

Vinnsla og vörupróun
Processing and Product
Development

Líftækni
Biotechnology



Matvælaöryggi
Food Safety



Erfðamarkasett fyrir bleikju

Sigurlaug Skírnisdóttir
Alexandra M. Klonowski
Sigurbjörg Hauksdóttir
Kristinn Ólafsson
Helgi Thorarensen
Einar Svavarsson
Sigríður Hjörleifsdóttir

Líftækni

Skýrsla Matís 04-08
Febrúar 2008

ISSN 1670-7192

Titill / Title	Erfðamarkasett fyrir bleikju		
Höfundar / Authors	Sigurlaug Skírnisdóttir, Alexandra M. Klonowski, Sigurbjörg Hauksdóttir Kristinn Ólafsson, Helgi Thorarensen, Einar Svavarsson, Sigríður Hjörleifsdóttir		
Skýrsla / Report no.	04 - 08	Útgáfudagur / Date:	Febrúar 2008
Verknr. / project no.	061368006		
Styrktaraðilar / funding:	Tækniþróunarsjóður Rannsóknamiðstöðvar Íslands		
Ágríp á íslensku:	<p>Markmið verkefnisins var að búa til öflug erfðagreiningasett fyrir bleikju með 15-20 erfðamörkum. Mörg erfðamörk hafa verið birt fyrir bleikju og aðra laxfiska en gallinn er sá að ekkert hentugt fjölmögnunar erfðamarkasett er þekkt en það er forsenda þess að notkun tækninnar sé hagkvæm. Mikilvægt er að erfðamörkin sýni breytileika innan stofnsins, séu af ákveðinni stærð en þó misstór, virki vel í fjölmögnunarahvarflausn og séu vel læsileg eftir að búið er að keyra sýnið á raðgreiningarvél. Áhættan í verkefninu fólst í því hvort hægt væri að finna hentug erfðamörk sem mætti setja saman í 2-3 hvarfblöndur. Prófuð voru 70 vísapör fyrir 56 birt erfðamörk. Niðurstaða verkefnisins var sú að hægt var að koma saman 17 erfðamörkum í 3 hvarfblöndur. Alls voru greindir 140 fiskar úr eldisstofni Hóla með þessum 17 erfðamörkum en auk þess voru 12 villtir fiskar greindir með þeim. Niðurstöður sýndu að erfðamörkin nýttust til að aðgreina mismunandi hópa bleikju. Úrvinnsla á erfðagreiningum staðfesti greinilega að Hólableikjan er aðallega byggð upp af tveimur stofnum. Nokkur sýni af villtri bleikju sem voru erfðagreind gáfu nýjar samsætur sem ekki sjást í eldisfiskinum.</p> <p>Nú eru því til erfðamarkasett sem geta nýst í kynbótastarfi, í stofnrannsóknum á villtri bleikju og í rekjanleikarannsóknum. Þetta verður til að efla kynbótastarf og er öflugt verkfæri við rannsóknir á bleikju í framtíðinni.</p>		
Lykilorð á íslensku:	<i>Erfðagreiningar, bleikja, erfðamörk,</i>		
Summary in English:	<p>The goal of the project was to develop genotyping protocols for Arctic charr containing multiplexes of 15-20 microsatellite markers. Many microsatellite markers have been published for salmonoid fishes but no multiplexes are known which are of practical use when analyzing many samples at a time and therefore, to make the research profitable. The microsatellite markers must show variability among the fishes, they must be of certain sizes and of variable sizes, they must be amplifiable in multiplex PCR reactions and they must be easily readable from the machine. The risk of the project was to find published microsatellite markers which would fulfill these criteria and fit into 2-3 multiplex PCR reactions. Seventy primer pairs were tested for 56 published microsatellite markers. The results of the project were that 17 microsatellite markers which fit into 3 multiplex PCR reactions. A total of 140 fish from the brood stock of Arctic charr from the University at Holar was analyzed in the study as well as 12 samples from wild fish of different lakes and rivers. The results indicate that these markers can be used to analyze different stocks of Arctic charr. Furthermore, analyzes of the brood stock confirms that it mainly consist of two different stocks. New alleles were observed in the wild fish compared to the brood stock fish.</p> <p>A genotyping protocol to analyze Arctic charr for use in breeding industry, in wild fish research and in tractability analyzes, is now available. This will help in building up breeding programs and will be a helpful tool of the genetic research of Arctic charr.</p>		
English keywords:	<i>Genotyping, Arctic charr, microsatellite markers</i>		



Erfðamarkasett fyrir bleikju

Tæknileg lokaskýrsla

Dr. Sigurlaug Skírnisdóttir, Msc. Alexandra M. Klonowski, Msc. Sigurbjörg Hauksdóttir, Msc. Kristinn Ólafsson, Dr. Sigríður Hjörleifsdóttir, Dr. Helgi Thorarensen og Msc. Einar Svavarsson

Janúar 2008

Efnisyfirlit

1. AFRAKSTUR VERKEFNISINS	1
2. INNGANGUR	2
3. VERK- OG TÍMAÁÆTLUN	4
4.VERKÞÆTTIR; AÐFERÐIR OG NIÐURSTÖÐUR	5
4.1 Leit að þekktum erfðamörkum fyrir bleikju og aðra laxfiska.....	5
4. 2 Val á erfðamörkum.....	5
4.3 Tilraunasýni: Eldisfiskar úr mismunandi fjölskyldum og villtir fiskar	6
4. 4 Prófun á stökum erfðamörkum og bestu aðstæður fundnar	8
4.5 Endurhönnun á vísun birtra erfðamarka.....	10
4.6 Tilraunakeyrslur með fjölmögnunarkerfin þar til besta samsetning var fundin.....	10
4.7 Mat á gæðum erfðamarkanna	11
4.8 Skyldleikagreining á eldisstofni Hólaskóla og villtra fiska	14
5. NÝTING NIÐURSTAÐNA	18
6. ÞAKKIR	19
7. HEIMILDIR	19
VIÐAUKI 1	21
VIÐAUKI 2	23

1. AFRAKSTUR VERKEFNISINS

Þetta er lokaskýrsla verkefnisins “**Erfðamarkasett fyrir bleikju**” (styrknúmer 061368006) sem skilað er til **Tækniþróunarsjóðs (Rannsóknamiðstöðvar Íslands)**.

Samstarfsaðilar verkefnisins voru Matís-Prokaria og Háskólinn á Hólum.

Afrakstur verkefnisins er eftirfarandi:

1. Þrjú erfðamarkasett sem innihalda alls 17 erfðamörk.
2. Niðurstöður prófana á 70 vísapörum (56 erfðamörk) á fjölbreyttum bleikjusýnum.
3. Upplýsingar sem búið er að safna um yfir 900 erfðamörk sem eru upprunnin í ýmsum laxfiskum (upplýsingar úr greinum og birtum niðurstöðum á Internetinu).
4. Endurhönnun á birtum vísam fyrir 14 erfðamörk, þ.e. hönnun á nýjum vísam út frá birtum röðum í gagnagrunnum.
5. Greining á 140 eldisbleikjum frá Hólum með 17 erfðamörkum (3 erfðamarkasett).
6. Greining á 12 villtum bleikjum úr nokkrum vötnum og ám á Íslandi með 13 erfðamörkum.
7. Mat á gæðum erfðamarkanna 17 með ýmsum tölfræðiprófum.
8. Menntun og þjálfun ungra vísindamanna.

2. INNGANGUR

Kynbætur á eldisstofnum er mikilvægur liður í að bæta samkeppnisstöðu íslenskra fiskeldisstöðva. Markmið kynbóta á fiskum sem aldir eru til slátrunar er yfirleitt að rækta hraðvaxna stofna sem gefa af sér gæðaafurðir, hafa góða fóðurnýtingu, gott viðnám gegn sjúkdómum og verða ekki kynþroska fyrir en eftir að þeir hafa náð markaðsstærð. Landbúnaðarráðuneytið gerði samning við Hólaskóla árið 1998 um að sjá um kynbætur á bleikju en bleikjukynbætur hófust á Hólum árið 1989. Á þessu stigi er lögð áhersla á að auka vaxtarhraða og seinka kynþroska í bleikjukynbótunum á Hólum.

Erfðagreining er mjög öflug tækni sem nota má til einstaklingsgreininga í fjölda lífvera. Í erfðagreiningu eru notuð svonefnd erfðamörk en það eru ákveðnir staðir eða DNA raðir sem eru á einhvern hátt greinanlegar í erfðamenginu. Algengast er að nota erfðamörk sem byggjast á endurteknum stuttröðum (microsatellites eða örtungl) sem vitað er að eru breytilegar á milli einstaklinga sömu tegundar. Þessi svæði eru notuð til að smíða DNA vísa og vísarnir síðan notaðir í PCR mögnun (O'Connell and Wright 1997).

