til staðar í mt-DNA. Orsök hans er að finna í endurtekningum á D-lykkju svæði hvatberans. Þar er svokallað þríþátta ástand þar sem D-þráður verður til ásamt H-og L-þætti DNAsins. Endurtekningarnar eru við 5'-enda D-lykkjunnar, 40 basapara bútar sem mynda annarsstigsbyggingar. Athyglisvert er að allir þorskar sem skoðaðir hafa verið eru mislitna um þennan lengdarbreytileika. Fjöldi endurtekninga er misjafn og var áhugi fyrir því að kanna hvaða breytingar yrðu á dreifni og mislitni lengdarbreytileikans við flutning erfðæfnisins frá móður til eggs, þ.e. yfir eina kynslóð. Svæðið var magnað með PCR aðferð með þar til gerðum vísnum. Afurðirnar voru keyrðar bæði á agarósageli, póliakrílamíðgeli og í sjálfvirku rafdráttartæki. Mæður voru keyrðar oftast en einu sinni og á fleiri en einum stað í gelinu. Eggin voru keyrð einu sinni hvert um sig en fjöldi þeirra notaður á sama hátt og endurteknar keyrslur mæðra.

Niðurstöður voru þær að stökkbreytingar verða við myndun eggfrumunnar. Meðaltöl stærðar lengdarendurtekninga endurtekinna eggja hverfa að meðaltali. Meðaltöl eggja móður með lágt meðaltal eru stærri en meðaltal móðurinnar en meðaltöl eggja móður með hátt meðaltal eru minni en meðaltal móðurinnar. Um dreifni gildir hins vegar það að egg hvernar móður hafa aukningu í dreifni miðað við móðurina. Stökkbreytingarnar sem valda breytingunum eru bæði DNA tilfærsla sem og mishröð eftirmyndun DNA búta af mismunandi lengd. Ályktað er að val verði við þroskun eggjanna yfir í fullveðja einstaklinga sem minnkar breytileika og dreifni.

Abstract

Variance and heteroplasmy of length variation in mtDNA over a single generation transition in Atlantic cod, *Gadus morhua*

by

Katrín Halldórsdóttir

Length variation is found in Atlantic cod mtDNA as in many other animal species. In cod this is based on 40 base pair tandem repeats in the D-loop region of the mtDNA. The tandem repeats are at the 5'-end of the D-loop and they can form stable secondary structures. Each cod investigated so far is heteroplasmic for the length variation and the number of repeats varies between one and ten. The question investigated here is whether during a single generation transition mutation generate detectable additional variance and new heteroplasmic length variants. A DNA region of interest was PCR amplified from a number of unfertilized eggs from six mothers. The PCR products were run in agarose gels, in polyacrylamide gels and in an automatic DNA sequencer. Each egg was run once but the numerous eggs of a single mother formed replicas similar to repeated runs of the mothers.

The mean number of tandem repeats among eggs varied as a function of the mean number of repeats among mothers. However, the eggs of mother with a low number of repeats tended to have a higher number than the mother whereas eggs of mother with a high number of repeats tended to have fewer numbers of repeats than the mother — a form of regression towards the mean number of tandem repeats.

The variance of the distribution of tandem repeats of the eggs of each mother are greater than the variance of the mother. The probable cause of the changes are considered to be DNA replication slippage and a different rate of DNA replication of different sized molecules. The possibility that selection is working to reduce the variation and the variance is discussed.

Efnisyfirlit

Myndaskrá	v
Töfluskrá	vi
Inngangur	1
Aðferðir	5
Sýnataka	5
Einangrun mtDNA	6
Mögnun mtDNA	6
Rafdráttur á agarósageli	8
Rafdráttur á pólýakrílamíðgeli	8
Einangrun banda	8
Rafdráttur á ALFexpress	9
Úrvinnsla	9
Niðurstöður	12
Tilraunaskekkja	12
<i>F</i> -próf	13
MóðirII og egg	16
MóðirIX og egg	17
MóðirVIII og egg	18
MóðirVII og egg	18
MóðirI og egg	19
MóðirX og egg	20
Umræður	26
Tilraunaskekkja og <i>F</i> -próf	26
Lengdarbreytileiki í örtunglagenum, samanburður við D-lykkju	26
Fjöldi endurtekninga	27
Dreifnimunur og val	28
Þorskstofninn	29
Lokaorð	30
Töflur	33

Myndaskrá

1	Kort af sunnanverðu Íslandi, sýnatökustaðir	5
2	Dæmi um hrogn hverrar móður	11
3	Boxrit yfir dreifni í mismunandi keyrslum mæðra	14
4	Rit yfir mismunandi keyrslur mæðra	15
5	Boxrit yfir meðalstærð	21
6	Boxrit yfir meðaldreifni	22
7	Rit af meðalstærð	23
8	Rit yfir dreifni stærða	24
9	Stuðlarit	25
10	Egg móður IX og X á agarósageli.	31
11	Egg móður IX og X	31
12	Stuðlarit yfir fjölda endurtekninga mæðra og eggja í heild	32

Töfluskrá

1	Hrygnur	6
2	PCR-hvarfið.	7
3	Stærð magnaðra búta.	7
4	Mismunandi keyrslur mæðra	12
5	Dreifni og F próf	13
6	Mæður og egg saman	16
7	Fjöldi endurtekninga	17
8	Egg móðurII	33
9	Egg móðurIX	35
10	Egg móðurVIII	37
11	Egg móðurVII	39
12	Egg móðurI	42
13	Egg móðurX	44

Þakkarorð

Ég þakka leiðbeinanda mínum Einari Árnasyni fyrir kennslu og leiðbeinslu við gerð rannsóknarinnar. Hlynur Sigurgíslason fær sérstakar þakkir fyrir þolinmæði og greiðvikni. Þeim ásamt Snæbirni Pálssyni þakka ég ráðgjöf og liðveislu við framkvæmd verkefnisins.

Inngangur

Margar þjóðir í Norður-Atlantshafi byggja afkomu sína að nokkru eða allmiklu leyti á þorskveiðum. Hafinu er skipt á milli landanna og á hvert land sína landhelgi og þar með réttinn til veiða á því svæði. Þorsstofnar hafa víðs vegar hrunið, meðal annars vegna ofveiði. Menn hafa því reynt á undanförunum áratugum að stjórna fiskveiðum, bæði hér við land og erlendis, og vernda stofninn þannig. Til að hægt sé að ákveða það magn sem má fiska þurfa að liggja fyrir upplýsingar um stofnstærðina sjálfa. Slíkar upplýsingar eru ekki auðfengnar og deila menn mikið um hvaða aðferðum sé best að beita við útreikninga á þeim. Um samsetningu stofnsins, hvort um einn eða fleiri stofn sé að ræða, eru deildar meiningar. Allar stofngerðarmælingar sem og rannsóknir á stofninum eru því nauðsynlegar til að auðga skilning okkar á þessari auðlind þjóðarinnar og geta hugsanlega að lokum lagt lóð á vogarskálar fiskveiðistjórnarinnar. Rannsóknir á erfðafræði þorsksins hafa því hagnýtt gildi. Einnig hafa þær mikið fræðilegt gildi.

Hvatberi (mitochondrion) fruma inniheldur hringlaga DNA sameind. Í hverjum hvatbera eru margar DNA sameindir (mtDNA) og hver fruma hefur fjölda hvatbera, mismarga eftir gerð frumunnar (RAND, 2001). DNA hvatbera í hryggdýrum erfist sem einlitna, ólíkt kjarna DNA sem er tvílitna. DNA hvatbera er þó í reynd marglitna. Því margar DNA sameindir eru í hverjum hvatbera og margir hvatberar í hverri frumu. Við myndun okfrumu flyst umfrymið nær eingöngu frá móður og því erfist hvatbera DNA eingöngu frá móður til afkvæmis. Engin endurröðun á sér stað við myndun þess líkt og við myndun kjarnagena þar sem saman koma erfðaefni frá móður og föður (GRIFFITHS og *fleiri*, 2000; SHIELDS og GUST, 1995). Því má ætla að breytileiki sem finnst í mtDNA milli tveggja einstaklinga sé eingöngu vegna stökkbreytinga en ekki vegna endurröðunar (SHIELDS og GUST, 1995). Sá tími sem það tekur stökkbreytingu að verða allsráðandi í stofni ætti því að vera mun lengri fyrir mtDNA en kjarna DNA (STRACHAN og ANDREW, 1999). Svo er þó ekki og er talið að fixunarhraðinn sé um 10 sinnum meiri hjá hvatberanum (BROWN og *fleiri*, 1979). Ein útskýring þess er að einskonar flöskuháls myndist við myndun nýrrar eggfrumu eftir frjóvgun. Þar sem mtDNA fækkar hlutfallslega í hverri frumu og hending ræður við frumuskiptingu hvaða mtDNA fara áfram,

getur ákveðin arfgerð mtDNA orðið allsráðandi í tiltekinni eggfrumu sem leggur grunninn að umfrymisstofni í nýjum einstaklingi (STRACHAN og ANDREW, 1999).

Hvatbera DNA getur því þróast tíu sinnum hraðar en einstakt kjarna DNA (BROWN og fleiri, 1979; SHIELDS og GUST, 1995). Efnaskiptin, sem eiga sér stað í hvatberanum mynda afar stökkbreytandi umhverfi fyrir hið nakta óvarða DNA sem í honum er (RAND, 2001). Þessi stökkbreytiþrýstingur gefur breytileika innan umfrymis bæði í röð sem og í lengd mismunandi DNA sameinda. Meðan breytilegar sameindir eru innan fruma er það kallað mislitni (heteroplasmy). Þessar stökkbreytingar geta verið skaðlegar. Í ljósi skorts á endurröðun ættu slíkar stökkbreytingar að geta safnast upp og leitt til útrýmingar ákveðinna frumulína. mtDNA með skaðlegum stökkbreytingum getur orðið allsráðandi í tilteknu umfrymi og rutt heilbrigðari mtDNA línunum burt. Þar með mundi hæfni þessa umfrymis minnka. Það mundi hins vegar, samkvæmt kenningu um stigskipt val, vera á frumustigi sem valið væri geng þessu. Fruman í heild í vefnum yrði óæskilegt og valið yrði gegn henni (RAND, 2001). Því eru líkurnar á að finna einstaklingsháð genatilbrigði miklar (SHIELDS og GUST, 1995).

Lengi framan af var gert ráð fyrir að mtDNA væri hlutlaust merkið fyrir stofnerfðafræðilegar og þróunarfræðilegar rannsóknir. Nýlegar rannsóknir sýna hinsvegar að einhverjir valkraftar hafa áhrif á breytileika þess. Náttúrulegt val og genaflokt hafa áhrif á arfgerðartíðni innan og milli umfryma. Þessir kraftar eru að verkum á öllum stigum þ.e. milli sameinda innan hvatbera, milli hvatbera í umfryminu, milli fruma innan einstaklings, milli einstaklinga innan stofns og svo milli stofna (RAND, 2001). Þorsstofnar hafa verið rannsakaðir m.t.t. mtDNA gerðar, bæði með skerðibútagreiningum sem og PCR og beinum raðgreiningum á mtDNAinu. Slíkar rannsóknir benda til þess að í Norður Atlantshafi sé aðeins um einn erfðafræðilegan stofn að ræða en ekki undirskiptingar í fleiri einangraða stofna (ÁRNASON og fleiri, 1992; ÁRNASON og PÁLSSON, 1996; ÁRNASON, 2003).

Örtunglagen eða microsattellites eru vel þekkt fyrirbæri í kjarnagenum allra heilkjarna lífvera. Þetta eru endurtekningar á bösum, tveimur eða fleiri, sem sýna mikla fjölbrigðni í fjölda endurtekninganna og veldur því að DNA getur verið mislangt. Þessi svæði er algengt að nýta sem merkið (markerar) í stofnerfðafræði, þróunarfræði (GRIMALDI og CROUAEU-ROY, 1997), við kortlagningu genamengis mannsins og við sjúkdómagreiningar (STRACHAN og ANDREW, 1999) svo eitthvað sé nefnt.

DNA hvatbera er mun samþjappaðra en kjarna DNA og hlutfallslega mun minna svæði sem ekki skráir fyrir genum auk þess sem innraðir (introns) finnast ekki í genum mtDNA dýra.

Örtunglagen eru ekki þekkt í mtDNA en sambærilegt svæði hefur fundist á eða við D-lykkjuna, þar á meðal í þorski (ÁRNASON og RAND, 1992). D-lykkjan eða control region er stærsta svæðið sem ekki skráir fyrir neinum genum á mtDNA (JOHANSEN og BAKKE, 1996). Þessar endurtekningar í D-lykkju valda lengdarbreytileika mtDNAsins og þar með mislitni í mörgum tilfellum. Endurtekningar á þessu svæði hafa fundist í allmörgum tegundum og virðist þetta vera einn af fjölmörgum eiginleikum mtDNA sem sýna vissa samsvörun milli ólíkra tegunda (HAYASAKA og fleiri, 1991; ÁRNASON og RAND, 1992; NESBØ og fleiri, 1998; LUDWIG og fleiri, 2000). Nákvæm basaröð endurtekninganna er þó eitthvað mismunandi sem og lengd þeirra og staðsetning. Endurtekningarnar eru t.d. 40 basapör (bp) í þorski, (ÁRNASON og RAND, 1992), frá 74 bp–83 bp í styrjum, (LUDWIG og fleiri, 2000) en ekki nema 10 bp í percid fiskum (NESBØ og fleiri, 1998).

D-lykkju svæðið er nánar tiltekið svæðið milli tRNA^{Pro} og tRNA^{Phe} gena á litningnum. Hjá þorski eru þetta röðin frá basa númer 15700–16696 eða 997 basapara svæði (JOHANSEN og BAKKE, 1996). Þetta svæði er það stærsta af þremur svæðum sem ekki skrá fyrir neinum genum á litningnum. Hin eru bilið milli tRNA^{Asn} og tRNA^{Cys} sem er afar vel varðveitt meðal hryggdýra enda er þar upphaf eftirmyndunar L-þáttarins (JOHANSEN og fleiri, 1990). Einnig er 74 bp svæði milli tRNA^{Thr} og tRNA^{Pro} genanna sem er nokkuð breytilegt og því ákjósanlegt til stofngerðamælinga. Við 3'-enda D-lykkju svæðisins hjá þorski eru endurtekningarnar og skarast sú fyrsta við tRNA^{Pro} genið sem nemur fjórum bösum (JOHANSEN og BAKKE, 1996). Þessar endurtekningarnar eru að mörgu leyti sambærilegar við örtunglagen. Þó er hér um stærri endurtekna búta að ræða en í venjulegum örtunglagnum.

Á D-lykkju svæðinu er upphaf eftirmyndunar H-þáttarins, á því svæði er Conserved Sequence Block (CSB) sem er best varðveitta svæði D-lykkjunnar, auk stýrisvæða fyrir umritun. Einnig er þar að finna upphafsstað umritunar DNAsins yfir í RNA. Því er þetta svæði einnig oft nefnt control region eða stýrisvæði. Upphaf nýmyndunar D-þráðar er í kringum CSB svæðið. Displacement loop, sem er fullt nafn D-lykkju þráður, lýsir því ferli sem á sér stað á svæðinu. Þriðji þráðurinn, svokallaður D-lykkju þráður, myndast og ryður út H-þætti („displace“) þegar hann aðskilur H og L-þátt. Eins konar samkeppni myndast svo milli H-þráðar og D-þráðar um að bindast L-þræðinum. Þrátt fyrir að D-lykkjan sé breytilegasta svæðið í mtDNA fiska, bendir sú stöðuga annarsstigsbygging sem myndast á svæðinu til þess, að þar séu ferlar í gangi sem geta viðhaldið einkennum raðanna (BUROKER og fleiri, 1990).