Tilgangur verkefnisins var að útbúa öflug erfðagreiningasett fyrir bleikju. Þörf er fyrir góð greiningasett til erfðagreininga á bleikju sem er forsenda fyrir rekjanleika á afkvæmum til foreldra vegna kynbóta, vegna stofngreininga villtra stofna og upprunagreininga. Nauðsynlegt er að hafa a.m.k. 8-10 erfðamörk til foreldragreininga og um 15-20 til stofn- og upprunagreininga. Í verkefninu átti að búa til 2-3 fjölmögnunarkerfi sem samanstæðu af 7-10 erfðamörkum í hverju kerfi. Mörg erfðamörk eru birt fyrir bleikju og aðra laxfiska en gallinn er sá að ekkert hentugt fjölerfðamarkerasett er þekkt. Til þess að erfðagreiningar á grundvelli endurtekinnar stuttraða sé hagkvæm þarf lestur erfðamarkanna að vera sem mest tölvuunninn og framkvæmdin sem mest sjálfvirk og PCR magnanir og keyrslur á vélum sem fæstar.

Notuð voru erfðamörk sem búið er að birta í vísindagreinum. Mikil forvinna var í því að finna hentug erfðamörk fyrir bleikju en stór hluti erfðamarkanna sem var prófaður var ekki nothæfur m.a. vegna of lítills fjölbreytileika (9 erfðamörk), engin eða léleg PCR mögnun varð (20 erfðamörk) eða vegna áberandi fortoppa (stutter) í PCR hvörfunum (16 erfðamörk). Fortoppar eða “stutter” eru 4-10 aukatoppar sem myndast

fyrir framan hinn raunverulega topp þannig að lesning verður flókin og erfið. Vegna þessa vandamáls urðu fjölbreytt erfðamörk ónothæf. Á erfðagreiningardeild Matís-Prokaria hafa margar lífverur verið erfðagreindar á seinustu árum, t.d. þorskur, hrefna, lax, trúðfiskur, urriði, hross og hænur. Vandamál með fortoppa (stutter) var mun meira áberandi í bleikjunni en í hinum tegundunum.

Mikill hluti þróunarvinnunar fólst því í að finna bestu aðstæður fyrir PCR hvörfin þar sem hægt var að nota sem flest erfðamörk í einu hvarfi (fjölmögnunarhvarf eða multiplex) og samtímakeyrslur á raðgreiningavél. Í þessum hluta fólst gríðarleg vinna og ýmis vandamál komu upp á mismunandi stigum sem rakin eru í næsta kafla skýrslunnar.

Áhættan í verkefninu fólst þess vegna í því hvort hægt væri að finna hentug erfðamörk sem hægt væri að setja saman í 2-3 hvarfblöndur. Eftir mikla vinnu var niðurstaða verkefnisins sú að hægt var að koma saman 17 erfðamörkum í 3 hvarfblöndur. Alls voru greindir 140 fiskar úr eldisstofni Hóla með þessum 17 erfðamörkum en auk þess voru 12 villtir fiskar greindir upprunnir víða af landinu sem Veiðimálastofnun útvegaði í verkefnið.

3. VERK- OG TÍMAÁÆTLUN

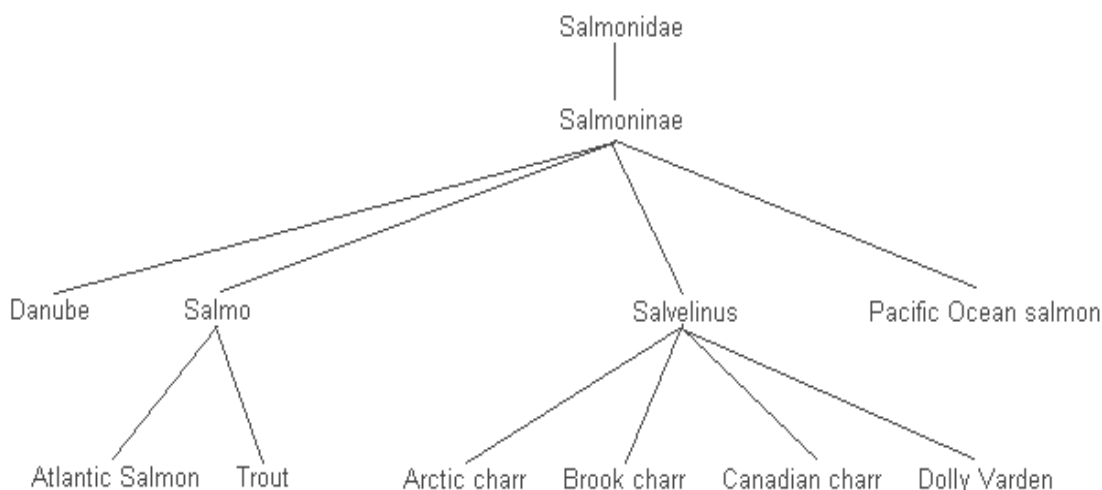
Samkvæmt samingi var upphafsdagur verkefnisins skilgreindur sem 1. desember 2006. Framvinduskýrslu var skilað á tilsettum tíma, þ.e. 15. mars 2007 en eins og greint var frá þar, þá drógst um 2 mánuði að hefja verkefnið þannig að upphafsdagurinn varð 1. feb. 2007. Skila átti lokaskýrslu 1. desember 2007 en þar sem verkefnið hófst tveimur mánuðum síðar en upphaflega áætlunin gerði ráð fyrir, þá er lokaskýrslu skilað 29. febrúar 2008.

Verkefnið hefur stækkað mikið frá upphaflegu umsókninni. Í umsókninni átti að leita að upplýsingum um 100 erfðamörk á netinu og í tímaritagreinum en það urðu rúmlega 900 erfðamörk. Velja átti 30 erfðamörk af þessum 100 og prófa á nokkrum sýnum og enda svo með 2-3 erfðamarkasett sem innihéldu 15-20 erfðamörk. Ekki reyndist nægjanlegt að prófa 30 erfðamörk til að ná settu marki. Alls voru 56 erfðamörk prófuð og vísar 14 þeirra voru endurhannaðir, þannig að prófuð voru 70 vísapör. Að auki þurfti að breyta litum á erfðamörkum til að passa inn í fjölmögnunarhvörfin. Sýnafjöldinn varð einnig meiri en áætlað var. Í stað 100 sýna sem átti að greina, voru greind 140 bleikjusýni frá eldisstöðinni í Hólaskóla en einnig voru greind 12 sýni úr villtri bleikju úr 5 ám og vötnum á Íslandi.

4.VERKÞÆTTIR; AÐFERÐIR OG NIÐURSTÖÐUR

4.1 Leit að þekktum erfðamörkum fyrir bleikju og aðra laxfiska

Með því að nota leitarvél og gagnagrunna á Internetinu var upplýsingum safnað um rúmlega 900 þekkt stuttraða erfðamörk sem upprunnin eru í ýmsum laxfiskategundum. Ekki var einungis leitað að bleikjuerfðamörkum þar sem þekkt er að erfðamörk upprunnin úr einni laxfiskategund virka í ýmsum öðrum laxfisktegundum (Mynd 1). Allar fáanlegar upplýsingar voru skráðar, s.s. vísaröð, aðgangsnúmer í gagnabanka, gerð endurtekningar, stærð erfðamarksins, tíðni breytileika í stofnum, fjöldi þekktra samsæta í bleikju eða öðrum laxfiskum og höfundar greina.



Mynd 1. Skyldleiki laxfiska (Arctic charr er bleikja). Myndin var tekin af vef Hólaskóla þann 27. febrúar 2008: <http://www.holar.is/~aquafarmer/node7.html>.

4.2 Val á erfðamörkum

Erfðamörk sem talin voru hentug voru valin úr listanum og þau prófuð stök (sjá lið 4.4). Þar var einkum litið til þess hvort þekkt væri samsætutíðni og stærð erfðamarka. Þessi vinna var gerð í nokkrum áföngum og niðurstöður fyrri áfanga voru notaðar til ákvarðantöku fyrir næstu áfanga, s.s. ný erfðamörk prófuð, endurhönnun vísa á fyrri

erfðamörkum og breyting á litum á vísunum. Tafla 1 sýnir þau erfðamörk sem prófuð voru í verkefninu.

Tafla 1. Upplýsingar um erfðamörkin 70 sem voru prófuð.