Þar sem endurtekningar sem þessar koma fyrir í erfðamenginu virðist sem polymerasinn ruglist við eftirmyndunina, hann „spólar“ á röðunum, sem getur leitt til margfaldrar eftir-

myndunar af sama svæðinu. Við slíkar þriggja þátta aðstæður sem eru í D-lykkjunni verður auðveldlega röng basapörun milli þáttanna og einþátta bútur verður útundan. Þetta kallast „Slipped-Strand Mismatching“ eða lauspráða mispörun (LEVINSON og GUTMAN, 1987). Ef slíkur bútur getur basaparast við sjálfan sig myndast svokölluð lykkja. Slík annarsstigsbygging getur verið það stöðug að hvorki exónúkleasi né önnur leiðréttingarkerfi nái að eyða honum burt. Þetta er líklega það ferli sem hefur myndað endurtekningarnar á D-lykkju svæðinu. Til að jafnvægi haldist hljóta bútar líka að hverfa enda getur mispörunin einnig orðið þannig að einhverjar endurtekningarnar eru ekki eftirmyndaðar. Uppsöfnun endurtekninga getur reynst skaðleg þegar yfir ákveðin þröskuld er farið og eru þekktir mannasjúkdómar af þessum völdum í venjulegum örtunglagenum (HUMMERICH og fleiri, 1994). Því er ljóst að viðhald jafnvægis á slíkum stöðum er lífverum mikilvægt (BUROKER og fleiri, 1990; LEVINSON og GUTMAN, 1987; STRACHAN og ANDREW, 1999).

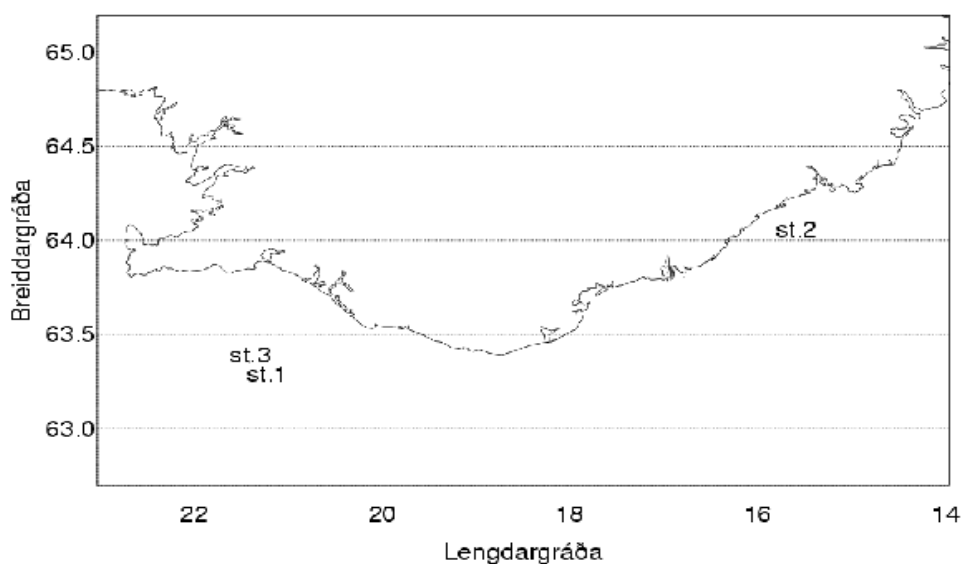
Vegna sérstæðrar byggingar litningsins á D-lykkju svæðinu er þetta skemmtilegt og spennandi svæði að rannsaka. Þarna gæti átt sér stað ákvörðun um hvort eftirmyndun eða umritun fari í gang og þá ekki ólíklegt að einhverjar upplýsingar fái frá kjarna um þörf og eftirspurn afurða gena á litningnum. Þekking á þessu svæði litningsins getur því aukið skilning okkar á ýmsum atriðum í frumulíffræði og genastjórnun.

Það sem vakir fyrir með þessari rannsókn er fyrst og fremst könnun á hvaða áhrif flutningur yfir eina kynslóð hefur á endurtekningarnar og þar með lengdarbreytileikann. Ég vildi kanna hvort stökkbreytingar yrðu á svæðinu við flutninginn frá hrygnu til afkvæma, sem mundu leiða til þess að aukinn breytileiki yrði meðal afkvæmanna. Þetta geri ég með athugun á tíðnidreifingu lengdarendurtekninganna og mislitni í umfrymi frumanna. Ég mun sýna fram á að einhverskonar viðhald virðist vera í gangi sem haldi jafnvægi á endurtekningunum. Hrygna og egg hennar eru ekki eins. Mismunandi tíðnidreifing lengdarendurtekninga milli kynslóða sem og fækkun eða fjölgun endurtekninganna eru þessu til staðfestingar. Í þorskinum, ólíkt t.d. styrju (BUROKER og fleiri, 1990), eru allir einstaklingar mislitna eins og hér kemur fram sem og hjá ÁRNASON og RAND (1992). Það stóð til að einangra DNA með mismargar endurtekningar og raðgreina þær. Því miður tókst ekki að staðfesta þann lengdarbreytileika og mislitni sem fannst með raðgreiningu. Til þess að það tækist þarf að ná mjög hreinu DNA úr böndum þess gels sem sýna mislitnið. Það tókst ekki hér en hefur tekist í mörgum tilfellum, t.d. hjá LUDWIG og fleiri (2000). ÁRNASON og RAND (1992) tókst að raðgreina þetta með því að klóna DNA í bakteríuvektor.

Aðferðir

Sýnataka

Sýni voru fengin úr rannsóknarleiðangri Hafrannsóknarstofnunar sem farin var vorið 2000. Vísindamenn Hafrannsóknarstofnunar sáu um að afla sýna. Sýni voru tekin af handahófi frá þremur stöðum við sunnanvert Ísland (Mynd 1). Hlynur Sigurgíslason sá um sýnatökuna (Tafla 1). Tungur hrygnanna voru skornar af nýveiddum fiskunum og þær settar í 96% etanól. Ófrjóvguð rennandi egg voru fengin úr kynkirtlum hrygnanna með því að kreista þær og þau kæld. Hlynur Sigurgíslason tók sýni úr þessum fiski til sameindafræðilegra rannsókna vegna MS verkefnis hans (SIGURGÍSLASON, 2003).



Mynd 1: Kort af sunnanverðu Íslandi, sýnatökustaðir st.1 – st.3 (SIGURGÍSLASON, 2003).

Tafla 1: Upplýsingar úr sýnatöku. Sex þorskhrygnur sem notaðar voru í rannsókninni (SIGURGÍSLASON, 2003).

Hrygna	st.	Lengd	Þyngd	Aldur	Sýnataka
		(cm)	(g)	(ár)	dagsetn.
MóðirI	1	NA	NA	NA	18.04 2000
MóðirII	1	NA	NA	NA	18.04 2000
MóðirVII	2	98	9215	7	27.04 2000
MóðirVIII	2	108	11325	10	27.04 2000
MóðirIX	3	92	6990	9	03.05 2000
MóðirX	3	86	4702	8	03.05 2000

Einangrun mtDNA

DNA var einangrað úr vöðva þorskhrygnanna og var fylgt aðferð fyrir „eyeball“ bufer samkvæmt RUZZANTE *og fleiri* (1996). Vöðvasýnin voru tekin úr tungum fiskanna sem geymdar voru í 96% etanóli. Við sýnatökuna var skorið í tunguna með sótthreinsuðu rakvéla-blaði og inn í hreinan skurðinn náð í örlítið af vöðva. Sýnin voru látin vera í háu TE (100 mM Tris-HCl, 40 mM EDTA (EthyleneDiamineTetraacetic acid), pH 8.0) í 30 mín til að þvo burt etanólið. Háu TE var svo fleytt ofan af og 200 μ l af rofabuffer (eyball buffer, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1 mM EDTA, 400 mM NaCl, 0.8% Tween 20TM sápu og 2.5 μ l af 20 μ g/ μ l prótínasa K) settur út á sýnin. Sýnin voru melt við 55° C yfir nótt (u.þ.b. 16 kl.st.) og hituð í 95° í 20 mínútur til þess að gera prótínasann óvirkan. Prótínasinn leysir upp vöðvafrumurnar og er þá hægt að ná í hvatberalitninginn (mtDNA) í lausninni. Sömu aðferð var beitt við egginn en þau voru melt hvert fyrir sig og lausnin notuð við mögnunina.

Mögnun mtDNA

Að lokinni einangrun var sá hluti mtDNA sem til athugunar er magnaður upp. Þetta var gert með PCR hvarfi (Polymerase Chain Reaction, SAIKI *og fleiri*, 1988). Þá voru smíðaðir vísar sitt hvoru megin við þann hluta erfðamengisins sem tekinn var til skoðunar. DNA var fjölfaldað með hitapolnum DNA pólímerasa í hvarfi sem flakkar á milli þriggja hitastiga í hverjum hring hvarfsins. DNA helixinn er rofinn með hitun við 95°C. Næst er lausnin kæld niður í 56°C til að vísar geti bundist DNA þráðum. Að því loknu er lausnin hituð upp í 72°C sem er kjörhitastig hitapolna pólímerasans og ensímið framlengir og myndar nýjan þráð út frá

vísunum á móttæðinum. Þar með er einum hring lokið. Með þessu móti er hægt á fljótlegan hátt að fá mikið magn af DNA þar sem fjöldi þræða sem pólímerasinn notar sem mót fyrir nýja þræði tvöfaldast í hverjum hring (SAIKI og fleiri, 1988).

Fyrir PCR hvarfið var 5 μ l af DNA einangrun blandað saman við 14 μ l af eftirfarandi blöndu: 3.3 μ l af 1mM dNTP, 2.0 μ l af 10 \times Taq PCR buffer (500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl), 0.68 μ l af 10 picomol/ μ l af hvorum vísi, 3.0 μ l af 1% Tween 20, 1.0 μ l af 0.05 mg/ml BSA og 0.18 μ l af Taq DNA pólímerasa (5.000 units/ml frá Pharmacia Biotech). BSA er notað sem stuðningur við einþátta DNA til að hindra bindingu þess við sjálft sig (KRINGS og fleiri, 1997). Hátt hitastig við bindingu eykur líkur á að vísarnir bindist á rétta staði á DNA þræðunum.

Hvarfið fór fram við þau skilyrði sem sjá má í Töflu 2 og var gert í tækinu GeneAmp^R PCR System 9700 frá Applied Biosystems. Vísarnir sem notaðir voru hér kallast GmL15636 (23bp) og GmH15920TCY (26bp) (Tafla2). Númerin vísa til númera basapara (bp) í hvatbera DNA þorsks samkvæmt raðgreiningu JOHANSEN og BAKKE (1996) og eru mótsvarandi við basaröð L-þræðar litningsins.

Tafla 2: PCR-hvarfið.

Vísar		Hringir			
Nafn	Basaröð	Eðlissvipting	Binding	Framlenging	Fjöldi
GmL15636	5'-ggaagagattttaactcccacca-3'	30''@94°C	30''@56°C	1'@72°C	40
GmH15920TCY	5'-Cy5-tttttggacatattatgaggcaggg-3'	30''@94°C	30''@56°C	1'@72°C	40

Tafla 3: Stærð magnaðra búta.

Fjöldi endurt.:	1e	2e	3e	4e	5e	6e	7e	8e	9e	10e
Stærð í bp:	171	211	251	291	331	371	411	451	491	531

Endurtekningarnar sem hér voru til athugunar eru samkvæmt JOHANSEN og fleiri (1990) frá 15696–15855 á litningnum og ná því 4 bösum inn á tRNA^{Pro} genið. 3'-endi GmL15636 er staðsettur 37 bösum ofanvert við svæðið og 3'-GmH15920TCY 45 bösum neðanvert við það. Mismunandi stærðir mtDNA frá 171–531 basa magnast svo eftir fjölda endurtekninga á litningnum en hver endurtekning eru 40 basar að lengd (Tafla 3).

Rafdráttur á agarósageli

Allar PCR afurðir voru skoðaðar á 1,5% agarósageli (6 g Agarose NA, 400ml 0.5×TBE, 8 μ l Ethidium Bromide) í 0.5×TBE dúa (5×TBE = 54 g Tris, 27.5 g bórsýra, 20 ml EDTA 0.5M pH 8.0). Hlaðið var 5 μ l af DNA og 1,5 μ l af hleðsludúa (800 μ l 50 w/v súkrósi, 100 μ l 2.5% Bromophenol Blue, 100 μ l 2.5% Xylene Cyanol). Rafdregið var í um 15 mínútur og gelið síðan skoðað undir útfjólubláu ljósi. Við rafdrátt ferðast kjarnsýrurnar á mismiklum hraða eftir stærð sinni og þar með hleðslu í gelinu, minnstu bútarnir hraðast. Skaut eru á rafdráttarburum og dragast neikvætt hlaðnar kjarnsýrurnar að plús hlaðna skautinu. Í gelinu er ethidium bromide en það sest fyrir í DNAinu sem gerir það að verkum að það lýsir undir útfjólubláu ljósi, því meira DNA því sterkara band.

Til að skoða lengdarbreytileika einstaklinga var reynt að rafdraga sýnin á agarósageljum og þá mun lengur eða allt upp í tvær til þrjár klukkustundir og í 2%–3% agarósageli. Með því að auka agarósann í gelinu og gera bútnum þar með erfiðara fyrir að ferðast eftir því var vonast til að nægilegur aðskilnaður fengist á böndunum svo hægt yrði að einangra DNA úr þeim.

Rafdráttur á pólýakrílamíðgeli

Þar sem reyna átti að raðgreina DNA úr böndunum og fá þar með staðfestingu á lengdarbreytileika var haldið áfram að reyna að fá betri aðskilnað bandanna. Pólýakrílamíðgel mynda ákveðnari grind en agarósagel, sem ætti að valda betri aðskilnaði. Gel mynduð úr 8% akrílamíðlausn (10.67 μ l 30% DNA PAGE, 1.2 ml 50×TAE og afjónað vatn að 40 ml, lausnin er síuð og lofttæmd og að því loknu eru 40 μ l af Temed og 400 μ l af 10% AP (Ammonium Persúlfat) bætt í svo það fjölliðist og myndi hlaup) voru keyrð við 130V í 8 klukkustundir. 15 μ l af PCR afurð og 4 μ l af GLB var hlaðið á. Rafdráttur var gerður í tækinu DCode™ System frá BIORAD í 1.5×TAE keyrsludúa (210 ml 50×TAE, 6790 ml afjónað vatn). Að þessu loknu voru gelin sett í litun (400 ml keyrsludúi, 20 μ l Ethidium Bromide) í 10 mínútur og skoluð í hreinum keyrsludúa í 15 mínútur. Þá var hægt að skoða þetta á ljósaborði yfir útfjólubláu ljósi.

Einangrun banda

Misstór bönd voru skorin út úr geljunum og voru þau sett í saltbrú til að einangra DNA frá gelefnunum. Búrið var fyllt af keyrsludúa en í afmarkaða v-laga vasa var sett 0.3M NaAc lausn (gert úr 3.0M NaAc pH 5.2) og bútnum komið fyrir við op þessara vasa. Þegar

straumi er hleypt á þá dregst kjarnsýran út úr gelefninu niður í botn vasanna þar sem kjarnsýran stöðvast í saltlausninni. Dregið var í u.þ.b. 15 mínútur.

Magnað var aftur með PCR hvarfi upp úr þessum einangrunarlausnum. Sama PCR hvarf var notað og lýst var hér að ofan en bindihiti var hækkaður í 58°C til að reyna að komast hjá aukaböndum sem alltaf gerðu vart við sig.

Rafdráttur á ALFexpress

Endanlegar niðurstöður og þær sem unnið verður með hér voru fengnar með rafdrætti í ALFexpress™ DNA Sequencer frá Pharmacia Biotech. Forritið ALFwin™ Fragment Analyser útg. 1.03 (Pharmacia Biotech) var notað til greiningar á gögnunum.

ALFexpress les flúrljómandi DNA búta. Sýnunum er hlaðið á pólýakrílamíðgel (25.2 g Urea, 18.0 ml 5×TBE, 8.4 ml Long Ranger gel solution (BioWhittaker Molecular Application), 16 ml tví afjónað vatn, 10% Temed og 10% AP er bætt í svo gelið hlaupi). Bútarnir dragast niður eftir gelinu og fram hjá föstum laser geisla sem kemur flúrljómun í bútonum af stað. Ljóssemi nemur ljósið og forritið reiknar og teiknar myndir af kúrfum sem eru í réttu hlutfalli við stærð og magn DNAsins sem fram hjá leisernum fer (PHARMACIA BIOTECH, 1997).

Til að kleift sé að skoða DNA með þessum hætti var notaður Cy-5 merktur vísir í PCR hvarfinu. Cy-5 merkt DNA flúrljómar þegar það fer í gegnum leisigeislann. Áður en sýnunum er hlaðið á var lit blandað saman við og stærðarviðmið (300 bp internal sizer frá Pharmacia Biotech). Tíunda hvert sýni var stærðarviðmið (50–500 bp external sizer frá Pharmacia Biotech) sem tækið notar til að stilla af útreikninga og minnka þannig brosáhrif í hlaupi og aðra staðbundna skekkju í keyrslu (PHARMACIA BIOTECH, 1998). Sýnin voru að lokum hituð í 94°C í 5 mínútur og þeim skellt strax á ís. Þetta er gert til að eðlissvipta DNAið áður en því er hlaðið á hlaupið. Síðan er það dregið einþátta í gegnum hlaupið.

Úrvinnsla

Í rannsókninni voru skoðaðar sex hrygnur og egg þeirra. Hrygnurnar eru kallaðar mæður og eggin nefnd eftir þeim. Mæðurnar eru númeraðar með rómverskum stöfum, móðirI, móðirII, móðirVII, móðirVIII, móðirIX og móðirX. Eggin eru nefnd eftir mæðrunum og er fjöldi eggja mæðra misjafn. Egg móðurI eru 33, egg móðurII eru 25, egg móðurVII eru 64, egg móðurVIII eru 58, egg móðurIX eru 42 og egg móðurX eru 14. Alls voru 236 egg sex mæðra skoðuð. Mæðurnar voru keyrðar oftar en einu sinni og yfirleitt hafðar á tveimur stöðum í gelinu

til viðmiðunar. Niðurstöður útreikninga fyrir öll eggin eru tekin saman í töflur og haft saman sér í kaflanum Töflur á blaðsíðu 33.

Gengið er út frá því sem einskonar núlltilgátu að eggin séu eins og móðirin og því séu endurteknar keyrslur mæðra sambærilegar við keyrslur mismunandi eggja sömu móður. Egg mismunandi mæðra verða skoðuð sem hópur m.t.t. sinnar móður en einnig verða hóparnir bornir saman hver við annan.

Kúrfurnar sem rafdráttartækið og forritið, sem notað er, reiknar út eru stærðarbútar mtDNA sem fara fram hjá lasernum. Flatarmálið undir kúrfunum er sá mælikvarði sem hér verður notaður til að ákvarða magn DNA af þeirri stærð sem kúrfan gefur til kynna. Sú magnmæling er notuð sem mæling á tíðni sameinda af þeirri lengd í mislitni. Með þessu móti er hægt að leggja mat á fjölda mtDNA sameinda með tiltekna lengd endurtekninga í umfrymi hvers einstaklings. Fjöldi kúrfa segir til um fjölda endurtekninga sem finnast meðal mtDNA í umfryminu.

Stærðirnar sem verða aðallega skoðaðar eru meðaltal og dreifni stærðar lengdarbúta-anna innan einstaklings, milli einstaklinga sömu móður og milli mæðra. Meðaltal er reiknað sem margfeldi flatarmáls og stærðar ($\bar{Y} = (1/n) \sum f_i Y_i$) og dreifni sem margfeldi flatarmáls og frávíks stærðar frá meðaltali í öðru veldi ($s^2 = (1/n) \sum f_i (Y_i - \bar{Y})^2$).

Staðalfrávikið, s , ($\sqrt{s^2}$), gefur okkur einnig mat á breytileika sýnis, sem og dreifnin, og er það á sömu einingu og meðaltalið. Breytileikastuðullinn CV (coefficient of variation, s/\bar{Y}) er staðlað frávík sem segir okkur hvert sé hlutfall staðalfrávíksins af meðaltalinu.

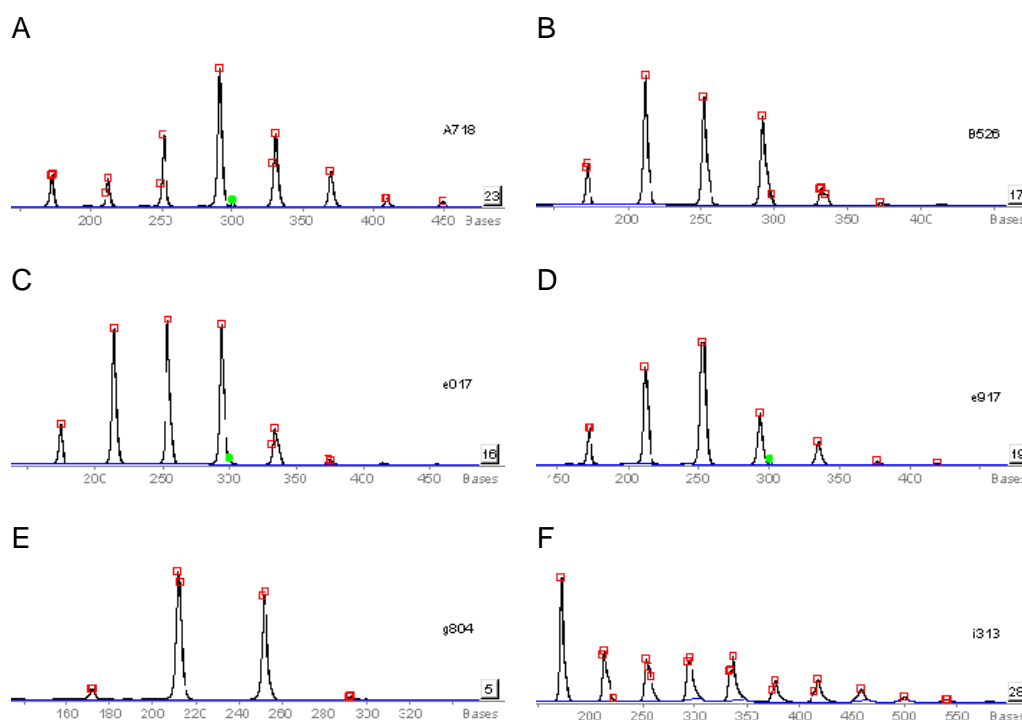
Fyrir eggin voru stærðirnar $g_1 = (1/ns^3) \sum f_i (Y_i - \bar{Y})^3$ og $g_2 = (1/ns^4) \sum f_i (Y_i - \bar{Y})^4 - 3$ reiknaðar. Þessar stærðir segja til um skekkju og ferilris dreifingar. g_1 og g_2 eru matstærðir á parametrana γ_1 og γ_2 , sem eru báðir núll fyrir normal dreifingu. g_1 er mælikvarði á útlæg gildi í aðra hvora áttina og er neikvætt g_1 skekkja til vinstri miðað við kúrfu normaldreifingar en jákvætt g_1 er skekkja til hægri. Mjög lítil gildi breytunnar gefa g_1 neikvætt formerki og mjög stór gefa því jákvætt formerki. g_2 mælir flatneskju dreifingar þ.e. segir til um hvernig gildin raðast innan kúrfunnar. Ef öll gildi eru jafn algeng (platykurtosis eða flöt dreifing) fær g_2 neikvætt formerki en ef flest leita í ákveðinn punkt (leptokurtosis eða oddmjó dreifing) fær það jákvætt formerki (SOKAL og ROHLF, 1995).

Til að kanna hvort sá breytileiki sem sést í lengdarbreytileika eggja sömu móður (Mynd 2) væri aðeins vegna aðferðarfræðilegra þátta og mismunandi aðstæðna í keyrslum, voru mismunandi keyrslur þriggja mæðra og eggja þeirra í þeim keyrslum skoðaðar og bornar saman.

F -próf var gert í þessum tilgangi. Breyting á dreifni milli keyrslna (Δs^2) er mat á þann breytileika sem verður vegna tilraunaaðstæðna og því á skekkju í tilrauninni. Þar sem dreifnin er mælikvarði okkar á tíðnidreifingu lengdarendurtekninganna, dreifnin er í raun lýsing á tíðnidreifingu, nota ég hana við gerð F -prófsins. Ég reikna því meðaldreifni dreifnanna hjá eggjum og móður og prófstærðirnar eru

$$F_s = \frac{\overline{s^2} s_E^2}{s^2 s_M^2}$$

þar sem M stendur fyrir mismunandi keyrslur móður og E fyrir egg þeirrar móður í þeim keyrslum. F_s er borið saman við töflugildi úr F -dreifingu fyrir viðkomandi frítölupar (ROHLF og SOKAL, 1995). Með þessu verður spurningunni hvort breytileikinn liggja í aðferðinni svarað.



Mynd 2: Dæmi um rafdráttar niðurstöður úr einu hrogni hvarrar móður fyrir sig. A: hrogn móðurI, B: hrogn móðurII, C: hrogn móðurVII, D: hrogn móðurVIII, E: hrogn móðurIX, F: hrogn móðurX. Glögglega má sjá mismunandi magn (flatarmál undir kúrfum) og fjölda endurtekninga. Græni punkturinn táknar 300 basapara stærðarviðmið.

Niðurstöður

Tilraunaskykkja

Tvær keyrslur hvernar þeirra þriggja mæðra, sem voru keyrðar oftast en einu sinni, voru notaðar við athugun á tilraunaskykkju. Þetta voru móðirVII, móðirVIII og móðirIX (Tafla 4). Munur á meðalstærðum endurtekninganna milli keyrslna mismunandi mæðra var mun meiri en milli eggja einnar móður í mismunandi keyrslum. Dreifni eggja var meiri en dreifni mæðra og s var hærra hjá eggjunum og breytileiki því meiri meðal þeirra. Af g_1 sést að dreifing í öllum keyrslum mæðra var skekkt til vinstri en í helmingi keyrslna eggja. Skekkjan var því meiri að meðaltali hjá mæðrum en eggjum. g_2 gefur til kynna að tíðnidreifingin var öllu breiðari meðal eggja en mæðra.

Á Mynd 3 sést að dreifing eggjanna var ekki eins milli keyrslna. Þó var dreifing eggja sömu móður líkari milli keyrslna en dreifing eggja mismunandi mæðra. Keyrslur móðurIX og eggja hennar eru töluvert ólíkar. Í fyrri keyrslunni lágu 75% gilda eggja neðan við efri 75% úr dreifingu eggja í seinni keyrslunni (Mynd 3). Öll dreifing í seinni keyrslunni var þó innan þess svæðis sem fyrri keyrslan nær yfir. Af mynd 4 sést að dreifing meðal eggja innan keyrslna var meiri en milli keyrslna. Keyrslur dreifingar hjá eggjum móðurIX gáfu þó annað í skyn en sjá má að egg móðurIX í keyrslu tvö voru lang fæst.

Tafla 4: Útreikningar á endurteknum keyrslum þriggja mæðra og afkvæma þeirra í viðkomandi keyrslum. Meðalstærð \bar{Y} , dreifni s^2 , staðalfrávik s , skekkja g_1 , ferilris g_2 , breytileikastuðull CV .

Móðir	Keyrsla	\bar{Y}	s^2	s	g_1	g_2	CV
MóðirVII	1	129.68	1440.44	37.95	-0.01	0.08	0.29
MóðirVII	2	125.97	1338.97	36.59	-0.25	-0.39	0.29
MóðirVIII	1	118.82	1716.28	41.43	-0.16	-0.24	0.35

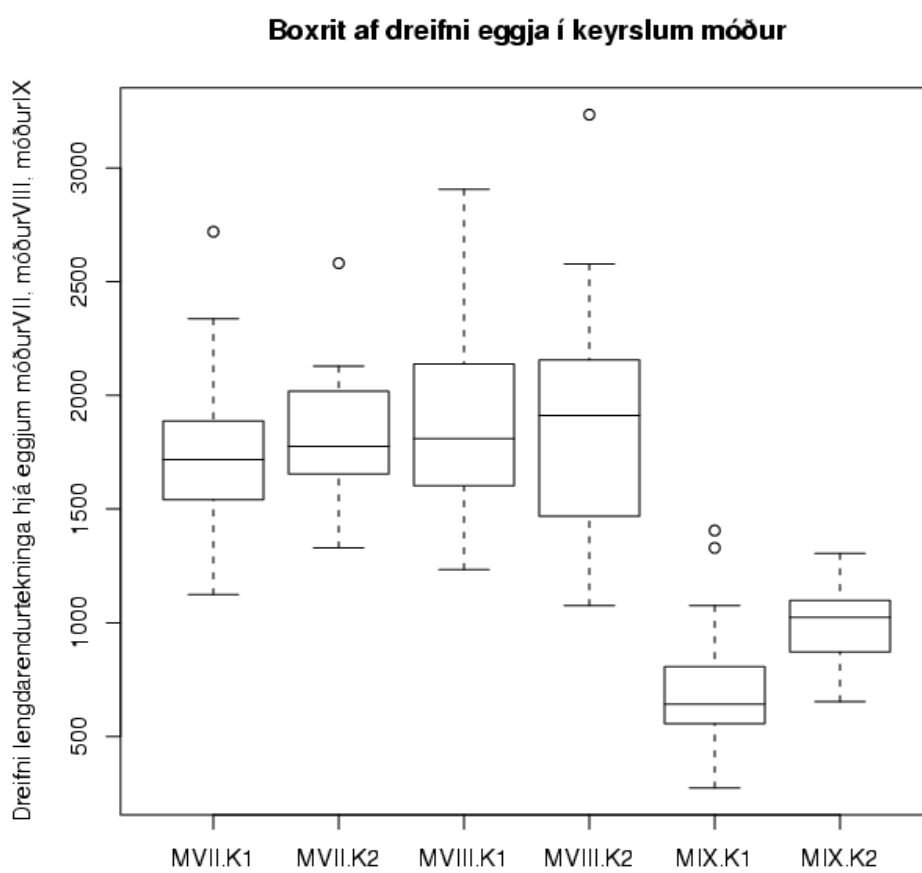
MóðirVIII	2	123.26	1576.33	39.70	-0.26	0.11	0.32
MóðirIX	1	104.97	727.73	26.98	-0.62	0.22	0.26
MóðirIX	2	98.83	1056.11	32.50	-0.07	-0.10	0.33
Meðaltal		116.92	1309.31	35.86	-0.23	-0.05	0.31
Egg	Keyrsla	\bar{Y}	s^2	s	g_1	g_2	CV
EggVII	1	127.96	1924.05	43.86	0.00	0.21	0.34
EggVII	2	125.79	1845.13	42.96	-0.13	-0.12	0.34
EggVIII	1	116.17	2074.43	45.55	0.40	0.43	0.39
EggVIII	2	116.08	2178.25	46.67	0.35	0.11	0.40
EggIX	1	103.08	780.06	27.93	-0.63	0.03	0.27
EggIX	2	103.92	1084.31	32.93	-0.06	0.06	0.32
Meðaltal		115.50	1647.71	39.98	-0.01	0.12	0.34
Meðaltal alls		116.21	1478.51	37.92	-0.12	0.03	0.33

***F*-próf**

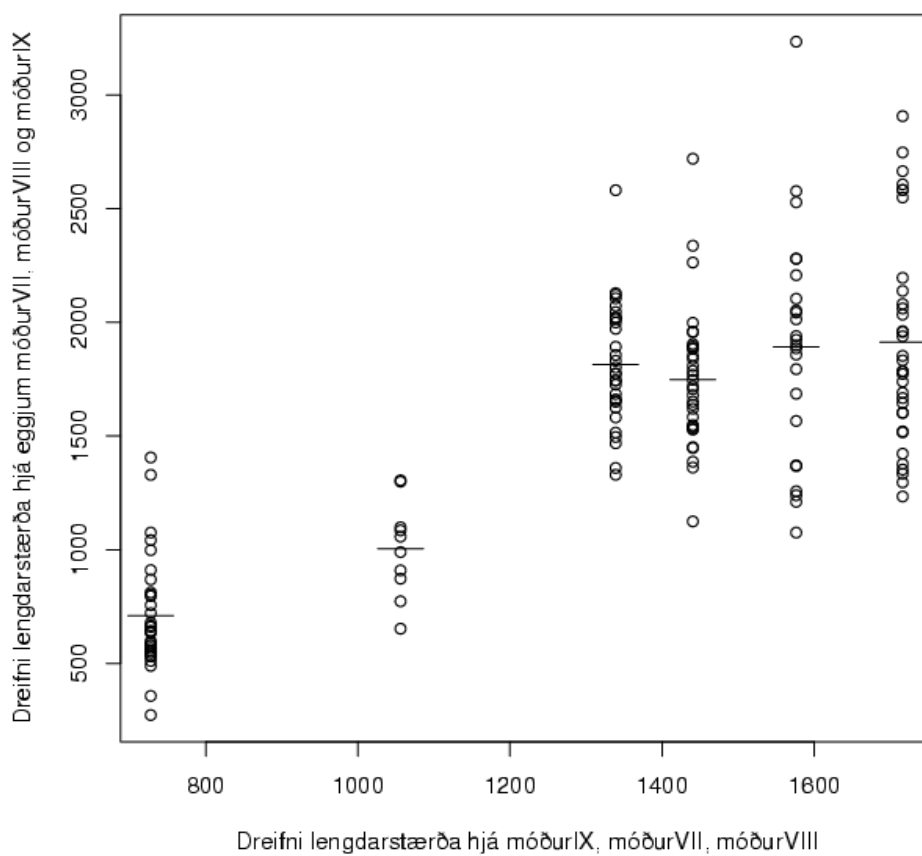
Niðurstöður úr *F*-prófi á meðaldreifni úr endurteknum keyrslum móður á móti meðaldreifni á eggjum þeirrar móður, miðað við 5% marktæknistig voru að ekki væri um marktækan mun að ræða. F_S var langt innan við töflugildi sbr. Tafla 5. Breytileikinn sem fannst liggur því ekki í aðferðinni og mismunandi keyrslur útskýra ekki tíðnidreifinguna sem fannst milli mæðra og milli eggja mismunandi mæðra.