Erfðamark	Heimild	Erfðamark	Heimild
Ble2	Prokariah. á SalP61SFU	Ble6	Prokariah. á SalD100SFU
Ble5	Prokariah. á SalE38SF	Ogo8	(Olsen et al. 1998)
Ble7	Prokariah. á SalF56SFU	Ssa202	(O'Reilly et al. 1996)
Omy301UoG-Prok	Prokariah. á Omy301 úr (Jackson et al. 1998)	SSOSL311	(Slettan et al. 1995)
One11ASC-Prok	Prokariah. á One11ASC	SalD100SFU	(McGowan et al. 2004)
SalD39SFU	(McGowan et al. 2004)	SSsp2201	(Paterson et al. 2004)
SalJ81SFU	(McGowan et al. 2004)	SalE38SFU	(McGowan et al. 2004)
Sfo23	(Bernatchez et al. 1998)	SalP61SFU	(McGowan et al. 2004)
Smm10	(Crane et al. 2004)	µ85INRA-Prok	Prokariah. á µ85INRA
Smm17	(Crane et al. 2004)	Ble1	Prokariah. á SalO23SFU
Smm22	(Crane et al. 2004)	Ble3	Prokariah. á SalD30SFU
Smm24	(Crane et al. 2004)	Ble8	Prokariah. á SalF41SFU
Ssa408UoS	(Cairney et al. 2000)	Ble9	Prokariah. á SalD25SFU
Ssa410UoS	(Cairney et al. 2000)	SalD25SFU	(McGowan et al. 2004)
Ssa422UoS	(Cairney et al. 2000)	SalD30SFU	(McGowan et al. 2004)
SSOSL456	(Slettan et al. 1997)	SalF41SFU	(McGowan et al. 2004)
SsaD157	(King et al. 2005)	Sfo8	(Bernatchez et al. 1998)
µ85INRA	(Malmquist et al. 2002)	Ssa406UoS	(Cairney et al. 2000)
Ble4	Prokariah. á SalD39SFU	Ssa418UoS	(Cairney et al. 2000)
Coel3	(Bernatchez et al. 1998)	Ssa420UoS	(Cairney et al. 2000)
One11ASC	(Malmquist et al. 2002)	Ssa85DU	(O'Reilly et al. 1996)
OtsG 432	(Williamson et al. 2002)	Str60INRA	(Sønstebø et al. 2007)
OtsG253b-Prok	Prokariah. á OstG253b úr (Williamson et al. 2002)	SSsp3016	GenBank no. AY372820
SalO23SFU	(McGowan et al. 2004)	SSspG7	(Paterson et al. 2004)
Sco19	(Taylor et al. 2001)	Ssa171	(O'Reilly et al. 1996)
Sco19UBS-Prok	Prokariah. á Sco19	SsaD486	(King et al. 2005)
Ssa14	(McConnell et al. 1995)	Ssa197	(O'Reilly et al. 1996)
Ssa20.19UCG	(Malmquist et al. 2002)	Ssa20.19UCG-Prok	Prokariah. á Ssa20.19UCG
Ssa403UoS	(Cairney et al. 2000)	Ssa402UoS	(Cairney et al. 2000)
Ssa407UoS-	(Cairney et al. 2000)	Ssa404UoS	(Cairney et al. 2000)
SsaD144	(King et al. 2005)	Ssa405UoS	(Cairney et al. 2000)
SSsp2210	(Paterson et al. 2004)	Ssa417UoS	(Cairney et al. 2000)
SSsp2213	(Paterson et al. 2004)	SsaF43	GeneBank no. U37494
SalF56SFU	(McGowan et al. 2004)	SSsp1605	(Paterson et al. 2004)
Ble10	Prokariah. á SalJ81SFU	SSsp2216	(Paterson et al. 2004)

4.3 Tilraunasýni: Eldisfiskar úr mismunandi fjölskyldum og villtir fiskar

Til að hægt væri að prófa erfðamörkin og fjölmögnunarkerfin, þurfti að keyra þau á breytilegum hópi einstaklinga. Tekin voru sýni úr 144 fiskum úr eldisstofni Hólaskóla en þeir voru fulltrúar jafnmargra fjölskyldna. Af þessum hópi var 41 hálf systkinapar (83

fiskar). Alls voru 141 sýni greind en eitt þeirra gaf ekkert erfðamark þannig að líklega var sýnið ónýtt.

Eldisstofninn sem sýnin voru tekin úr er blanda af nokkrum stofnum sem eru kjarninn í kynbótaverkefni sem hófst haustið 1992. Stofnarnir eru úr Ölvesvatni, Grenlæk, Litluá, Víðidalsá, Miðfjarðará, Hrótafjarðará, Laxárvatni og Eldvatni. Hlutdeild stofnananna er talsvert mismunandi og hefur breyst með úrvali frá einni kynslóð til annarrar. Að ósk framleiðenda hafa tveir stofnar verið kynbættir. Annar stofninn er ljós á roðið en efniviðurinn í honum er að stærstum hluta fenginn úr Ölvesvatni á Skagaheiði. Hinn stofninn er dökkur á roðið en efniviðurinn í honum er úr Grenlæk í Landbroti. Kynslóðabilið hefur verið 3-4 ár.

Seiði sem voru 1-3 cm að lengd voru tekin úr eldiskerjum og sett beint í glas sem innihélt 96% etanól. Sýnin voru geymd í 2 vikur í etanólinu en þá var smá bútur rétt fyrir framan uggann klipptur af (u.þ.b. 2 mm). DNA var einangrað úr búتونum með Chelex aðferð og það notað 1/10 þynnt í PCR hvörfin (Jakobsdóttir et al. 2006). Sýni sem hafa sýnanúmerin 101-182 eru af dökku línunni (Grenlækur) en sýnanúmerin 301-388 tilheyra fiskum sem eru úr ljósu línunni (Ölvesvatn).

Veiðimálastofnum útvegaði einnig 12 hreistursýni úr villtri bleikju víðsvegar af landinu (Þingvallavatn, Mývatn, Lagarfljót, Úlfsvatn og Elliðavatn). DNA var einangrað úr nokkrum hreistursflögum með Agowa DNA einagrunarkitti samkv. leiðbeiningum frá framleiðanda (Agowa GmbH). Notaðir voru 3 µl af 1/10 þynntu DNAi í PCR hvörfin.

4. 4 Prófun á stökum erfðamörkum og bestu aðstæður fundnar

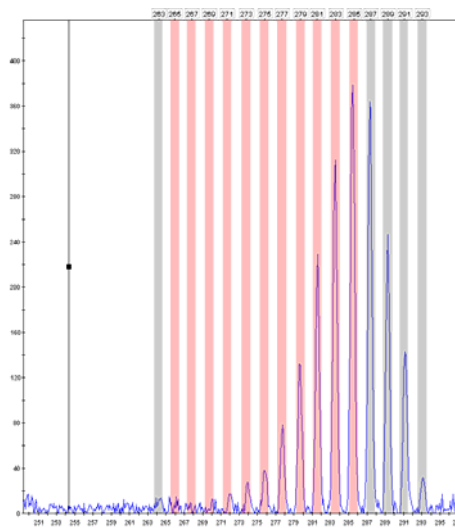
Til að komast að því út hvort erfðamörkin væru nothæf, þá þurfti fyrst að prófa þau öll stök við ýmsar PCR aðstæður þar sem hitastigi, DNA polymerasa og styrk á vísnum var breytt. Öll vísapörin voru prófuð fyrst við þáttapörunarhitastigið 55°C. Þau vísapör sem gáfu ekki mögnun eða góða toppa við 55°C voru einnig prófuð við þáttapörunarhitastigin 53°C, 56°C, 58°C, 59°C, 60°C og 62°C (ekki öll hitastigin á öll vísapörin). Í nokkrum tilvikum var einnig gert 48-65°C hitastiguls PCR til að finna út hentugasta þáttapörunarhitastigið.

Í öllum erfðamörkunum var framvísirinn merktur með bláum (6-fam), grænum (vic), gulum (ned) eða rauðum (pet) flúórlit (Applied Biosystems). Í flestum tilvikum var bætt á 5'enda afturvísis s.k. "PIG-tail" röð til að auka stöðugleika mögnunarinnar á samsætunum (Brownstein et al. 1996). PCR hvörfin voru gerð í 10 µl rúmmáli og afurðirnar síðan greindar í ABI PRISM 3730 raðgreini þar sem GeneScan-500 LIZ stærðarstaðall var notaður. Gögnin voru greind með forritinu GeneMapper version 4.0 (Applied Biosystems).

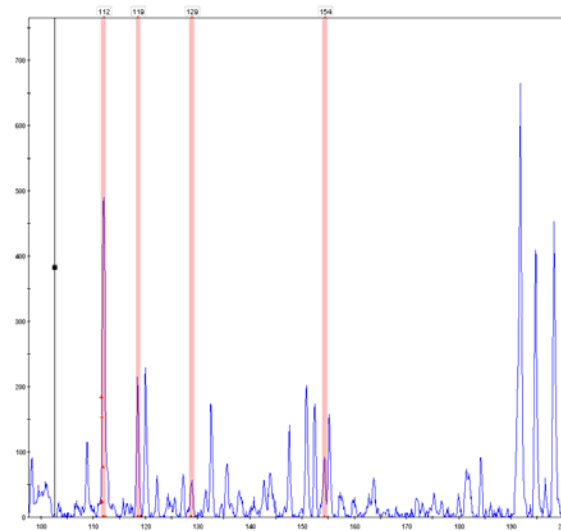
Alls voru 70 vísapör prófuð en fyrir 14 þeirra voru vísar fyrir erfðamörkin hannaðir aftur (kallað Prokaria-hönnun) þannig að alls voru 56 stuttraðasvæði prófuð (Tafla 1). Öll vísapörin voru keyrð fyrst á 4-12 sýnum (eldisfiskur frá Hólum, mismunandi fjölskyldur) og þá voru gæði toppa, samsætutíðnin og samsætustærðin metin. Þau erfðamörk sem gáfu enga toppa eftir nokkrar tilraunir, fortoppa, aukatoppa og mikinn bakgrunn var hent út. Mynd 2 sýnir dæmi um tvö ónothæf erfðamörk og eitt mjög gott erfðamark. Mynd 2a sýnir erfðamarkið Sfo8 sem hafði of marga fortoppa, á Mynd 2b sést erfðamarkið SSsp2210 sem gaf alltof marga aukatoppa og Mynd 2c sýnir erfðamarkið Ssa408UoS sem sýnir góða toppa og er í fjölmögnunarhvarfinu.