Tafla 5: Dreifni og *F* próf

Hópur	$s_{s^2}^2$	df	F_S	Töflugildi
MóðirVII	5148.08	1	15.91	252
EggVII	81922.77	63	15.91	252
MóðirVIII	9793.00	1	23.09	252
EggVIII	226116.98	57	23.09	252
MóðirIX	53916.71	1	1.35	252
EggIX	73053.25	41	1.35	252



Mynd 3: Boxrit yfir dreifni meðal eggja í mismunandi keyrslum sömu móður.



Mynd 4: Rit yfir dreifni meðal eggja úr mismunandi keyrslum móður á móti dreifni móðurinnar úr sömu keyrslum. Lárétt strik tákna meðaltal dreifingar. Tvær keyrslur hverrar móður. Mæðurnar eru móðirIX, móðirVII og móðirVIII frá vinstri til hægri.

MóðirII og egg

Meðalstærð endurtekninga var lægst hjá móðurII eða 96.27 bp en meðalstærð endurtekninga hjá eggjum hennar var nokkuð hærri eða 119.18 bp (Tafla 6). Meðalendurtekningarfjöldi mtDNA hjá móðurII var því 2.40 endurtekningar en 2.98 hjá eggjunum eða að meðaltali rúmlega hálfri endurtekningu stærri (Tafla 6, Tafla 8, Mynd 5 og Mynd 7). Mynd 9 A sýnir tíðnidreifingu endurtekninganna hjá eggjunum og meðaltal þeirra, táknað með heilli línu. Þrjár endurtekningar voru algengastar hjá eggjum þessarar móður en meðaltal móðurinnar, brotalína, var mun lægra eða sem nemur hálfri endurtekningu. Á Mynd 7 sést að meðalstærðir endurtekninga eggjanna voru öll yfir jafnstöðulínu meðalstærða mæðra. Enda voru meðalstærðir eggja í öllum tilvikum stærri en móðurII (Tafla 8) sem sést vel á boxritinu á Mynd 5, MII.

Meðal eggjanna fundust mtDNA með sex endurtekningar (240 bp) en aðeins fjórar endurtekningar fundust mest hjá móðurII (160 bp; Tafla 7).

Dreifni lengdarendurtekninganna var miklu meiri meðal eggjanna en móðurinnar enda mismunurinn stór jákvæð tala (Tafla 6). Dreifni eggjanna var ekki á stóru bili (Mynd 6) og dreifni allra eggja var yfir jafnstöðulínu dreifni mæðranna (Mynd 8).

Staðalfrávikid var miklu herra hjá eggjum en móðurII (Tafla 6 og Tafla 8) og var því mun meiri breytileiki meðal eggjanna. CV var herra hjá eggjunum og var í samræmi við eggin í heild meðan CV móðurII var ekki nema 28%.

Fyrir eggII var g_1 aðeins 0.01 og var dreifing þeirra því nærri normaldreifinu að því leyti. g_2 hins vegar var nokkuð lág eða -0.30 að meðaltali. Dreifingin var því nokkuð flöt (Tafla 8). Þetta sést líka vel í boxriti á Mynd 6, MII.

Tafla 6: Meðaltal og dreifni mæðra og eggja hverrar móður. Meðalstærð \bar{Y} , dreifni s^2 , staðalfrávik s , breytileikastuðull CV , mismunur dreifni $s_E^2 - s_M^2$.

Mæður	\bar{Y}_M	s_M^2	s_M	CV_M	\bar{Y}_E	s_E^2	CV_E	$s_E^2 - s_M^2$
MóðirII	96.27	745.46	27.30	0.28	119.18	1787.83	0.36	1042.37
MóðirIX	100.91	953.56	30.88	0.31	102.25	779.49	0.27	-174.07
MóðirVIII	120.98	1653.27	40.66	0.34	114.92	1903.74	0.38	250.48
MóðirVII	128.49	1410.94	37.56	0.29	126.16	1779.83	0.33	368.89
MóðirI	166.10	3346.65	57.85	0.35	155.75	3289.35	0.37	-57.31
MóðirX	179.56	6164.34	78.51	0.44	166.20	7296.74	0.51	1132.40

Meðaltöl	132.05	2379.04	149.50	0.33	130.63	2806.16	0.37	427.1267
----------	--------	---------	--------	------	--------	---------	------	----------

Tafla 7: Endurtekningar í mtDNA. Stærð mtDNA sem fundust í umfrymi mæðra og eggja.

Hópur	40	80	120	160	200	240	280	320	360	400	440
MóðirI	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
EggI	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
MóðirII	x	x	x	x							
EggII	x	x	x	x	x	x					
MóðirVII	x	x	x	x	x	x	x				
EggVII	x	x	x	x	x	x	x	x			
MóðirVIII	x	x	x	x	x	x					
EggVIII	x	x	x	x	x	x	x	x			
MóðirIX	x	x	x	x	x						
EggIX	x	x	x	x	x	x					
MóðirX	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
EggX	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	

MóðirIX og egg

Meðalstærð endurtekninga hjá móðirIX var 100.91 bp og meðalstærð endurtekninga hjá eggjum hennar var nánast það sama eða 102.25 bp (Tafla 6). Meðalendurtekningarfjöldi mtDNA hjá móðirIX er því 2.52 endurtekningar en 2.56 hjá eggjunum (Tafla 6 og Tafla 9, Mynd 5 og Mynd 7). Mynd 9 B sýnir tíðnidreifingu endurtekninganna hjá eggjunum og meðaltal þeirra, (heil lína) og meðaltal móðurinnar (brotalína). Tíðnidreifingin var að meðaltali mjög svipuð hjá þessari móður og eggjum hennar. Þó má lesa af Mynd 7 að flestöll meðaltöl stærða eggja lágu ofan við meðalstærð endurtekninga móður. Á Mynd 5 sjást útgildin vel sem teygja á meðaltali eggjanna.

Í móðirIX fundust mtDNA með fimm endurtekningum (200 bp) og meðal eggjanna fundust mtDNA með sex endurtekningum (240 bp; Tafla 7).

Dreifni lengdarendurtekninganna var meiri hjá móður en eggjum í þessu tilviki og var mismunur dreifinnar því neikvæður (Tafla 6 og Tafla 9). Dreifni eggjanna lá að mestu

leyti undir dreifnigildi móður (Mynd 8).

Staðalfrávik, s , var hærra hjá móður en eggjum og breytileiki var því meiri hjá móðurinni en eggjunum í þessu tilviki. CV var einnig hærri hjá móður en eggjum (Tafla 6 og Tafla 9).

Dreifing hjá eggjunum var skekkt til vinstri, g_1 neikvætt, og gildin lágu á frekar þröngu bili eða oddmjó dreifing eins og jákvætt gildi á g_2 benti til (Tafla 9). Á boxritinu Mynd 6, MIX, sést þessi skekkja dreifingarinnar vel, með miðgildislínuna neðarlega í boxinu.

MóðirVIII og egg

Meðalstærð endurtekninga hjá móðurVIII var 120.98 bp og meðalstærð endurtekninga hjá eggjum hennar var 114.92 bp (Tafla 6). Meðalendurtekningarfjöldi mtDNA hjá móðurVIII er því 3.02 endurtekningar en 2.87 hjá eggjunum (Tafla 6 og Tafla 10, Mynd 5 og Mynd 7). Mynd 9 C sýnir tíðnidreifingu endurtekninganna hjá eggjunum og meðaltal þeirra, (heil lína á mynd) sem voru þrjár endurtekningar en meðaltal móðurinnar var aðeins hærra, (brotalína á mynd). Það sést á Mynd 7 að flestöll meðaltöl stærða eggja lágu neðan við meðalstærð endurtekninga móður.

MóðirVIII hafði að geyma mtDNA með sex endurtekningum (240 bp) en eggin höfðu hins vegar mtDNA með átta endurtekningum (320 bp; Tafla 7).

Dreifni lengdarendurtekninganna var meiri hjá eggjum en móður og mismunurinn var því jákvæður (Tafla 6). Dreifni lengdarstærða eggjanna var tíðust í kringum dreifni móðurinnar eða jafnstöðulínu dreifni mæðranna (Mynd 8).

Staðalfrávik, s , var aðeins hærra hjá eggjum en móður en munurinn var ekki mikill. Breytileikastuðullinn, CV , var sömuleiðis heldur hærri hjá eggjunum (Tafla 6 og Tafla 10).

Dreifing eggjanna var aðeins skekkt til hægri, jákvætt gildi á g_1 , og stærðarendurtekningarnar leita í ákveðinn punkt ef marka má jákvætt gildi á g_2 . Dreifingin var því oddmjó (Tafla 10). Af boxritinu á Mynd 6, MVIII, má lesa þessa sömu skekkju og sjást útgildin sem henni valda vel þar.

MóðirVII og egg

Meðalstærð endurtekninga hjá móðurVII var 128.49 bp og meðalstærð endurtekninga hjá eggjum hennar var áþekkt eða 126.16 bp (Tafla 6). Meðalendurtekningarfjöldi mtDNA hjá móðurVII var því 3.21 endurtekningar en 3.15 hjá eggjunum (Tafla 6 og Tafla 11, Mynd 5

og Mynd 7). Mynd 9 D sýnir tíðnidreifingu endurtekninganna hjá eggjunum. Meðaltal þeirra, heil lína, sem og meðaltal móðurVII, brotalína, voru rétt rúmlega þrjár endurtekningar og var tíðnidreifingin mjög svipuð að meðaltali hjá móður og eggjum í þessu tilviki. Mynd 7 sýnir þetta vel þar sem meginþorri meðaltalanna er í kringum viðmiðunarlínuna fyrir jafnstöðu. Á Mynd 5 kemur jöfn dreifing meðalstærða skýrt fram þar sem miðgildislínan var í miðju boxinu.

Átta endurtekningar fundust hjá eggjumVII (320 bp) en sjö hjá móðurinni (280 bp; Tafla 7).

Dreifni lengdarendurtekninganna var meiri hjá eggjum en móður og mismunur þeirra var því jákvæð tala (dálkur átta Tafla 6). Á Mynd 8 sést að dreifni eggjanna er að meginþunga ofan jafnstöðulínu mæðra og því ofan dreifnigildis móðurVII.

Staðalfrávikid, s , var heldur hærra hjá eggjum en móður svo breytileikinn var meiri meðal eggjanna. Hlutfall þess af meðaltali var einnig heldur hærra hjá eggjum en móður (CV , Tafla 6 og Tafla 11).

Dreifing meðal eggja var svolítið skekkt til vinstri með neikvætt g_1 gildi og kúrfan var einnig aðeins flöt með neikvætt g_2 gildi (Tafla 11). Þetta sama má lesa úr boxritinu (Mynd 6, MVII), þar sem útlæg gildi sjást vel ofan við boxið.

MóðirI og egg

Meðalstærð endurtekninga var næststærst hjá móðurI eða 166.10 bp en meðalstærð endurtekninga hjá eggjum hennar var ívið lægri eða 155.75 bp (Tafla 6). Meðalendurtekningarfjöldinn var því 4.15 endurtekningar í hverju mtDNA hjá móðurinni en 3.89 meðal eggja hennar (Tafla 6 og Tafla 12, Mynd 5, Mynd 7). Mynd 9 E sýnir vel tíðnidreifingu endurtekninganna meðal eggjanna. Fjórar endurtekningar voru algengastar en meðaltal eggjanna (heil lína á mynd) var þó aðeins minna en meðaltal stærðar endurtekninga hjá móður (brotalína á mynd).

Á Mynd 7 sést að meðalstærðir einstakra eggja voru að mestu undir jafnstöðulínu meðalstærða móður. Það er í samræmi við það að meðalstærðirnar voru minni hjá eggjunum en móðurinni. Mynd 5 sýnir dreifingu meðalstærðanna vel og sést þar að miðgildi dreifingar (miðlína boxins sem inniheldur 50% gildanna) var ekki alveg í miðjunni heldur var meginhluti dreifingarinnar neðan við hana (Mynd 5, MI).

Á Töflu 7 sést að meðal eggja fundust mtDNA með allt upp í tíu endurtekningar (400 bp). Þær fundust ekki hjá móðurI. Stærstu mtDNA hjá móðurI höfðu níu endurtekningar eða voru 360 bp að lengd.

Dreifni lengdarendurtekninganna var heldur meiri hjá móðurinni en eggjunum enda fékkst neikvæð tala út úr mismun á dreifni móður og afkvæma í dálk átta (Tafla 6, Mynd 6 og Mynd 8). Dreifni ákveðinna einstaklinga var þó meiri hjá einstaka eggjum en hjá móður. Þannig höfðu t.d. A701, A710 og A723 (Tafla 12) talsvert meiri dreifni en móðirin enda hér aðeins verið rätt um meðaltal dreifni og stærðar. Breytileikinn var svipaður að meðaltali hjá eggjum og móður, sbr. *s*, en breytileikinn milli eggja var þó nokkur. Fyrir þessa móður og egg hennar var *CV* hlutfallið mjög svipað eða 35% hjá móður og 37% að meðaltali hjá eggjunum. Þetta var nærri því það sama og að meðaltali yfir egg allra mæðranna samanlagt (Tafla 6).

Fyrir eggI var g_1 neikvæð tala sem gefur til kynna skekkju til vinstri og einhver lítil útlæg gildi. Fyrir eggI var g_2 aðeins -0.01 og röðuðust gildin innan dreifingarinnar því sem næst líkt og í normaldreifingu (Tafla 6). Sambærilega vitneskju má lesa út úr boxritum þar sem útlæg gildi sjást vel og hægt er að lesa út hvernig hlutföll gilda liggja. Með því að skoða Mynd 6 sést þessi dreifing vel. Dreifnin var nokkuð jöfn, miðgildislínan í boxritinu var nokkurn vegin í miðju boxinu en þó voru nokkuð fleiri lítil gildi sem gefa g_1 því mínusgildi. Þetta sést einnig á mynd 8 þar sem heldur færri gildi eru fyrir ofan línu en fyrir neðan hana.

MóðirX og egg

Meðalstærð endurtekninga hjá móðurX var 179.56 bp og meðalstærð endurtekninga hjá eggjum hennar var 166.20 bp (Tafla 6). Meðalendurtekningarfjöldi mtDNA hjá móðurX var því 4.49 endurtekningar en 4.16 hjá eggjunum (Tafla 6 og Tafla 13, Mynd 5 og Mynd 7). Mynd 9 F sýnir tíðnidreifingu endurtekninganna hjá eggjunum ásamt meðaltali þeirra (heil lína) og móðurrinnar (brotalína). Tíðust voru mtDNA með fjórar endurtekningar en meðaltal móður var aðeins hærra en eggjanna. Á Mynd 7 sést að flest meðaltöl eggjanna voru undir meðaltalslínu móður. Á Mynd 5 og Mynd 9F sést vel á hversu stóru bili endurtekningar eggja þessarar móður voru.

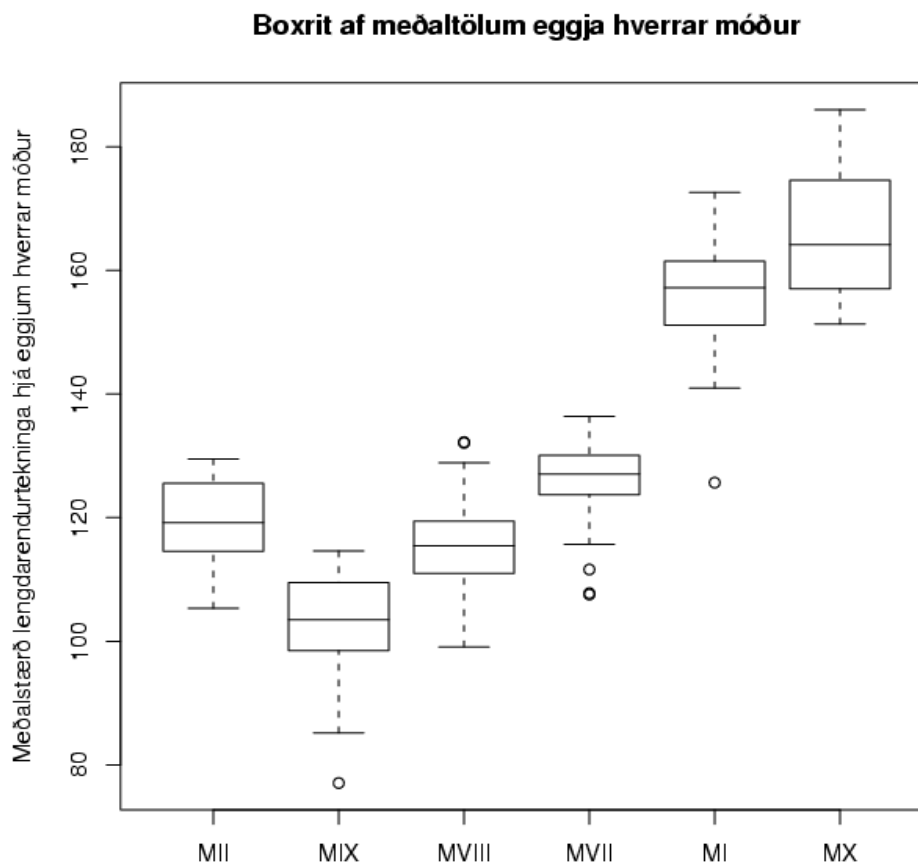
Í móðurX fundust mtDNA með níu endurtekningum (360 bp) og hjá eggjunum fundust mtDNA með tíu endurtekningum (400 bp; Tafla 7).

Dreifni lengdarendurtekninganna var meiri hjá eggjunum en móðurinni og var mismunur dreifninnar nokkuð stór jákvæð tala (Tafla 6 og Tafla 13). Dreifni eggjanna lá að mestu leyti ofan við dreifnigildi móður (Mynd 8).

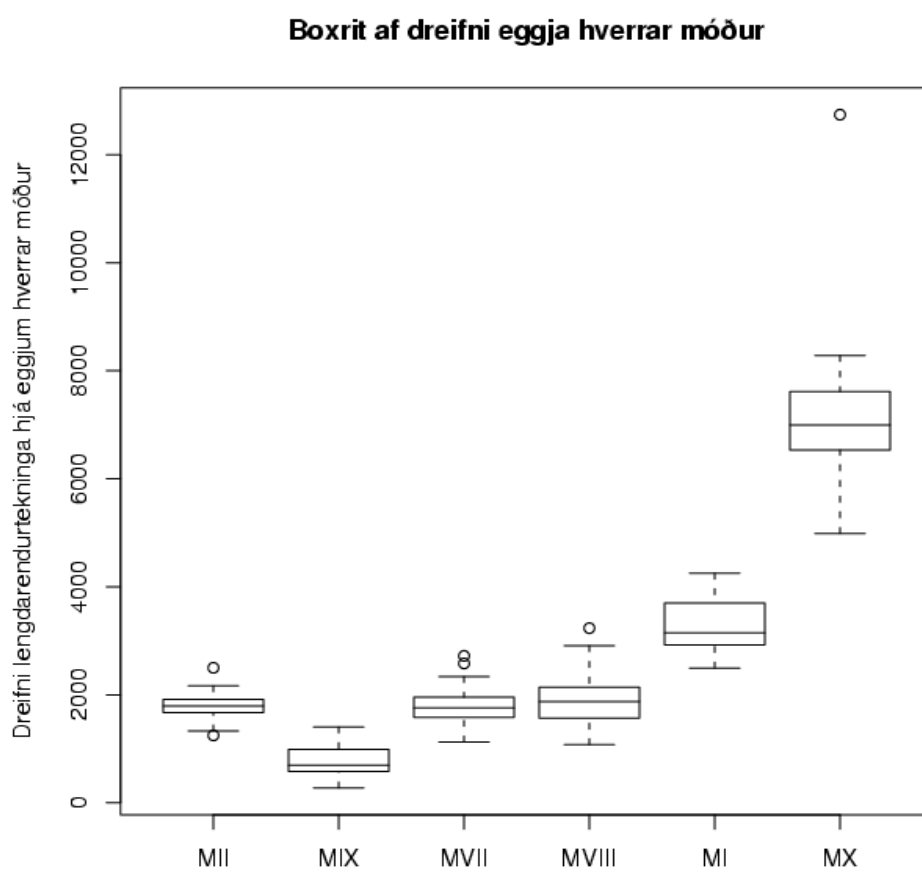
Staðalfrávik, *s*, var hærra hjá eggjum og breytileikinn var því meiri þar en hjá móður. *CV* var heldur hærri hjá eggjunum (Tafla 6 og Tafla 13).

Dreifing eggjanna var skekkt að nokkru til hægri með jákvætt g_1 , og dreifingin var

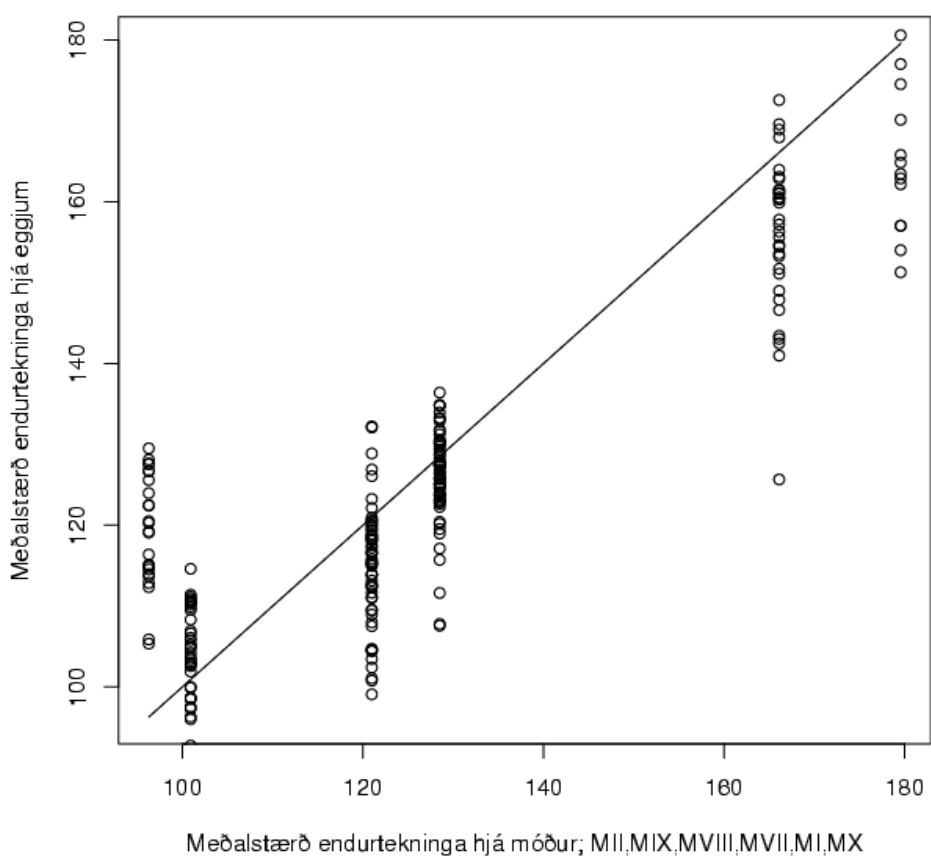
frekar flöt með neikvætt gildi g_2 (Tafla 13). Á boxritinu Mynd 6, MX, sést vel hversu mikil dreifnin er auk hins ýkta útgildis, því boxið er stærst fyrir þessa móður. Þótt hin háa dreifni sé að nokkru til komin vegna þess að þessi móðir var með hæsta dreifni og dreifni er háð skala þá var breytileikastuðullinn CV , sem er ekki háður skala, hæstur meðal móðurX og eggja hennar.



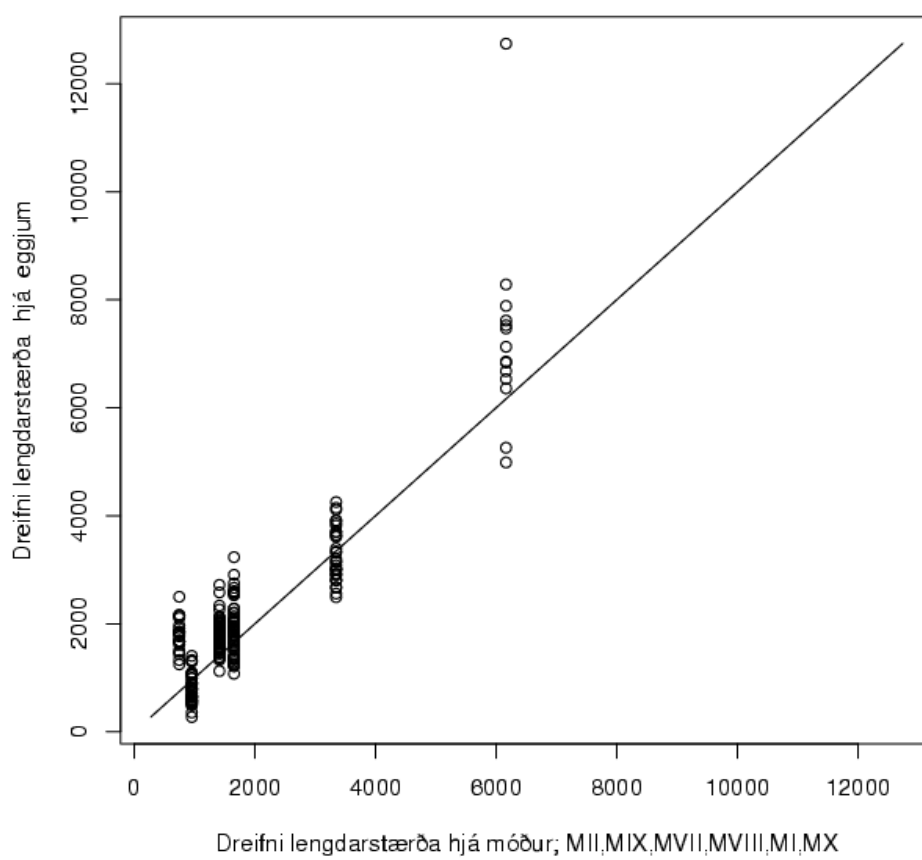
Mynd 5: Boxrit yfir meðalstærð endurtekninga eggja hverrar móður.



Mynd 6: Boxrit yfir dreifni lengdarendurtekninga hjá eggjum hverrar móður.

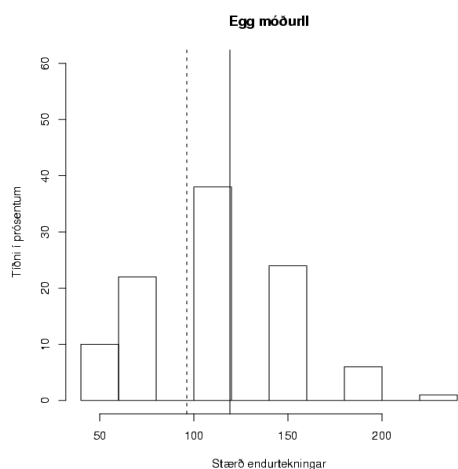


Mynd 7: Rit af meðalstærð endurtekninga hjá eggjum á meðalstærð endurtekninga móðurinnar. Heila línan er viðmiðun sem sýnir jafna meðalstærð hjá eggjum og mæðrum (jafnstöðulína eggja og mæðra).

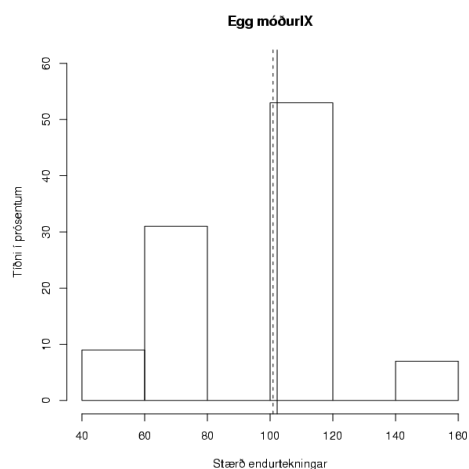


Mynd 8: Rit af dreifni stærða meðal eggja hversrar móður á dreifni stærða hjá móður. Heila línan er viðmiðun sem sýnir jafna dreifni hjá eggjum og mæðrum (jafnstöðulína eggja og mæðra).

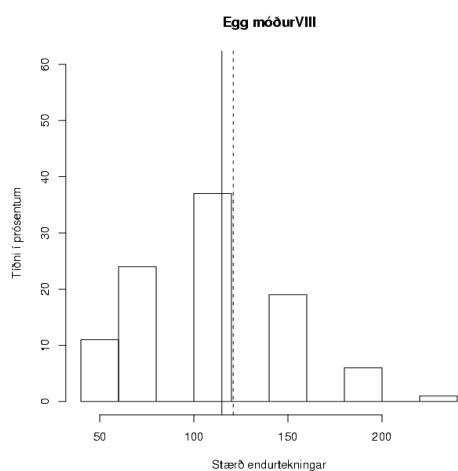
A



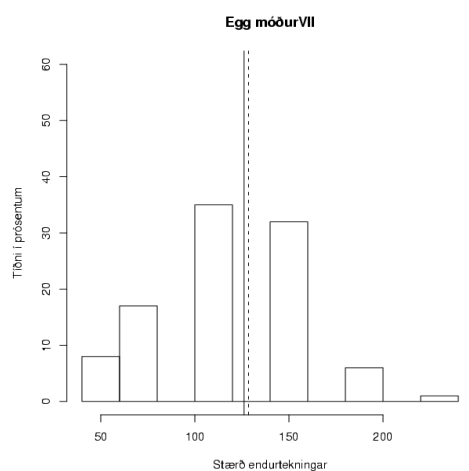
B



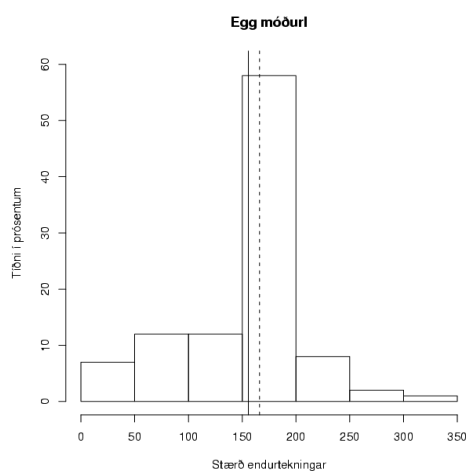
C



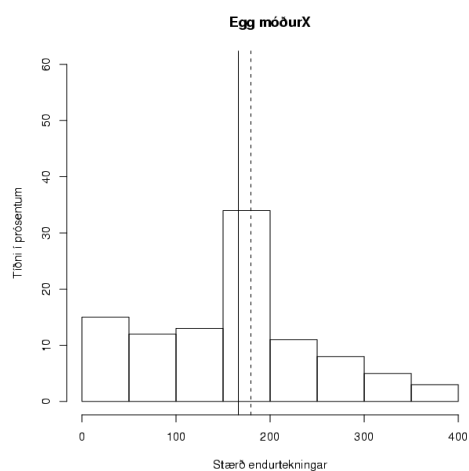
D



E



F



Mynd 9: Stuðlarit fjölda endurtekinga meðal eggja allra mæðra. Brotalínan er meðaltal fjölda endurtekinga hjá móður og heila línan er meðaltal dreifingar eggjanna á myndinni

Umræður

Tilraunaskykkja og F -próf

Ef breytileikinn sem sést væri eingöngu vegna mismunandi tilraunaaðstæðna í keyrslum þá er væntingin sú að eggjinn væri eins og móðirin. Samkvæmt því ætti breytileikinn að liggja í því að einstaklingar væru keyrðir á mismunandi stöðum í geli og í mismunandi keyrslum. Samkvæmt F -prófinu er það ekki raunin. Breytileikinn er raunverulegur og liggur ekki eingöngu í aðferðinni. Breytingar verða og breytileiki myndast við færslu erfðafnisins frá móður til eggja. Tilraunaskykkjan er einhver eins og sást á keyrslum móður IX (Tafla 5) en ekki nægjanlega mikil til að F -prófið væri marktækt.