Alls voru það 9 erfðamörk sem gáfu 1-2 samsætur í 6-12 sýnum úr eldisfiski. Þau erfðamörk voru einnig keyrð á 12 villtum bleikjum uppruninum úr 5 ám og vötnum á Íslandi (Þingvallavatni, Mývatni, Lagarfljóti, Úlfsvatni og Elliðavatni) til að sjá hvort nýjar samsætur myndast þar. Í langflestum tilvikum bættust ekki við nýjar arfgerðir. Þau erfðamörk voru ekki notuð frekar.

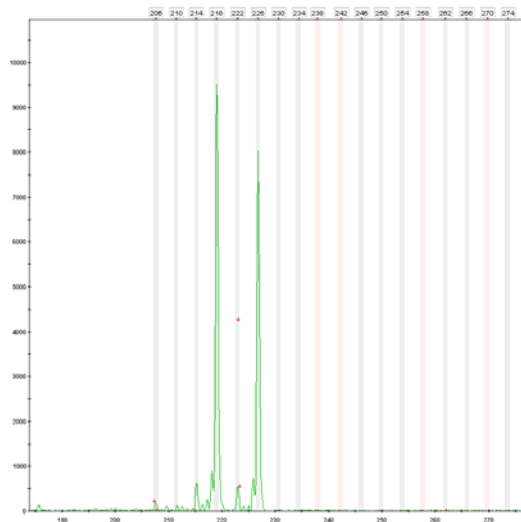
a) Sfo8



b) SSsp2210



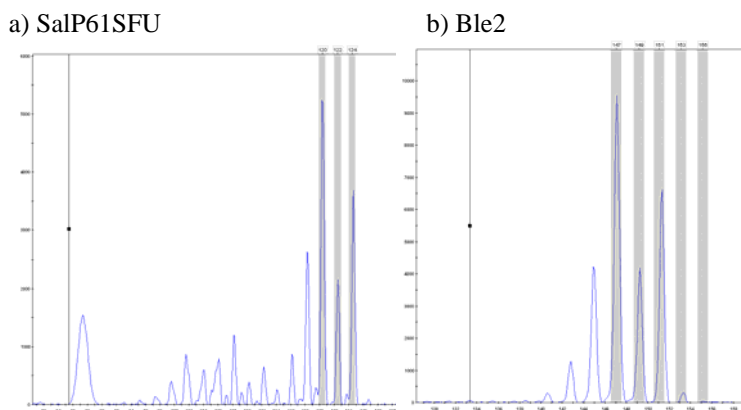
c) Ssa408UoS



Mynd 2. Dæmi um erfðamark: a) með of marga fortoppa (Sfo8), b) með of marga aukatoppa (SSsp2210) og c) sem er notað í fjölmögnunarkerfið (Ssa408UoS).

4.5 Endurhönnun á vísnum birtra erfðamarka

Þegar búið var að prófa PCR vísa þekktra erfðamarka á 6-12 sýnum voru þó nokkur vísapör sem gáfu lélega mögnum og/eða fortoppa. Þess vegna voru vísar endurhannaðir fyrir 14 erfðamörk. Raðirnar voru fluttar yfir í forritið Clone Manager 7 (Scientific & Educational Software) og vísar útbúnir sitthvoru megin við stuttraðirnar. Við slíka hönnun þurfti að huga að ýmsu s.s. bræðsluhitastigi, myndun vísistvennda (primer dimer) í PCR hvarfinu og stöðugleika vísisins. Mynd 3 sýnir toppa erfðamarksins SalP61 með birtum vísnum (SalP61SFU, Mynd 3a) og svo Prokaria-endurhönnun á vísunum, Ble2 (Mynd 3b). Í sumum tilvikum voru vísar endurhannaðir fyrir prófun þar sem greining á þeim sýndi að þeir væru lélegir (s.s. möguleg myndun vísistvennda í PCR hvarfinu).



Mynd 3. Toppa erfðamarksins SalP61 með a) birtum vísnum (SalP6SFU1) og b) endurhönnuðum vísnum (Ble2).

4.6 Tilraunakeyslur með fjölmögnunarkerfin þar til besta samsetning var fundin

Út frá samsætutíðni og samsætustærð voru valin saman erfðamörk sem virtust passa vel saman í aðskilin fjölmögnunarkerfi. Á þessu stigi var metið hversu hátt hlutfall erfðagreininga skilaði sér úr blöndunni. Í þróuninni voru ýmsar samsetningar prófaðar m.t.t. styrks á vísnum, mismunandi þáttapörunarhitastigs, mismunandi lita á framvísunum og hvaða vísar pössuðu best saman. Í þróuninni á fjölmögnunarkerfunum kom ýmislegt í ljós. Þegar búið var að setja nokkur erfðamörk saman í fjölmögnunarkerfi þá breyttist ýmislegt frá keyrslum á stökum erfðamörkum. Þar má

nefna að erfðamörk sem gengu vel ein sér gáfu enga toppa í fjölmögnunarkerfinu, aukatoppar mynduðust sem trufluðu aflestur og toppar fengu annað útlit. Enn annað vandamál kom upp þegar fjölmögnunarkerfin voru keyrð á fleiri sýnum. Þá komu fram nýjar samsætur þannig að erfðamörk með sama lit fóru að skarast og þá þurfti að breyta lit á erfðamörkum eða henda þeim út. Þetta var tímafrekasti og dýrasti verkþátturinn. Besta samsetning var valin fyrir hvert erfðamark eftir miklar prófanir og útkoman var 3 fjölmögnunarkerfi með 17 erfðamörkum.

4.7 Mat á gæðum erfðamarkanna

Að lokinni greiningu á 140 eldisfiskum með 17 erfðamörkum voru gæði erfðamarkanna metin. Þar voru séð og væntanleg arfbendi metin (observed and expected heterozygosities). Tengslaggreining (linkage analysis) var gerð en þar var athugað hvort erfðamörkin væru tengd með því að skoða öll erfðamörkin á móti öllum. Einng var framkvæmt líkindapróf fyrir Hardy–Weinberg frávik (probability test for deviations from Hardy–Weinberg expectations). Að auki voru reiknaðar líkur á að núllarfgerðir væru fyrir hendi í erfðamörkunum. Forritin MICRO-CHECKER (Van Oosterhout et al. 2004), Arlequin version 3.0 (Excoffier et al. 2005), GENEPOP (Raymond and Rousset 1995) og Cervus (Slate et al. 2000) voru notuð í þessa útreikinga. Í Töflu 2 má sjá niðurstöður fyrir séða og væntanlega arfbendni í eldisstofni Hólaskóla.

Tafla 2. Útreikningar á séðri og væntanlegri arfblendi (HObs og HExp) í erfðamörkunum 17 í öllum eldisstofni Hólaskóla. K: Fjöldi arfgerða; N: Fjöldi sýna á bakvið greiningu; PIC: Polymorphic information content; NE-1P: Average non-exclusion probability (first parent); NE-2P: Average non-exclusion probability (second parent).

Locus	K	N	HObs	HExp	PIC	NE-1P	NE-2P
SalD39SFU	15	77	0.935	0.868	0.847	0.434	0.275
Sfo23	25	97	0.969	0.936	0.927	0.243	0.138
Ble5	31	112	0.929	0.943	0.936	0.217	0.122
SalJ81SFU	7	125	0.672	0.692	0.635	0.727	0.562
Smm17	5	125	0.664	0.714	0.664	0.707	0.533
Smm24	15	120	0.842	0.903	0.891	0.337	0.202
SsaD157	2	126	0.119	0.126	0.118	0.992	0.941
Ble7	5	123	0.610	0.637	0.584	0.776	0.611
Omy301UoG-Prok	15	123	0.854	0.849	0.831	0.457	0.294
One11ASC-Prok	3	112	0.473	0.473	0.368	0.889	0.811
Smm10	9	125	0.824	0.833	0.809	0.504	0.333
Ssa422UoS	7	120	0.667	0.651	0.597	0.765	0.599
Ssa410UoS	12	112	0.911	0.891	0.877	0.372	0.227
Ble2	6	123	0.585	0.660	0.607	0.757	0.588
Smm22	19	125	0.832	0.886	0.873	0.375	0.231
SSOSL456	17	122	0.902	0.901	0.889	0.344	0.207
Ssa408UoS	13	125	0.752	0.746	0.713	0.639	0.457

Líkindapróf fyrir Hardy–Weinberg frávik byggir á því að verið sé að greina einn stofn í einu. Eldisstofn Hóla er upprunninn úr ýmsum ám og vötnum en er í grunninn tveir aðskildir stofnar. Þegar eldisstofninn var meðhöndlaður sem tveir stofnar (ljóst og dökkt roð) þá voru báðir stofnanir í HW jafnvægi, með gildin 0,1086 fyrir dökka stofninn en 0,2523 fyrir ljósa stofninn (ef gildið er >0,05 þá er stofninn í HD jafnvægi) (sjá Viðauka 1).