Lengdarbreytileiki í örtunglagenum, samanburður við D-lykkju

Spurningin, sem hugmyndin var að svara hér, er hvort breyting verði á dreifingu lengdarbreytileikans við flutning erfðafnis frá móður til afkvæmis, þ.e. yfir eina kynslóð. Það er auðséð að svo er. Eins og sjá má á Mynd 7, þá hverfa meðaltöl endurtekninga hjá eggjum að meðaltali. Á myndinni er jafnstöðulína sem gildir ef meðaltöl eggja og móður væru þau sömu. Meðaltöl eggja móður með lágt meðaltal eru stærri en meðaltal móðurinnar en meðaltöl eggja móður með hátt meðaltal eru minni en meðaltal móðurinnar (Mynd 7). Um dreifni gildir hins vegar að egg hvernar móður hafa tilhneigingu til aukningar í dreifni miðað við móðurina. Egg hafa meiri dreifni en mæður, það er meiri breytileiki meðal eggja en mæðra eins og sést á því að dreifni einstakra eggja er oftast ofan við jafnstöðulínu (Mynd 8).

DNA „slippage“ eða DNA tilfærsla í eftirmyndun DNA er samhverft ferli. Að meðaltali er sama fjöldi endurtekninga bætt við og eru fjarlægðar. Talið er að mispörunar viðgerðarkerfið („mismatch repair system“) sem sér um viðgerðir á rangri basapörun, haldi auknum fjölda sem verður vegna tilfærslunnar í skefjum. Þess vegna er talið að einhvers konar val viðhaldi örtunglagenum á ákveðnu stærðarbili (SCHLÖTTERER, 2000).

Örtunglagen hjá gersveppum sýna hins vegar að tilfærslu stökkbreytingar stuttra örtunglagena valda aukningu í endurtekningum meðan lengri endurtekningar hafa sterka tilhneigingu til fækkunar. Sé gert ráð fyrir að stökkbreytingarsviðið breytist eftir fjölda endurtekninga mun lengdardreifingu örtunglagena vera viðhaldið innan ákveðinna stærða án neinna valkrafta (SCHLÖTTERER, 2000).

Sterkar vísbendingar eru um það í örtunglagenum að stökkbreytihraði aukist með auknum fjölda endurtekninga. Einnig virðist vera sem neikvæð tengsl séu milli lengdar endurtekninganna og stökkbreytihraða vegna tilfærslu eða slippage (SCHLÖTTERER, 2000). Það má því ætla að einhver tilhneiging sé í þá átt að halda löngum endurtekningum í skefjum en auka stuttar. Ef þessar forsendur eiga líka við um lengdarendurtekningar í D-lykkju þá eru niðurstöður rannsóknarinnar alveg í samræmi við þær.

Fjöldi endurtekninga

Líkt og ÁRNASON og RAND (1992) komust að þá eru allar mæður í þessari rannsókn og egg þeirra mislitna. Þetta er ólíkt því sem gerist í styrjum (LUDWIG og fleiri, 2000; BUROKER og fleiri, 1990), þar sem það er misjafnt milli styrjutegunda hversu algengt mislitnið er (LUDWIG og fleiri, 2000). Þrjár endurtekningar eru algengastar í þeim styrjueinstaklingum sem eru mislitna. Gögnin hér sýna að allir einstaklingar höfðu mtDNA með einni og upp í fjórar endurtekningar í umfrymi sínu (Tafla 7). Í langflestum tilfellum eru þeir einnig með fimm og sex endurtekningar. Þetta er öllu meiri fjöldi en þekkist hjá öðrum tegundum. Þetta er líka enn meiri fjölbrigðni en ÁRNASON og RAND (1992) fundu í sinni úttekt á þorskinum. Enginn einstaklingur í þeirri rannsókn fannst með einni endurtekningu en allir hér. Fjöldi endurtekninga hjá eggjum í þessari rannsókn virðist fylgja fjölda endurtekninga hjá móðurinni í flestum tilfellum (Mynd 9, Mynd 12, Tafla 6). Það skal bent á í þessu samhengi að eggin eru enn ófrjóvguð og ekki orðin að einstaklingum. Einhvers konar valkraftar eru að verki þegar kemur að frjóvgun og í því hvaða egg frjóvgast og verða að fullveðja einstaklingum og hver ekki, sem og í mismunandi dauðdaga þeirra á þroskunartíma. Eins og gögnin bera með sér og sjá má á Mynd 10 og Mynd 11, eru mæðurnar nokkuð frábrugðnar hver annarri en egg hverrar móður er mun líkari öðrum eggjum sömu móður en eggjum annarra mæðra eða öðrum mæðrum.

Ef öll eggin frá öllum mæðrum eru tekin saman (Mynd 12 A) sést að meðalfjöldi endurtekninga er 3.31 endurtekning hjá eggjum en 3.26 hjá mæðrum og algengastar eru fjórar endurtekningar. Samkvæmt ÁRNASON og RAND (1992) voru þrjár endurtekningar algengastar sem er þá sambærilegt við mæður í þessari rannsókn.

Dreifnimunur og val

Í þorskinum, lítur því út fyrir að allir einstaklingar séu mislitna eins og kemur fram hér og hjá ÁRNASON og RAND (1992). mtDNA með einni endurtekningu fannst í öllum tilvikum. Það gefur til kynna að mtDNA án endurtekninga og án þessara annarsstigsbygginga séu til staðar í hverjum einstaklingi. Þetta er í mótsögn við niðurstöður ÁRNASON og RAND (1992) sem fundu engan einstakling með einni endurtekningu. Hugsanlega hefur fjöldi einstaklinga eitthvað með þetta að gera en í grein sinni notuðu þeir tíu þorska til greininga og hér eru notaðar sex mæður. Það má einnig vera að aðferðin sem hér er beitt sé næmari og ekki hægt að útiloka að mtDNA með einni endurtekningu hafi verið til staðar í þorskunum hjá ÁRNASON og RAND (1992) en aðeins í það lágrí tíðni að það hafi ekki mælst. Ef Mynd 12 er skoðuð sést að mtDNA með einni endurtekningu eru næstum helmingi algengari hjá eggjum en mæðrum eða rúmlega 5% hjá mæðrum en 10% hjá eggjum. Einnig má sjá að tvær endurtekningar eru mun algengari hjá mæðrum en eggjum eða 25% og 20% í sömu röð. Þetta er sami munur með öfugu formerki og munurinn í tíðni einnar endurtekningar. Í heildina, yfir alla einstaklinga, má því segja að tveggja endurtekninga sameindir virðist breytast í einnar endurtekninga sameindir. Þá er ljóst að þrjár og fjórar endurtekningar eru jafn algengar hjá mæðrum en fjórar eru algengari hjá eggjum.

Þetta er birtingarmynd stökkbreytinganna sem eru að verki í kerfinu. DNA tilfærslan sem og mishröð eftirmyndun DNAsins auka á fjölbreytnina með því að breyta dreifninni í lengdarendurtekningunum á þennan hátt. Fjölbreytileikinn er afrakstur stökkbreytinganna sem síðan er brunnur fyrir valið.

Hér er því líklega einnig einhvers konar val að verki. Mæðurnar eru valdar af handahófi úr stofni einstaklinga sem hafa farið í gegnum val. Eggjarnar eru hins vegar óreynd í lífsins ólgusjó að þessu leiti. En eggjarnar verða að mæðrum við eðlilegar aðstæður. Þess vegna má líta á mæður sem birtingu ástands kerfisins eftir val. Búið er að vinna úr breytileikanum sem stökkbreytiferlin mynduðu. Dreifni endurtekninga er meiri meðal ófrjóvgaðra eggja en hjá fullorðnum einstaklingum. Mikil gróska virðist vera í myndun endurtekninga í eggjunum og virðist tilhneiging vera til myndunar mtDNA af ýmsum lengdum. Ef marka má gögnin er sem eitthvert afl vinni gegn þessum fjölbreytileika og reynt sé að halda stærðum DNA bótanna á ákveðnu stærðarbili þegar í fullþroska einstakling er komið. Eitthvert val vinnur gegn fjölbrigðninni svo endurtekningarnar safnist ekki upp í of miklum mæli. Ef ekkert slíkt val væri til staðar væri ekkert því til fyrirstöðu að endurtekningunum fjölgaði óendanlega og gefur auga leið að það gengi ekki upp. Einhvern tímann fer fjöldi þeirra að vera skaðlegur lífverunni.

Fækkun þeirra eða fjölgun er bein vísbending um stökkbreytingar við flutning erfðaefnis yfir eina kynslóð

Sú staðreynd að fleiri endurtekningar finnast hjá eggjum en fundust hjá móður (Tafla 7) sýnir að DNA tilfærsla er líklega að verki. Annars væru öll eggin eins og móðirin. Þetta er staðfesting á stökkbreytiferlinu og að tilfærslan sem verði hlaupi á stærðum endurtekninganna (40 bp) er ennfrekar sönnun þess að það er eitthvað við þær í heild sem veldur misþöruninni. Þ.e.a.s. að mislitnið sem sést hleypur á 40 bp hlýtur að þýða að tilfærslan sem verður er sú að endurtekning bætist við eða er skilin eftir í eftirmynduninni.

Að einhverju leyti er sú aukning í dreifni sem sést hjá eggjum til komin vegna þessa en einnig er sá möguleiki fyrir hendi að ákveðin stærð DNA búta eftirmyndist hraðar en aðrar. Mishröð eftirmyndun búтана getur vissulega valdið ólíkri tíðnidreifingu hjá eggjum miðað við móður. Gegnumgangandi er sama munstur að sjá hjá öllum eggjum en það er að mtDNA bútur af einni ákveðinni stærð er algengastur. Búturnir, sem hafa fleiri endurtekningar en bútar af þeirri stærð, eru miklu færri en þeir sem höfðu færri endurtekningar en þeir algengustu. Hvaða stærðarbútur er hér um að ræða er þó mismunandi hjá eggjum mismunandi mæðra. Ef þessu veldur aðeins mishröð eftirmyndun væri ekki ólíklegt að minni búturnir næðu meiri tíðni, einfaldlega vegna þess að þeir eru minni, en hér sést tröppugangur upp að þeim algengasta og svo mikið hrap í tíðni eftir hann. Það er því líklegt að annarsstigsbyggingin sem endurtekningarnar mynda (ÁRNASON og RAND, 1992; LUDWIG og fleiri, 2000) sé stöðugri með ákveðinn fjölda endurtekninga og að slík bygging gefi þeim DNA bútum forskot á einhvern hátt. Að auki getur DNA tilfærsla valdið því að eftirmyndun á mtDNA með tveimur endurtekningum myndi mtDNA með einni eða þremur endurtekningum, jafnvel fleirum.

Það er erfitt að greina á milli þessaraástaðna fyrir tíðnidreifingarmuninum og dreifninni sem finnst í honum. Líklegast að um sambland beggja ástaðna geti verið að ræða. Allar stökkbreytingar sem verða, orsaka að minnsta kosti tímabundið mislitni. Sá lengdarbreytileiki sem hér um ræðir hefur orðið til vegna stökkbreytinga í þessum endurteknu röðum og er erfitt að segja til um hvort þær eru á leið út eða ekki.

Þorsstofninn

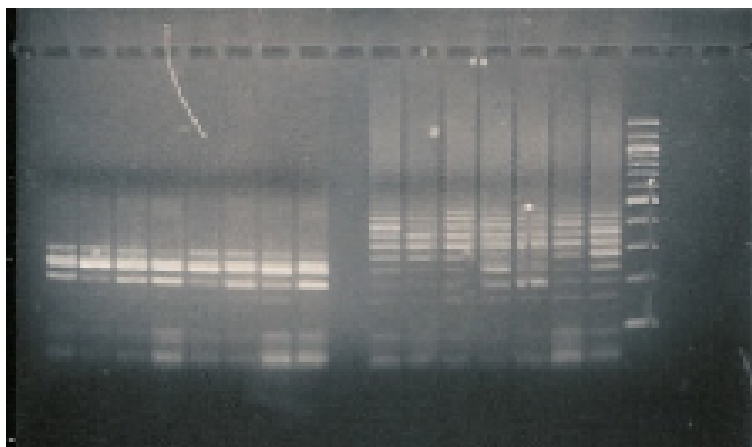
Samkvæmt útreikningum sem ÁRNASON og RAND (1992) gerðu er mestur fjölbreytileikinn í lengdarbreytileika innan einstaklinga. Breytileikinn sem verður til við stökkbreytingu í lengdarendurtekningunum tapast ekki með því breytileikatapi sem tilviljanakennt flókt getur valdið við frumuskiptingar. Gögnin hér eru þessu samhljóða en það gæti verið

fróðlegt að vita hvað gerðist í næstu kynslóð. Hvort systuregg þeirra eggja sem hér voru til athugunar hafi myndað egg með öfugu meðaltali miðað við eggjakynslóðina hér og eins hver dreifnin yrði í þeirri kynslóð. Ef verið er að velja fyrir ákveðnu jafnvægi milli kynslóðanna ætti meðaltalið að verða minna og dreifnin minni. Hins vegar er ómögulegt að segja út frá gögnunum hvaða egg yrðu að fullþroska þorski og ekki loku fyrir það skotið að valið beinist að einmitt því. Egg með litla dreifni og lágt meðaltal getur hugsanlega einfaldlega verið lífvænlegra en önnur egg með hærri meðaltal og meiri dreifni.

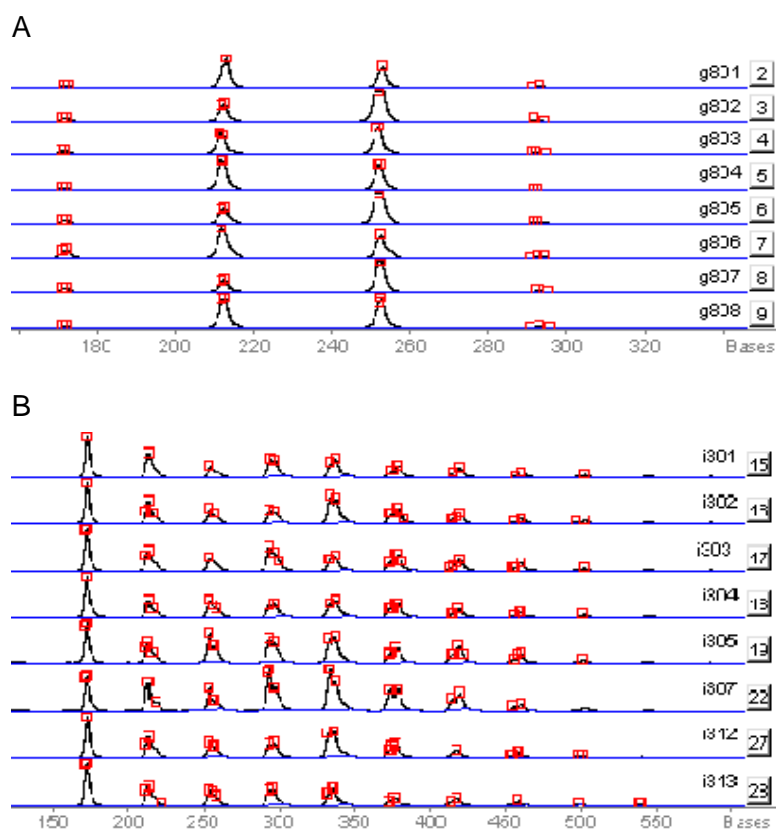
Sýnin sem unnið var með hér eru öll frá Íslandi og sýna svipaða hegðun og þorsksýnin í grein ÁRNASON og RAND (1992) þ.e. að allir einstaklingar séu mislitna og að allir einstaklingar hafi 40 bp endurtekningar. Þar sem mjög breytilegt svæði er til athugunar leggja þeir þá túlkun í fund sinn á samskonar röðum í þorski víðsvegar um Atlantshafið að lítið sé um undirstofna þorsks á svæðinu. Í ljósi þess að hjá mismunandi tegundum styrjufiska (LUDWIG og fleiri, 2000) hafa fundist mislangar endurtekningar en ekki hjá þeim þorski sem kannaður hefur verið er þetta ekki ólíklegt. Niðurstöður úr mínum gögnum styrkja þessa kenningu þar sem engin merki fundust um endurtekningar af annarri stærð en 40 bp. Breytileikinn hjá þorskinum virðist því einkum liggja í fjölda endurtekninga og vera nokkuð mikill þar (Mynd 10 og Mynd 11) en þessar hrygnur, sem þar er lýst, voru teknar á sömu stöð í sýnatöku.

Lokaorð

Í heildina er því ljóst að D-lykkju svæði hvatbera er svæði sem myndar breytileika í mtDNA í umfrymi þorska. Þarna eru að verki kraftar sem mynda breytileika í umfrymisstofni hvers einstaklings sem hefur þá áhrif á breytileika stofnsins í heild. Myndun breytileikans lýtur líklega sömu lögmálum og sá breytileiki sem myndar örtunglagen og sá lengdarbreytileiki sem slík gen geta valdið er sambærilegur við mislitnið sem endurtekningarnar í hvatberanum valda. Það ferli sem kristallast í hegðuninni sem sést hér er vel þekkt og í samræmi við kenningar manna um val og tilurð þess (FUTUYMA, 1998). Stökkbreytiöflin hamast við að mynda nýjar gerðir og auka þar með á breytileikann. Án stökkbreytiaflanna yrðu engar nýjar gerðir og án hreinsandi vals yrðu stökkbreytingarnar líklega of skemmandi. Hann er síðan hráefni fyrir valið sem augljóslega er að verki hér. Jafnvægi þarna á milli er nauðsynlegt til að þróun geti orðið.

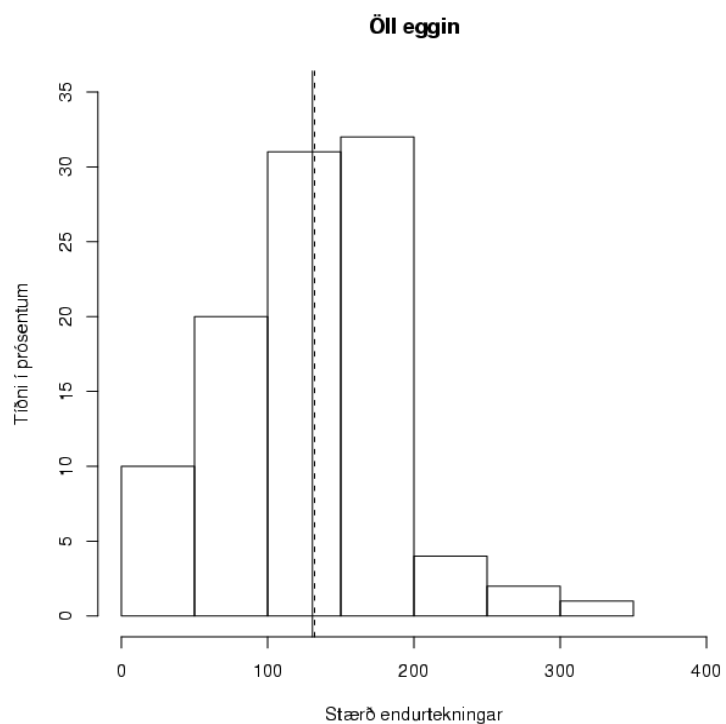


Mynd 10: Dæmi um egg móturIX og móturX. Til vinstri, egg móturIX; g801–g808. Til hægri, egg móturX. Í síðasta dálkinum er 100 bp stærðarviðmið. Mislitni kemur skýrt fram. Mismunandi afkvæmi sömu móður svipar meira saman en afkvæmi mismunandi mæðra. Niðurstöður úr keyrslu í 2% agarósageli.

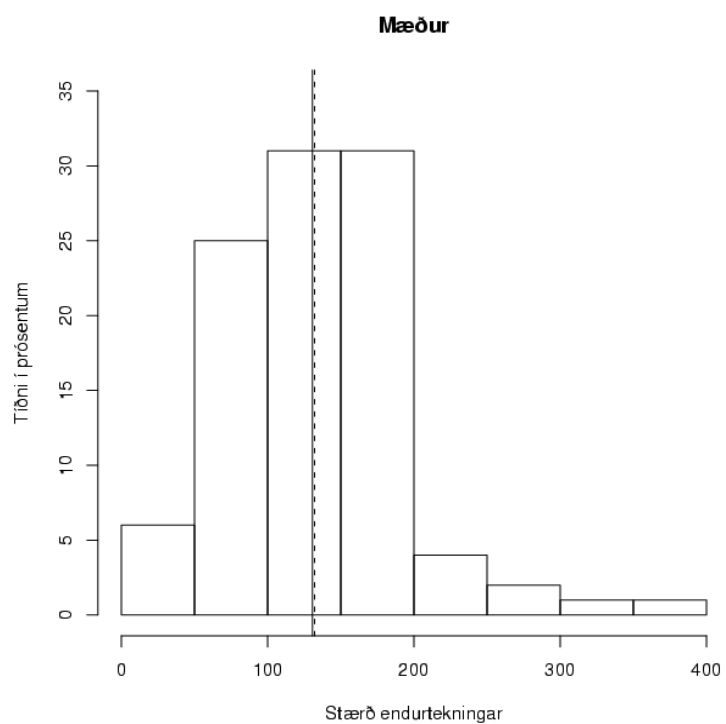


Mynd 11: Dæmi um egg móturIX (efri) og egg móturX (neðri). Mismunandi fjöldi endurtekninga er hjá einstaklingum mismunandi mæðra. Einstaklingar sömu móður eru líkari sín á milli en einstaklingar mismunandi mæðra. Niðurstöður úr ALFexpress rafrætti.

A



B



Mynd 12: A: Stuðlarit yfir fjölda endurtekninga eggja allra mæðra í heild. B: Stuðlarit yfir fjölda endurtekninga allra mæðra í heild.

Töflur

Töflur eggja hverrar móður fyrir sig. Meðalstærð \bar{Y} , dreifni s^2 , breytileikastuðull CV , mismunur dreifni $s_E^2 - s_M^2$, staðalfrávik s , skekkja g_1 og ferilris g_2 .

Tafla 8: Egg móðurII.

EggII	\bar{Y}_E	s_E^2	CV	$s_E^2 - s_M^2$	s	g_1	g_2
B510	114.88	1675.10	0.36	929.64	40.93	0.23	-0.27
B511	120.49	1609.96	0.33	864.50	40.12	0.00	-0.10
B512	114.96	2135.58	0.40	1390.12	46.21	0.10	-0.53
B513	122.49	1667.02	0.33	921.56	40.83	-0.14	0.09
B514	126.72	1914.02	0.35	1168.56	43.75	0.17	-0.10
B515	123.97	1436.63	0.31	691.17	37.90	-0.34	0.18
B516	105.87	2499.72	0.47	1754.26	50.00	-0.01	-0.91
B517	125.58	1683.11	0.33	937.65	41.03	0.00	-0.23
B518	129.51	1849.10	0.33	1103.64	43.00	-0.09	-0.92
B519	114.54	1490.68	0.34	745.22	38.61	0.54	0.40
B520	113.66	1794.40	0.37	1048.94	42.36	0.16	-0.01
B521	128.10	1482.40	0.30	736.94	38.50	-0.32	-0.09
B522	127.54	1247.93	0.28	502.48	35.33	-0.48	0.72
B523	112.85	1970.23	0.39	1224.77	44.39	0.27	-0.79
B525	119.08	2158.10	0.39	1412.64	46.46	0.15	-0.95
B526	119.21	1821.02	0.36	1075.56	42.67	0.12	-0.61
B527	105.34	2165.26	0.44	1419.80	46.53	0.78	-0.06
B529	126.67	1674.97	0.32	929.51	40.93	-0.52	-0.03
B530	116.38	1838.30	0.37	1092.84	42.88	0.19	-0.71
B531	113.94	1851.56	0.38	1106.10	43.03	-0.11	-0.35
B532	120.28	1766.97	0.35	1021.51	42.04	-0.18	-0.49

Tafla 8: (framhald)

EggII	\bar{Y}_E	s_E^2	CV	$s_E^2 - s_M^2$	s	g_1	g_2
B533	115.11	1853.91	0.37	1108.45	43.06	0.11	-0.63
B534	112.33	1328.70	0.32	583.24	36.45	0.04	-0.23
B535	122.42	1670.99	0.33	925.53	40.88	-0.06	-0.64
B536	127.65	2110.06	0.36	1364.60	45.94	-0.30	-0.21
Meðaltöl	119.18	1787.83	0.36	1042.37	42.15	0.01	-0.30

Tafla 9: Egg móðurIX.

EggIX	\bar{Y}_E	s_E^2	CV	$s_E^2 - s_M^2$	s	g_1	g_2
g801	98.65	643.33	0.26	-310.23	25.36	0.32	-0.19
g802	111.40	544.83	0.21	-408.73	23.34	-1.04	1.79
g803	102.90	720.68	0.26	-232.88	26.85	-0.17	-0.15
g804	97.51	556.52	0.24	-397.04	23.59	-0.15	-0.51
g805	110.18	533.56	0.21	-420.00	23.10	-1.17	1.76
g806	99.98	910.36	0.30	-43.20	30.17	-0.49	-0.35
g807	110.44	589.84	0.22	-363.72	24.29	-1.19	1.80
g808	101.90	578.59	0.24	-374.97	24.05	0.14	-0.43
g811	105.76	666.40	0.24	-287.16	25.81	-0.30	0.03
g812	105.01	678.23	0.25	-275.33	26.04	-0.15	-0.12
g813	103.03	756.07	0.27	-197.49	27.50	-0.58	0.02
g814	77.08	272.73	0.21	-680.83	16.51	-0.50	2.51
g815	85.81	1328.95	0.42	375.39	36.45	-0.12	-1.47
g816	108.32	795.81	0.26	-157.75	28.21	-0.11	-0.21
g817	111.12	356.81	0.17	-596.75	18.89	-2.03	3.36
g818	96.00	811.97	0.30	-141.59	28.50	-0.39	-0.50
g819	114.60	554.06	0.21	-399.50	23.54	-0.96	2.22
g821	106.07	868.77	0.28	-84.79	29.47	-1.00	0.46
g822	87.37	1405.37	0.43	451.81	37.49	-0.21	-1.54
g823	103.63	566.89	0.23	-386.67	23.81	-0.28	-0.23
g824	98.50	1042.11	0.33	88.55	32.28	-0.63	-0.61
g825	110.69	488.93	0.20	-464.63	22.11	-1.17	1.88
g826	104.19	659.57	0.25	-293.99	25.68	0.11	-0.31
g827	97.29	997.93	0.32	44.37	31.59	-0.68	-0.68
g828	103.38	510.81	0.22	-442.75	22.60	-0.97	-0.07
g829	96.30	597.27	0.25	-356.29	24.44	-0.51	-0.63
g830	98.59	634.18	0.26	-319.38	25.18	0.18	-0.23
g831	92.73	1075.13	0.35	121.57	32.79	-0.40	-0.99
g832	110.86	578.83	0.22	-374.73	24.06	-0.81	1.22
g833	109.86	530.06	0.21	-423.50	23.02	-1.07	1.50

Tafla 9: (framhald)

EggIX	\bar{Y}_E	s_E^2	CV	$s_E^2 - s_M^2$	s	g_1	g_2
g834	106.92	639.84	0.24	-313.72	25.30	-1.18	1.04
g835	90.99	802.89	0.31	-150.67	28.34	-0.45	-0.94
g837	102.56	1084.87	0.32	131.31	32.94	-0.06	-0.08
g838	110.45	1299.33	0.33	345.77	36.05	0.06	0.24
g839	85.20	1305.26	0.42	351.70	36.13	0.21	-0.75
g840	99.89	1098.48	0.33	144.92	33.14	0.03	-0.20
g841	109.51	909.06	0.28	-44.50	30.15	-0.12	0.39
g842	106.62	872.18	0.28	-81.38	29.53	-0.15	0.38
g843	110.54	989.47	0.28	35.91	31.46	-0.23	0.25
g844	105.22	1057.34	0.31	103.78	32.52	-0.08	0.09
g845	104.82	773.03	0.27	-180.53	27.80	0.04	0.17
g846	102.79	652.42	0.25	-301.14	25.54	-0.05	-0.23
Meðaltöl	102.25	779.49	0.27	-174.07	27.51	-0.44	0.23

Tafla 10: Egg móðurVIII.

EggVIII	\bar{Y}_E	s_E^2	CV	$s_E^2 - s_M^2$	s	g_1	g_2
e802	118.21	2051.74	0.38	398.47	45.30	0.43	0.24
e803	128.87	2527.87	0.39	874.60	50.28	0.31	-0.17
e804	103.44	3234.20	0.55	1580.93	56.87	0.68	0.10
e805	116.46	1685.96	0.35	32.70	41.06	0.34	0.01
e806	120.55	2013.02	0.37	359.75	44.87	0.31	-0.14
e807	113.87	1939.60	0.39	286.33	44.04	0.44	0.11
e808	111.64	1565.99	0.35	-87.28	39.57	0.69	0.38
e809	115.26	2279.84	0.41	626.57	47.75	0.39	0.15
e810	122.12	1898.81	0.36	245.54	43.58	0.40	1.07
e811	132.09	2103.70	0.35	450.44	45.87	0.39	0.38
e812	118.89	2042.99	0.38	389.72	45.20	0.24	-0.25
e814	116.64	1794.04	0.36	140.78	42.36	0.50	0.35
e815	104.55	1885.77	0.42	232.51	43.43	0.00	-0.44
e816	109.54	2207.33	0.43	554.07	46.98	0.56	-0.07
e817	104.71	2576.85	0.48	923.58	50.76	0.25	-0.88
e818	120.94	1371.19	0.31	-282.07	37.03	-0.04	-0.30
e819	118.07	1256.78	0.30	-396.49	35.45	-0.02	0.03
e821	107.51	2279.54	0.44	626.27	47.74	0.04	-0.93
e823	99.08	1857.87	0.44	204.61	43.10	0.20	-0.74
e824	115.81	1239.29	0.30	-413.98	35.20	-0.14	-0.45
e825	101.06	1922.99	0.43	269.72	43.85	0.39	-0.83
e826	113.93	1367.51	0.32	-285.76	36.98	0.25	-0.25
e827	118.68	1075.15	0.28	-578.12	32.79	-0.02	0.40
e829	119.41	1210.49	0.29	-442.78	34.79	-0.15	-0.08
e901	123.25	2582.45	0.41	929.18	50.82	0.55	0.88
e902	120.56	1832.25	0.36	178.98	42.80	0.36	0.46
e903	120.04	2747.18	0.44	1093.92	52.41	0.48	0.39
e904	112.32	1739.18	0.37	85.91	41.70	0.67	0.89
e905	115.34	2906.52	0.47	1253.26	53.91	0.13	-0.58
e906	118.70	2080.64	0.38	427.38	45.61	0.41	0.44

Tafla 10: (framhald)

EggVIII	\bar{Y}_E	s_E^2	CV	$s_E^2 - s_M^2$	s	g_1	g_2
e907	132.22	1938.46	0.33	285.19	44.03	-0.18	0.41
e908	126.88	2195.80	0.37	542.54	46.86	0.27	-0.17
e909	118.32	2138.11	0.39	484.84	46.24	0.36	0.14
e910	113.85	1852.59	0.38	199.32	43.04	0.43	0.34
e911	104.40	2581.68	0.49	928.41	50.81	0.66	0.14
e912	117.21	2061.09	0.39	407.83	45.40	0.46	0.29
e913	115.53	1957.67	0.38	304.40	44.25	0.59	0.61
e914	107.98	1520.12	0.36	-133.15	38.99	0.61	0.29
e915	115.17	1377.17	0.32	-276.09	37.11	0.39	0.46
e916	126.07	2548.91	0.40	895.64	50.49	0.40	0.53
e917	117.53	1785.87	0.36	132.60	42.26	0.59	0.86
e918	111.08	2606.83	0.46	953.56	51.06	0.54	0.15
e919	102.39	2664.85	0.50	1011.58	51.62	0.51	-0.10
e920	116.65	1961.12	0.38	307.85	44.28	0.64	1.07
e921	114.95	1783.12	0.37	129.85	42.23	0.26	-0.65
e922	109.46	2033.74	0.41	380.47	45.10	0.11	-0.02
e923	120.31	1667.03	0.34	13.77	40.83	0.53	2.26
e924	113.15	1602.23	0.35	-51.04	40.03	0.07	0.29
e925	108.94	1352.29	0.34	-300.97	36.77	0.61	0.35
e926	112.65	1601.64	0.36	-51.63	40.02	0.51	0.15
e927	112.40	1422.30	0.34	-230.97	37.71	0.22	1.32
e928	118.36	1515.96	0.33	-137.31	38.94	-0.24	-0.34
e929	112.63	1233.99	0.31	-419.28	35.13	-0.00	0.07
e930	104.55	1334.25	0.35	-319.02	36.53	0.29	0.40
e932	119.41	1295.90	0.30	-357.37	36.00	-0.07	0.53
e933	110.99	1690.07	0.37	36.81	41.11	0.24	0.05
e934	100.78	1772.44	0.42	119.17	42.10	0.19	-0.71
e935	119.86	1645.26	0.34	-8.00	40.56	0.04	0.03
Meðaltöl	114.92	1903.74	0.38	250.48	43.30	0.31	0.15

Tafla 11: Egg móðurVII.