Jákvætt svar fyrir núllarfgerðir kemur fram ef fjöldi arfhreinna (homozygotes) er fleiri í sýnahópnum en útreikningar gera ráð fyrir (reiknað út frá tíðni arfgerðanna). Líklegasta skýringin á þessu er að stökkbreyting sé í vísaseti einhverra sýnanna þannig að ekki næst að magna samsætuna. Þessi skýring á stundum við ef erfðamarkið er einangrað úr annari tegund. Einnig gæti verið um að ræða samsætu sem ekki var lesin þar sem hún er langt frá öðrum samsætum. Þegar eldisstofninn var meðhöndlaður sem tveir stofnar (ljóst og dökkt roð) þá var einungis erfðamarkið SsaD157 sem gaf vísbendu um núllarfgerð í öðrum stofninum. Þetta erfðamark er einungis með tvær arfgerðir þannig að það gæti útskýrt þetta (Tafla 3). Við vorum einungis með sýni úr 12 villtum fiskum en sá fjöldi var ekki nógur til að meta þetta á villtum stofnum. Til að geta svarað þessari spurningu um núllarfgerðirnar þá þarf að greina fleiri villtar bleikjur.

Tafla 3. Útreikningar á líkum á núllarfgerðum í eldisstofnunum tveimur (ljóst og dökkt roð) með mismunandi aðferðum (Oosterhout, Chakraborty, Brookfield 1 og Brookfield 2).

Pop: Dökka línar; sýni 101-182					
Locus	F(Núll)	Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1	Brookfield 2
SalD39SFU	no	-0,1136	-0,0813	-0,079	0,5501
Sfo23	no	-0,0411	-0,0386	-0,038	0,1142
Ble5	no	0,0106	0,0099	0,0093	0,1459
SalJ81SFU	no	-0,0156	-0,015	-0,0115	0
Smm17	no	-0,0713	-0,0662	-0,0589	0,0314
Smm24	no	0,0127	0,0113	0,0104	0,0752
SsaD157	yes	0,1088	1	0,0256	0,0256
Ble7	no	-0,0066	-0,0119	-0,009	0,0948
Omy301UoG-Pr	no	-0,0896	-0,0758	-0,0747	0,0314
One11ASC-Pro	no	-0,045	-0,0401	-0,0208	0,2648
Smm10	no	-0,011	-0,0094	-0,0086	0,0423
Ssa422UoS	no	0,0358	0,0323	0,0252	0,1581
Ssa410UoS	no	-0,0401	-0,0362	-0,0347	0,0252
Ble2	no	-0,0348	-0,0254	-0,0189	0
Smm22	no	-0,0091	-0,0041	-0,0038	0
SSOSL456	no	-0,0046	-0,0023	-0,0021	0
Ssa408UoS	no	-0,0432	-0,0424	-0,0386	0
Pop: Ljósa línar; sýni 301-388					
Locus	F(Núll)	Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1	Brookfield 2
SalD39SFU	no	-0,0983	-0,0835	-0,0798	0,3086
Sfo23	no	-0,0332	-0,0324	-0,0318	0,5078
Ble5	no	-0,0337	-0,0321	-0,0321	0,1569
SalJ81SFU	no	-0,0078	-0,0084	-0,0072	0,0669
Smm17	no	0,054	0,0348	0,0219	0,0219
Smm24	no	0,0159	0,0177	0,0161	0,1595
SsaD157	no	-0,1598	-0,0794	-0,0346	0
Ble7	no	0,0265	0,0257	0,0194	0,093
Omy301UoG-Pr	no	0,012	0,0098	0,0079	0,0798
One11ASC-Pro	no	-0,1517	-0,1207	-0,0922	0,2128
Smm10	no	-0,043	-0,0385	-0,0342	0
Ssa422UoS	no	-0,1023	-0,087	-0,0715	0,088
Ssa410UoS	no	-0,0608	-0,05	-0,0471	0,3286
Ble2	no	0,0711	0,0888	0,0655	0,1968
Smm22	no	0,0312	0,0279	0,0252	0,0744
SSOSL456	no	-0,0348	-0,0333	-0,0326	0,1041
Ssa408UoS	no	-0,0121	-0,0116	-0,0088	0,0782

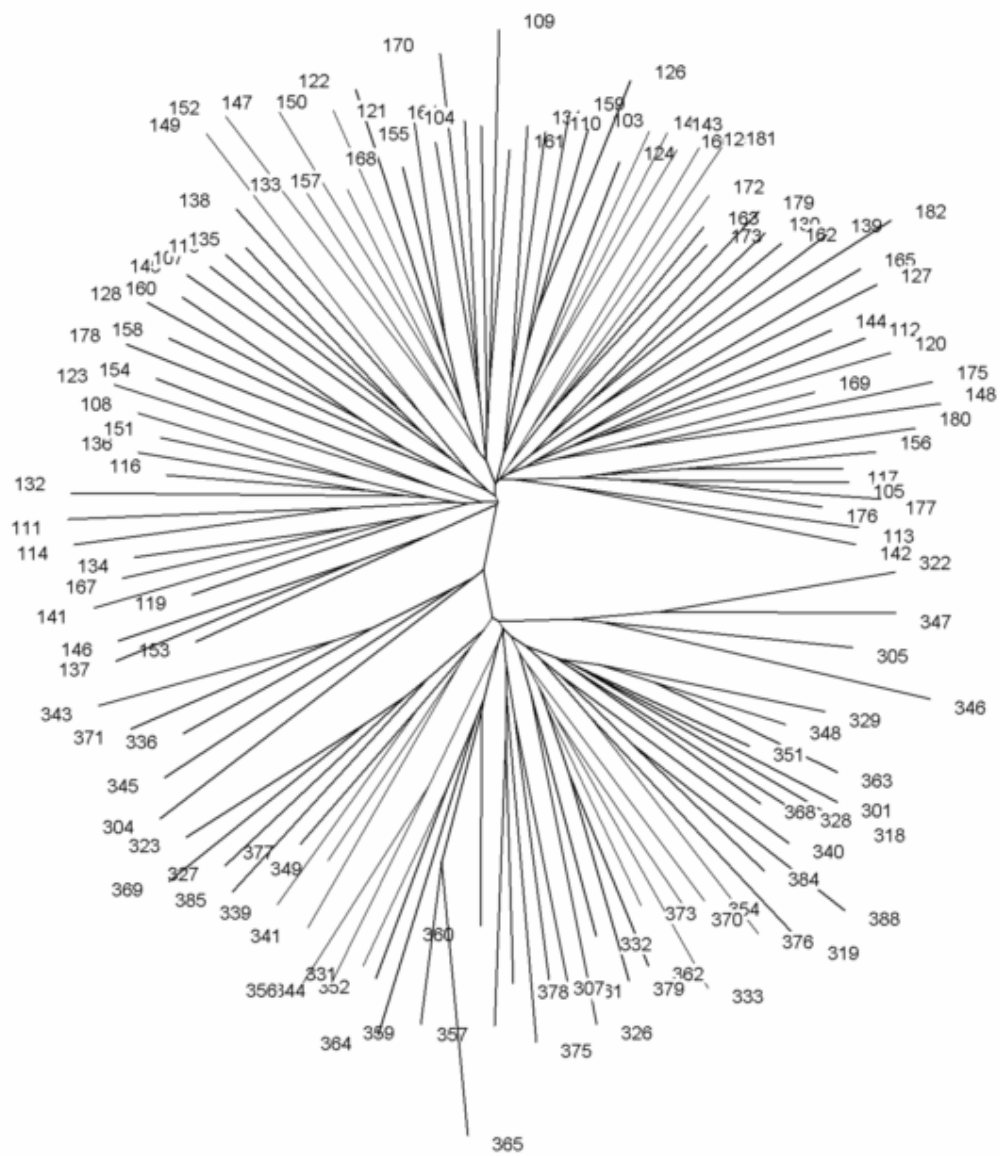
Í tengslagreiningu er mikilvægt að þekkja rannsóknarhópin og stofnaskiptingu til að niðurstaðan sé marktæk. Til að staðfesta tengsl á milli erfðamarka þarf að gera greiningu á mörgum aðskildum stofnum með miklum sýnafjölda innan hvers stofns. Ef niðurstaðan væri alltaf eins, þ.e. tengls fyndust á milli sömu erfðamarkanna í öllum stofnunum þá væru erfðamörkin tengd. Algengt er að tengls komi fram þar sem fáar samsætur hafa fundist í erfðamarkinu eða að ein eða fáar samsætur eru afgerandi algengastar. Niðurstaðan úr tengslagreiningunni var sú þegar eldisstofninn var meðhöndlaður sem tveir stofnar (ljóst og dökkt roð) þá gaf ljósa línar tengsl á milli 3

erfðamarkapara en sú dökka á milli eins pars sem var sameiginlegt ljósu línunnu (sjá Viðauka 2).