EggVII	\bar{Y}_E	s_E^2	CV	$s_E^2 - s_M^2$	s	g_1	g_2
e003	130.19	1801.32	0.33	390.38	42.44	-0.26	0.01
e004	131.82	1495.55	0.29	84.61	38.67	-0.23	-0.05
e005	127.62	1658.64	0.32	247.70	40.73	-0.09	0.18
e007	122.98	1892.66	0.35	481.72	43.50	-0.24	-0.23
e009	123.79	2072.13	0.37	661.19	45.52	-0.19	-0.36
e010	115.70	1772.59	0.36	361.65	42.10	0.25	0.33
e011	124.53	2014.07	0.36	603.13	44.88	0.20	-0.30
e012	122.83	2020.67	0.37	609.73	44.95	-0.17	-0.28
e013	127.37	1624.13	0.32	213.19	40.30	-0.41	0.09
e014	125.99	1467.96	0.30	57.02	38.31	0.28	1.16
e015	134.86	1581.84	0.29	170.90	39.77	-0.64	0.38
e016	127.23	2120.21	0.36	709.27	46.05	-0.25	-0.50
e017	125.65	2021.76	0.36	610.82	44.96	0.09	-0.52
e018	130.47	1830.83	0.33	419.89	42.79	-0.29	0.33
e019	133.16	1744.94	0.31	334.00	41.77	-0.48	0.40
e020	130.45	2128.32	0.35	717.38	46.13	0.20	1.10
e021	127.74	1359.59	0.29	-51.35	36.87	-0.46	0.10
e022	127.42	1726.11	0.33	315.17	41.55	-0.51	-0.26
e023	127.36	2045.03	0.36	634.09	45.22	-0.31	-0.32
e024	119.52	2105.56	0.38	694.62	45.89	0.12	-0.16
e025	122.25	1660.27	0.33	249.33	40.75	-0.21	-0.54
e026	124.04	1999.07	0.36	588.13	44.71	-0.12	-0.24
e027	132.86	1856.46	0.32	445.52	43.09	-0.38	-0.20
e028	125.11	1775.59	0.34	364.65	42.14	-0.21	-0.29
e029	123.75	1743.89	0.34	332.95	41.76	-0.33	-0.50
e030	126.81	1971.35	0.35	560.41	44.40	-0.10	-0.33
e031	123.27	1514.89	0.32	103.95	38.92	-0.37	-0.09
e032	111.62	1649.83	0.36	238.89	40.62	0.45	-0.26
e033	123.64	1684.59	0.33	273.65	41.04	-0.35	-0.51
e034	120.42	1329.46	0.30	-81.48	36.46	0.00	-0.62

Tafla 11: (framhald)

EggVII	\bar{Y}_E	s_E^2	CV	$s_E^2 - s_M^2$	s	g_1	g_2
e036	127.57	2581.01	0.40	1170.07	50.80	0.29	-0.40
e061	129.97	2263.16	0.37	852.22	47.57	0.51	0.96
e062	125.83	2719.47	0.41	1308.53	52.15	0.07	0.13
e063	126.57	2336.75	0.38	925.81	48.34	0.29	0.41
e064	136.40	1887.23	0.32	476.29	43.44	-0.14	0.77
e065	130.18	1956.61	0.34	545.67	44.23	-0.02	0.45
e066	127.39	1894.72	0.34	483.78	43.53	0.11	-0.08
e067	128.70	1852.96	0.33	442.02	43.05	-0.16	-0.00
e068	129.72	1882.42	0.33	471.48	43.39	-0.15	0.12
e069	128.94	1768.30	0.33	357.36	42.05	0.17	0.36
e070	133.26	1637.44	0.30	226.50	40.47	-0.30	-0.04
e071	122.63	1839.52	0.35	428.58	42.89	-0.23	-0.41
e072	128.36	1747.10	0.33	336.16	41.80	-0.33	-0.41
e073	107.78	1958.92	0.41	547.98	44.26	-0.15	-0.96
e074	134.85	1786.45	0.31	375.51	42.27	-0.49	0.08
e075	129.35	1706.29	0.32	295.35	41.31	-0.31	-0.39
e076	127.41	1540.88	0.31	129.94	39.25	-0.09	-0.17
e077	126.33	1583.06	0.31	172.12	39.79	-0.16	-0.13
e078	127.98	1450.84	0.30	39.90	38.09	-0.20	-0.20
e079	125.80	1904.11	0.35	493.17	43.64	0.09	-0.56
e080	120.18	1808.24	0.35	397.30	42.52	0.52	-0.22
e081	124.90	1717.88	0.33	306.94	41.45	0.18	-0.21
e082	133.94	1651.34	0.30	240.40	40.64	-0.16	0.16
e083	125.04	1527.82	0.31	116.88	39.09	0.01	-0.70
e084	118.97	1997.77	0.38	586.83	44.70	-0.03	0.07
e085	134.75	1447.21	0.28	36.27	38.04	-0.41	-0.05
e087	131.61	1386.86	0.28	-24.08	37.24	-0.44	0.11
e088	117.11	1124.38	0.29	-286.56	33.53	-0.03	0.14
e089	125.23	1619.87	0.32	208.93	40.25	-0.28	-0.53
e090	131.22	1531.77	0.30	120.83	39.14	-0.26	-0.09

Tafla 11: (framhald)

EggVII	\bar{Y}_E	s_E^2	CV	$s_E^2 - s_M^2$	s	g_1	g_2
e091	123.05	1547.82	0.32	136.88	39.34	0.07	-0.40
e092	130.30	1361.25	0.28	-49.69	36.90	-0.39	0.24
e093	124.69	1679.38	0.33	268.44	40.98	-0.41	-0.23
e094	107.56	1541.09	0.36	130.15	39.26	0.79	-0.31
Meðaltöl	126.16	1779.83	0.33	368.89	42.06	-0.11	-0.08

Tafla 12: Egg móðurl.

EggI	\bar{Y}_E	s_E^2	CV	$s_E^2 - s_M^2$	s	g_1	g_2
A701	169.60	4146.79	0.38	800.13	64.40	0.17	0.59
A702	167.96	3701.24	0.36	354.59	60.84	-0.13	0.37
A703	161.09	3340.80	0.36	-5.86	57.80	-0.00	0.44
A704	163.96	3914.32	0.38	567.67	62.56	-0.03	0.01
A705	160.29	3196.96	0.35	-149.69	56.54	-0.08	0.46
A706	157.79	3609.87	0.38	263.22	60.08	-0.10	0.08
A707	160.40	3150.05	0.35	-196.60	56.13	-0.26	-0.14
A708	154.44	3393.98	0.38	47.33	58.26	-0.01	-0.37
A709	160.55	3649.22	0.38	302.56	60.41	0.02	0.54
A710	153.59	4112.81	0.42	766.15	64.13	0.09	-0.53
A711	156.32	3320.50	0.37	-26.15	57.62	-0.13	0.05
A712	159.88	3025.96	0.34	-320.69	55.01	-0.17	0.20
A713	151.72	3081.34	0.37	-265.31	55.51	0.11	0.38
A714	146.61	3147.57	0.38	-199.09	56.10	0.10	0.14
A715	172.59	3628.83	0.35	282.18	60.24	-0.04	0.62
A716	155.61	2800.36	0.34	-546.29	52.92	0.02	0.49
A717	161.47	3908.42	0.39	561.77	62.52	-0.07	-0.35
A718	162.84	3007.29	0.34	-339.37	54.84	-0.03	0.45
A719	161.00	2672.17	0.32	-674.48	51.69	-0.09	0.72
A720	168.93	2900.03	0.32	-446.62	53.85	-0.59	0.70
A721	161.46	3012.17	0.34	-334.48	54.88	-0.61	0.23
A722	140.97	3858.18	0.44	511.53	62.11	-0.09	-0.44
A723	157.19	4253.32	0.41	906.67	65.22	-0.19	-0.55
A724	163.10	2920.70	0.33	-425.95	54.04	-0.61	0.24
A725	143.43	2996.55	0.38	-350.11	54.74	-0.23	-0.86
A726	148.98	2559.04	0.34	-787.61	50.59	-0.23	0.01
A727	151.11	2814.59	0.35	-532.06	53.05	-0.58	-0.33
A728	125.66	3817.24	0.49	470.58	61.78	0.25	-1.01
A729	154.66	2675.44	0.33	-671.22	51.72	-0.49	-0.31
A730	147.88	2811.36	0.36	-535.30	53.02	-0.25	-0.45

Tafla 12: (framhald)

EggI	\bar{Y}_E	s_E^2	CV	$s_E^2 - s_M^2$	s	g_1	g_2
A731	142.49	2925.56	0.38	-421.10	54.09	-0.12	-0.75
A732	153.27	2493.16	0.33	-853.49	49.93	-0.63	-0.02
A733	143.05	3702.67	0.43	356.01	60.85	0.08	-0.91
Meðaltöl	155.75	3289.35	0.37	-57.31	57.20	-0.15	-0.01

Tafla 13: Egg móðurX.

EggX	\bar{Y}_E	s_E^2	CV	$s_E^2 - s_M^2$	s	g_1	g_2
i301	162.16	8282.66	0.56	2118.32	91.01	0.25	-1.00
i302	165.80	7527.91	0.52	1363.57	86.76	0.12	-0.88
i303	174.55	7467.47	0.50	1303.13	86.41	0.19	-0.83
i304	157.04	7885.80	0.57	1721.46	88.80	0.29	-0.90
i305	180.60	6358.66	0.44	194.32	79.74	0.16	-0.67
i306	170.15	6835.89	0.49	671.55	82.68	0.19	-0.82
i307	177.03	4986.84	0.40	-1177.50	70.62	-0.13	-0.47
i308	164.86	7614.71	0.53	1450.37	87.26	0.28	-0.89
i309	157.02	7129.23	0.54	964.89	84.43	0.28	-0.64
i310	162.90	6677.38	0.50	513.04	81.72	0.12	-0.88
i311	151.28	5259.63	0.48	-904.71	72.52	-0.01	-0.93
i312	154.02	6855.82	0.54	691.49	82.80	0.23	-0.75
i313	185.98	12741.49	0.61	6577.15	112.88	0.61	-0.62
i314	163.45	6530.91	0.49	366.57	80.81	0.15	-0.65
	166.20	7296.74	0.51	1132.40	84.89	0.20	-0.78

Heimildir

- ÁRNASON, E., 2003. Mitochondrial cytochrome *b* DNA variation in the high fecundity Atlantic cod: Trans-Atlantic clines and shallow gene-genealogy. *Genetics* : in press.
- ÁRNASON, E. og S. PÁLSSON, 1996. Mitochondrial cytochrome *b* DNA sequence variation of Atlantic cod, *Gadus morhua*, from Norway. *Molecular Ecology* **5**: 715–724.
- ÁRNASON, E., S. PÁLSSON og A. ARASON, 1992. Gene flow and lack of population differentiation in Atlantic Cod, *Gadus morhua* L., from Iceland, and comparison of cod from Norway and Newfoundland. *Journal of Fish Biology* **40**: 751–770.
- ÁRNASON, E. og D. M. RAND, 1992. Heteroplasmy of short tandem repeats in mitochondrial DNA of Atlantic Cod, *Gadus morhua*. *Genetics* **132**: 211–220.
- BROWN, W., M. GEORGE og A. WILSON, 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **76**: 1967–1971.
- BUROKER, N., J. BROWN, T. GILBERT, P. O'HARA, A. BECKENBACH, W. THOMAS og M. SMITH, 1990. Length heteroplasmy of sturgeon mitochondrial DNA: An illegitimate elongation model. *Genetics* **124**: 157–163.
- FUTUYMA, D. J., 1998. *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, Massachusetts, Þriðja útgáfa.
- GRIFFITHS, A. J., J. H. MILLER, S. D. T., R. C. LEWONTIN og W. M. GELBART, 2000. *An Introduction to Genetic Analysis*. W. H. Freeman and Company, New York, sjöunda útgáfa.
- GRIMALDI, M.-C. og B. CROUAU-ROY, 1997. Microsatellite allelic homoplasmy due to variable flanking sequences. *Journal of Molecular Evolution* **44**: 336–340.
- HAYASAKA, K., T. ISHIDA og S. HORAI, 1991. Heteroplasmy and polymorphism in the major Noncoding Region of Mitochondrial DNA in Japanese Monkeys: Association with Tandemly Repeated Sequences. *Molecular Biology and Evolution* **8**: 399–415.

- HUMMERICH, H., S. BAXENDALE, R. MOTT, S. KIRBY, M. MACDONALD, J. GUSELLA, H. LEHRACH og G. BATES, 1994. Distribution of trinucleotide repeat sequences across a 2 mbp region containing the Huntingtons diseasene. *Human Molecular Genetics* **3**: 73–78.
- JOHANSEN, S. og I. BAKKE, 1996. The complete mitochondrial DNA sequence of Atlantic cod (*Gadus morhua*): Relevance to taxonomic studies among codfishes. *Molecular Marine Biology and Biothechnology* **5**: 203–214.
- JOHANSEN, S., P. H. GUDDAL og T. JOHANSEN, 1990. Organization of the mitochondrial genome of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Nucleic Acids Research* **18**: 411–419.
- KRINGS, M., A. STONE, R. W. SCHMITZ, H. KRAINITZKI, M. STONEKING og S. PÄÄBO, 1997. Neandertal DNA Sequences and the Origin of Modern Humans. *Cell* **90**: 19–30.
- LEVINSON, G. og G. A. GUTMAN, 1987. Slipped-strand mispairing: A major mechanisms for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 203–221.
- LUDWIG, A., B. MAY, L. DEBUS og I. JENNECKENS, 2000. Heteroplasmy in the mtDNA Control Region of Sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*). *Genetics* **156**: 1933–1947.
- NESBØ, C. L., M. O. ARAB og K. S. JAKOBSEN, 1998. Heteroplasmy, length and sequence variation in the mtDNA control regions of three percid fish species (*Perca fluviatilis*, *Acerina cernua*, *Stizostedion lucioperca*). *Genetics* **148**: 1907–1919.
- PHARMACIA BIOTECH, 1997. *ALFexpress DNA Sequencer User Manual*. Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden.
- PHARMACIA BIOTECH, 1998. *ALFwin™ Fragment Analyser 1.00 User Manual*. Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden.
- RAND, D. M., 2001. The units of selection on mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology and Systematics* **32**: 415–448.
- ROHLF, F. J. og R. R. SOKAL, 1995. *Statistical Tables*. W. H. Freeman and Company, San Francisco.
- RUZZANTE, D. E., C. T. TAGGART, D. COOK og S. GODDARD, 1996. Genetic differentiation between inshore and offshore Atlantic cod (*Gadus morhua*) off Newfoundland: Microsatellite DNA variation and antifreeze level. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **53**: 634–645.

- SAIKI, R., D. GELFAND, S. STOFFEL, S. SCHARF, R. HIGUCHI, G. HORN, K. MULLIS og H. ERLICH, 1988. Primerdirected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487–491.
- SCHLÖTTERER, C., 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* **109**: 365–371.
- SHIELDS, G. F. og J. R. GUST, 1995. Lack of geographic structure in mitochondrial DNA of Bering Sea walleye pollock, *Theragra chalcogramma*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **4**: 69–82.
- SIGURGÍSLASON, H., 2003. *Direct estimation of mutation rate in mitochondrial DNA of Atlantic cod*. M.S. ritgerð, Háskóli Íslands, Reykjavík.
- SOKAL, R. R. og F. J. ROHLF, 1995. *Biometry*. W. H. Freeman and Company, San Francisco.
- STRACHAN, T. og P. R. ANDREW, 1999. *Human Molecular Genetics*. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford UK, Önnur útgáfa.