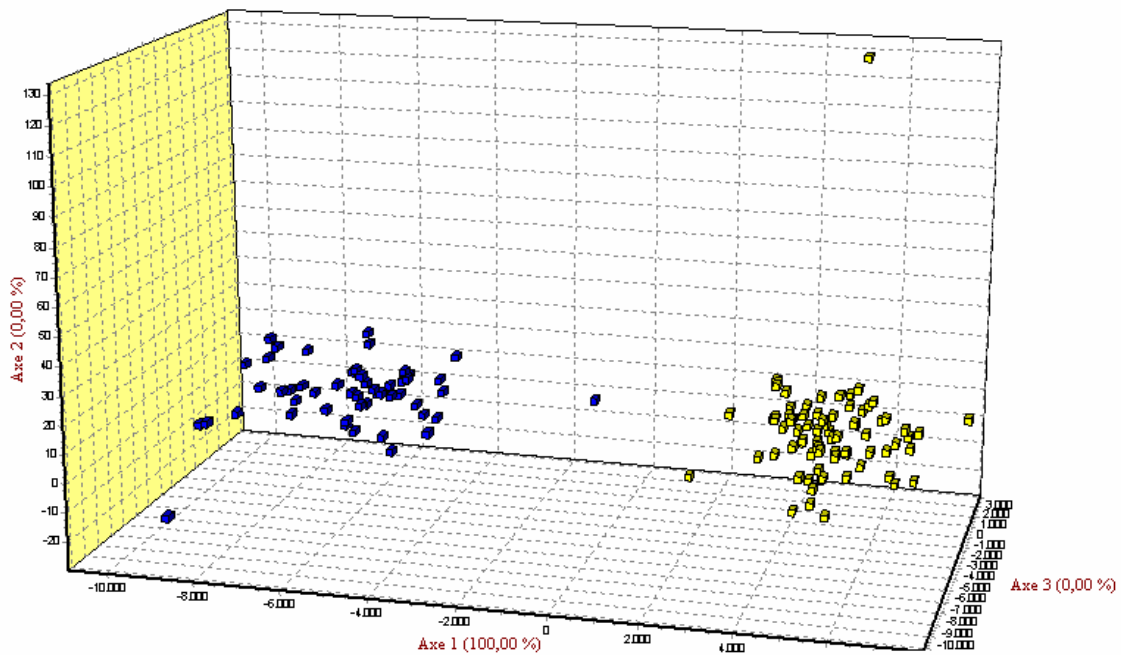
Það er gott að sjá að langfest erfðamörkin koma ótengd út en út frá okkar gögnum er ekki hægt að staðfesta að þessi pör sem sýndu tengsl séu í rauninni tengd á litningunum. Við teljum að þetta séu frekar bara tölfræðileg tengsl og það má t.d. rökstyðja með því að þetta eru allt þekkt erfðamörk og tengsl hafa ekki fundist á milli þeirra fyrr. Til að við getum svarað þessari spurningu þyrft að fara út í miklu stærri rannsókn.

4.8 Skyldleikagreining á eldisstofni Hólaskóla og villtra fiska

Til að staðfesta greiningarhæfni erfðamarkanna var gerð skyldleikagreining með neighbor-joining aðferð á eldisstofni Hólaskóla og villtu fiskanna (Saitou and Nei 1987). Mynd 4 sýnir þessar niðurstöður fyrir eldisstofn Hólaskóla en tréð sýnir glögglega algjöra aðgreiningu á milli þeirra fiska sem eru með ljóst roð (Ölvesvatn, sýni merkt 301-388) og þeirra með dökkt roð (Grenslækur, sýni merkt 101-182). Útreikingar á Hardy–Weinberg líkindum sýnir að báðir stofnanir eru í Hardy–Weinberg jafnvægi sem staðfestir það enn frekar að þetta eru tveir erfðafræðilega aðskildir stofnar. Tíðni arfgerða á milli stofnanna (Population Pairwise Fst) er mjög ólík og gefur gildið 0,08992 sem staðfestir þetta enn frekar. Greining í GENETIX forritinu (<http://www.genetix.univ-montp2.fr/genetix/genetix.htm> 29. febrúar 2008) sýnir aðskilnað hópanna enn betur í þrívíðu grafi (Mynd 5). Báðar þessar greiningar staðfesta að erfðamörkin hafa mikla greiningarhæfni.



Mynd 4. Skyldleikagreining á eldisstofni Hólaskóla með neighbor-joining aðferð.

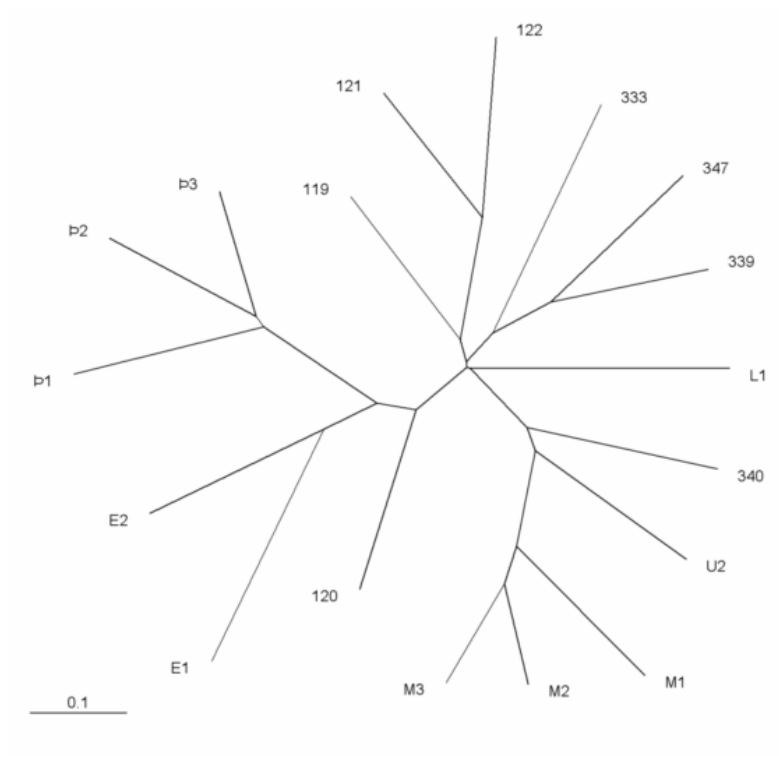


Mynd 5. Aðgreining á eldisstofni Hólaskóla í tvo stofna með greiningu í forritinu GENETIX . Bláir punktar sýna dreifingu fiska sem tilheyra ljósu línunni en gulir punktar sýna fiska í dökku línunni.

Villtu bleikjurnar tólf (hreistursýni frá veiðimálastofnun) úr Þingvallavatni, Mývatni, Lagarfljóti, Úlfsvatni og Elliðavatni voru einnig mjög fjölbreyttar og þær gáfu nýjar samsætur til viðbótar við það sem fannst í eldisstofni Hólaskóla (úr Ölvesvatni, Grenlæk, Litluá, Víðidalsá, Miðfjarðará, Hrútafjarðará, Laxárvatni og Eldvatni). Í 10 af 13 sameiginlegum erfðamörkum fundust 1-4 nýjar samsætur í villtu fiskunum þótt sýnin hafi einungis verið 12.

Til að athuga hvort skyldleiki væri á milli eldisstofnsins og villtu fiskanna var gerð skyldleikagreining með neighbor-joining aðferð á milli villtu fiskanna og nokkurra fulltrúa úr eldisstofninum með því að nota 11 erfðamörk (Mynd 6). Þrátt fyrir að þetta séu fáir fiskar þá gefur niðurstaðan vísbendingu í þá átt að fiskar sem eiga uppruna úr sama vatni klasast saman á sömu stofngreinum á trénu. Að auki má velta því fyrir sér að hvort hægt sé að sjá út úr trénu landfræðilegan aðskilnað en það sést t.d. að fiskar úr Þingvallavatni og Elliðavatni eru á sömu stofngrein. Að ofnagreiðu, þá benda niðurstöður okkar til þess að í sumum erfðamörkunum séu arfgerðir sem gætu verið greinandi á milli uppruna stofna en það gerir greiningarhæfni erfðamarkanna mikla.

Þessari spurningu er þó ekki hægt að svara að fullu nema með greiningu á fleiri villtum fiskum.



Mynd 6. Skyldleikagreining á villtum bleikjum við fulltrúa úr eldisstofni Hólaskóla með neighbor-joining aðferð. P: Þingvallavatn, L: Lagarfljót, E: Elliðaavatn, M: Mývatn, U: Úlfsvatn og L: Lagarfljót.

5. NÝTING NIÐURSTAÐNA

Erfðagreiningarsett sem eru auðveld, ódýr í notkun, gefa miklar upplýsingar og góða greiningarhæfni eru mjög gagnleg til margvíslegra nota. Þau eru því verðmætar afurðir og verslunarvara, og falla vel að uppbyggingu Prokaria á fjölbreytilegri erfðagreiningarþjónustu á dýrum bæði eldisdýrum og villtum dýrum. Greiningarsett af þessu tagi eru tól sem hægt er að nota til rannsókna á bleikjustofnum hvort sem um er að ræða eldisstofna eða villta bleikjustofna.

Mikilvægt er að það greiningarsett sem notað verður við kynbótastarf sé nægilega gott hvað varðar fjölbreytileika í samsætum og tíðni samsæta því annars greinir það ekki mun á milli einstaklinga. Ef greiningarsett er nægilega gott fyrir kynbótastofna þá er það örugglega nægilega aðgreinandi fyrir villta stofna þar sem kynbótastofnar eru oft á tíðum einsleitari. Afrakstur þessa verkefnis, 17 erfðamörk sem búið er að setja saman í 3 fjölmögnunarkerfi uppfylla þessar kröfur. Alls voru 140 eldisfiskar greindir með þessum 17 erfðamörkum og niðurstöðurnar sýna að þetta er fjölbreyttur stofn og aðgreinist fullkomlega eftir lit á roði (sjá Myndir 4 og 5). Tólf sýni frá Veiðimálastofnun (villtir fiskar úr Þingvallavatni, Mývatni, Lagarfljóti, Úlfsvatni og Elliðavatni) voru einnig mjög fjölbreytt og gáfu nýjar samsætur eins og gert var ráð fyrir.

Þar sem vinnu við verkefnið er rétt að ljúka, þá hafa niðurstöður ekki verið kynntar út á við. Hins vegar er áætlað að kynna niðurstöðurnar í tímaritum, á ráðstefnum og fundum. Erfðamörkin sem notuð voru í verkefninu eru öll birt þannig að ekki er hægt að sækja um einkaleyfi á þeim. Hins vegar er hönnun og þróun á fjölmögnunarhvörfunum eign Matís-Prokaria og mun fyrirtækið bjóða upp á erfðagreiningar á bleikju í framtíðinni sem geta nýst í kynbótastarfi, í stofnrannsóknum á villtri bleikju og í rekjanleikarannsóknum. Þetta verður til að efla kynbótastarf og er öflugt verkfæri við rannsóknir á bleikju í framtíðinni

6. Þakkir

Tækniþróunarsjóði er þakkaður stuðningur sem veittur var til verkefnisins árið 2007. Veiðimálastofnun er þakkað fyrir að útvega 12 sýni af villtri bleikju úr vötnum og ám á Íslandi.

7. HEIMILDIR

- Bernatchez L, Dempson JB, Martin S (1998) Microsatellite gene diversity analysis in anadromous arctic char, *Salvelinus alpinus*, from Labrador, Canada. *Can J Fish Aquat Sci* 55:1264–1272
- Brownstein MJ, Carpten JD, Smith JR (1996) Modulation of nontemplated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *BioTechniques* 20:1004-1010
- Cairney M, Taggart JB, Hoyheim B (2000) Characterization of microsatellite and minisatellite loci in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and cross-species amplification in other salmonids. *Mol Ecol* 9:2175-2178
- Crane PA, Lewis CJ, Kretschmer EJ, Miller SJ, Spearman WJ, DeCicco AL, Lisac MJ, Wenburg JK (2004) Characterization and inheritance of seven microsatellite loci from Dolly Varden, *Salvelinus malma*, and cross-species amplification in Arctic char, *S. alpinus*. *Conserv Genet* 5:737-741
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1:47-50
- Jackson TR, Ferguson MM, Danzmann RG, Fishback AG, Ihssen PE, O'Connell M, Crease TJ (1998) Identification of two QTL influencing upper temperature tolerance in three rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) half-sib families. *Heredity* 80:143-151
- Jakobsdottir KB, Jorundsdottir TD, Skirnisdottir S, Hjorleifsdottir S, Hreggvidsson GO, Danielsdottir AK, Pampoulie C (2006) Nine new polymorphic microsatellite loci for the amplification of archived otolith DNA of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Mol Ecol Notes* 6:337-339
- King TL, Eackles MS, Letcher BH (2005) Microsatellite DNA markers for the study of Atlantic salmon (*Salmo salar*) kinship, population structure, and mixed-fishery analyses. *Mol Ecol Notes* 5:130-132
- Malmquist HJ, Ingimarsson F, Jóhannsdóttir EE, Gíslason D, Snorrason SS (2002) Biology of brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) in four Faroese lakes. *Ann Soc Scient Færoensis Suppl* 36:94-113
- McConnell SK, Hamilton L, Morris D, Cook D, Paquet D, Bentzen P, Wright JM (1995) Isolation of salmonid microsatellite loci and their application to population genetics of Canadian east coast stocks of Atlantic salmon. *Aquaculture* 137:19–30
- McGowan CR, Davidson EA, Woram RA, Danzmann RG, Ferguson MM, Davidson WS (2004) Ten polymorphic microsatellite markers from Arctic charr (*Salvelinus alpinus*): linkage analysis and amplification in other salmonids. *Anim Genet* 35:479-481
- O'Connell M, Wright JM (1997) Microsatellite DNA in fishes. *Reviews in fish biology and fisheries* 7:331-363
- Olsen JB, Bentzen P, Seeb JE (1998) Characterization of seven microsatellite loci derived from pink salmon. *Mol Ecol* 7:1087-1089

- O'Reilly PT, Hamilton LC, McConnell SK, Wright JM (1996) Rapid analysis of genetic variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites. *Can J Fish Aquat Sci* 53:2292–2298
- Paterson S, Piertney SB, Knox D, Gilbey J, Verspoor E (2004) Characterization and PCR multiplexing of novel highly variable tetranucleotide Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) microsatellites. *Mol Ecol Notes* 4:160-162
- Raymond R, Rousset F (1995) *GENEPOP* (Version 1.2): population genetic software for exact tests and ecumenism. *J Hered* 86:248-249
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425
- Slate J, Marshall T, Pemberton J (2000) A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program CERVUS. *Mol Ecol* 6:801-808
- Slettan A, Olsaker I, Lie O (1995) Atlantic salmon, *Salmo salar*, microsatellites at the SSOSL25, SSOSL85, SSOSL311, SSOSL417 loci. *Anim Genet* 26:281-282
- Slettan A, Olsaker I, Lie O (1997) Segregation studies and linkage analysis of Atlantic salmon microsatellites using haploid genetics. *Heredity* 78 (Pt 6):620-627
- Sønstebø JH, Borgstrøm R, Heun M (2007) Genetic structure of brown trout (*Salmo trutta* L.) from the Hardangervidda mountain plateau (Norway) analyzed by microsatellite DNA: a basis for conservation guidelines. *Conserv Genet* 8:33-44
- Taylor EB, Redenbach Z, Costello AB, Pollard SM, Pacas CJ (2001) Nested analysis of genetic diversity in northwestern North American char, Dolly Varden (*Salvelinus malma*) and bull trout (*S. confluentus*). *Can J Fish Aquat Sci* 58:406-420
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535–538
- Williamson KS, Cordes JF, May B (2002) Characterization of microsatellite loci in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and cross-species amplification in other salmonids. *Mol Ecol Notes* 2:17-19

VIÐAUKI 1

Niðurstöður líkindaprófs fyrir Hardy–Weinberg frávik og Fst gildi fyrir ljósu og dökku línu eldisstofns Hólaskóla.

=====
Results by population
=====

Pop: Dökka línan, sýni merkt 101-182

Fis:

LOCUS	P-val	S.E	W&C	R&H	Matr
SalD39SFU	0.1380	0.0161	-0.164	-0.053	-
Sfo23	0.1331	0.0170	-0.073	-0.040	-
Ble5	0.1756	0.0194	+0.027	+0.004	-
SalJ81SFU	0.8461	0.0074	-0.024	-0.027	-
Smm17	0.1876	0.0057	-0.135	-0.115	-
Smm24	0.5673	0.0201	+0.029	+0.001	-
SsaD157	0.0065	0.0003	+1	+1	-
Ble7	0.8662	0.0045	-0.017	-0.036	-
Omy301UoG-Prok	0.0326	0.0052	-0.157	-0.075	-
One11ASC-Prok	0.7180	0.0012	-0.076	-0.077	-
Smm10	0.2405	0.0098	-0.012	+0.052	-
Ssa422UoS	0.4851	0.0104	+0.070	+0.041	-
Ssa410UoS	0.7250	0.0149	-0.068	-0.037	-
Ble2	0.6810	0.0127	-0.045	+0.014	-
Smm22	0.8898	0.0125	-0.002	+0.004	-
SSOSL456	0.1419	0.0138	+0.002	+0.072	-
Ssa408UoS	0.8045	0.0124	-0.082	-0.052	-

All (Fisher's method) :

chi2 : 44.4305

Df : 34

Prob: 0.1086 (Hardy-Weinberg)

Pop: Ljósa línan, sýni merkt 301-388

Fis:

LOCUS	P-val	S.E	W&C	R&H	Matr
SalD39SFU	0.3988	0.0128	-0.169	-0.093	-
Sfo23	0.8557	0.0141	-0.050	-0.036	-
Ble5	0.9847	0.0066	-0.055	-0.036	-
SalJ81SFU	0.4319	0.0097	-0.007	+0.003	-
Smm17	0.1159	0.0058	+0.077	-0.001	-
Smm24	0.8161	0.0100	+0.045	+0.041	-
SsaD157	0.5758	0.0011	-0.163	-0.164	-
Ble7	0.6594	0.0041	+0.060	+0.072	-
Omy301UoG-Prok	0.8260	0.0149	+0.029	+0.012	-
One11ASC-Prok	0.0886	0.0032	-0.264	-0.149	-
Smm10	0.0474	0.0046	-0.070	-0.035	-
Ssa422UoS	0.5487	0.0048	-0.181	-0.139	-
Ssa410UoS	0.1488	0.0097	-0.092	-0.016	-
Ble2	0.0345	0.0025	+0.173	+0.214	-
Smm22	0.1021	0.0136	+0.064	+0.007	-
SSOSL456	0.6444	0.0177	-0.058	-0.046	-
Ssa408UoS	0.9764	0.0027	-0.013	-0.014	-

All (Fisher's method) :

chi2 : 39.0754

Df : 34

Prob: 0.2523 (Hardy-Weinberg)

=====
All locus, all populations
=====

All (Fisher's method) :

Chi2: 83.505952

Df : 68

Prob: 0.097423

Population pairwise FSTs

Distance method: Pairwise differences

	1	2
1	0.00000	
2	0.08992	0.00000

VIÐAUKI 2

Niðurstöður tengslaggreiningar með Markov og Fisher's útreikningum fyrir ljósu og dökku línu eldisstofns Hólaskóla. Rauður texti: Tengsl greinast á milli erfðamarkanna.

Stofn	Locus#1	Locus#2	P-Value	S.E.	Stofn	Locus#1	Locus#2	P-Value	S.E.
Dökka	SalD39SFU	Smm17	0	0	Ljósi	Smm10	SSOSL456	0	0
Dökka	Ble5	Ssa422UoS	0	0	Ljósi	SalJ81SFU	Smm17	0,00312	0,00195
Dökka	Smm10	SSOSL456	0	0	Ljósi	SalD39SFU	Smm17	0,01184	0,00503
Dökka	Ble5	Ble7	0,01458	0,00785	Ljósi	Ble7	Omy301UoG	0,0155	0,00481
Dökka	Ssa410UoS	Smm22	0,01518	0,00862	Ljósi	SalJ81SFU	Smm24	0,02769	0,00929
Dökka	Ble2	Smm22	0,02127	0,00724	Ljósi	One11ASC	SSOSL456	0,02835	0,00556
Dökka	SalJ81SFU	SSOSL456	0,02373	0,00771	Ljósi	Ble7	Ble2	0,029	0,00689
Dökka	One11ASC	SSOSL456	0,03036	0,0038	Ljósi	SsaD157	Ssa422UoS	0,03736	0,00215
Dökka	SalJ81SFU	Ble7	0,04447	0,00829	Ljósi	Smm22	SSOSL456	0,03762	0,01204
Dökka	Ssa422UoS	Ssa408UoS	0,0473	0,0105	Ljósi	One11ASC	Ble2	0,0392	0,0069
Dökka	Smm24	Ble7	0,05168	0,01169	Ljósi	Ble5	Ssa422UoS	0,04525	0,01257
Dökka	Omy301UoG	Ble2	0,05919	0,01182	Ljósi	SalD39SFU	Ble2	0,0479	0,00927
Dökka	SalJ81SFU	Ble2	0,06526	0,01036	Ljósi	Smm17	Omy301UoG	0,04833	0,00944
Dökka	Smm10	Ssa408UoS	0,06785	0,01457	Ljósi	SsaD157	Omy301UoG	0,05255	0,00404
Dökka	Ssa422UoS	Ble2	0,0682	0,01022	Ljósi	SsaD157	Ble7	0,0543	0,00247
Dökka	Ssa422UoS	SSOSL456	0,08193	0,01545	Ljósi	Smm17	Smm24	0,05957	0,00929
Dökka	Omy301UoG	Ssa422UoS	0,09354	0,0157	Ljósi	Ssa410UoS	Ssa408UoS	0,06753	0,01321
Dökka	Sfo23	Ble5	0,09633	0,0204	Ljósi	SalD39SFU	One11ASC	0,06848	0,00679
Dökka	One11ASC	Ssa422UoS	0,09779	0,00574	Ljósi	Ble5	Ssa410UoS	0,07651	0,01775
Dökka	Ble5	SalJ81SFU	0,11388	0,01815	Ljósi	One11ASC	Smm10	0,08535	0,00969
Dökka	Smm17	SsaD157	0,11925	0,00385	Ljósi	Ssa422UoS	Ssa408UoS	0,09075	0,01097
Dökka	Smm10	Ssa410UoS	0,12022	0,01989	Ljósi	SalD39SFU	Smm22	0,10453	0,01808
Dökka	SalD39SFU	Smm24	0,12188	0,02112	Ljósi	Ssa422UoS	Ble2	0,10608	0,01066
Dökka	Smm17	Ssa410UoS	0,1317	0,01831	Ljósi	Sfo23	Ssa408UoS	0,11029	0,01782
Dökka	Sfo23	Smm22	0,13605	0,0235	Ljósi	Omy301UoG	Ble2	0,11294	0,01677
Dökka	Smm10	Ssa422UoS	0,14713	0,01715	Ljósi	Ble7	One11ASC	0,1134	0,00879
Dökka	Ble5	Ssa408UoS	0,15725	0,02507	Ljósi	Ble7	SSOSL456	0,12059	0,01737
Dökka	Smm17	Omy301UoG	0,16602	0,02019	Ljósi	SalJ81SFU	SsaD157	0,12137	0,00481
Dökka	Smm24	Ssa410UoS	0,16849	0,02572	Ljósi	Ble7	Smm22	0,12907	0,01695
Dökka	Smm17	One11ASC	0,18689	0,00721	Ljósi	Smm10	Ssa410UoS	0,13237	0,01904
Dökka	SalJ81SFU	Ssa422UoS	0,20453	0,01882	Ljósi	Smm17	Smm22	0,19315	0,01899
Dökka	Smm17	SSOSL456	0,20482	0,02037	Ljósi	Omy301UoG	Smm22	0,20459	0,02653
Dökka	SalJ81SFU	Smm10	0,2081	0,02181	Ljósi	Smm24	Ble2	0,21358	0,02153
Dökka	Ble5	Smm17	0,20907	0,02291	Ljósi	Ble2	Ssa408UoS	0,21912	0,01889
Dökka	Smm22	SSOSL456	0,21324	0,02803	Ljósi	SalD39SFU	Ssa410UoS	0,23385	0,02177
Dökka	Sfo23	One11ASC	0,22339	0,01218	Ljósi	Smm17	SSOSL456	0,24358	0,02054
Dökka	Ble7	One11ASC	0,23275	0,00808	Ljósi	SalJ81SFU	Ssa422UoS	0,24842	0,01928
Dökka	Ble5	One11ASC	0,23798	0,01539	Ljósi	Omy301UoG	Smm10	0,25016	0,02584
Dökka	Ssa410UoS	SSOSL456	0,23886	0,02879	Ljósi	SsaD157	Ssa410UoS	0,25315	0,00741
Dökka	SsaD157	Omy301UoG	0,24776	0,00954	Ljósi	SalD39SFU	Smm24	0,25718	0,0265
Dökka	Omy301UoG	One11ASC	0,26542	0,01187	Ljósi	Sfo23	Ssa422UoS	0,26019	0,0188
Dökka	SsaD157	Ssa410UoS	0,26596	0,01032	Ljósi	Smm17	Ble2	0,27744	0,01653
Dökka	Smm24	Omy301UoG	0,2858	0,03057	Ljósi	SalJ81SFU	Smm22	0,29486	0,02742
Dökka	Smm17	Ble7	0,28586	0,01913	Ljósi	SalJ81SFU	Ble2	0,31675	0,02098
Dökka	Ble2	SSOSL456	0,29107	0,02358	Ljósi	SalJ81SFU	Ble7	0,32335	0,02045
Dökka	Smm24	SsaD157	0,29131	0,01122	Ljósi	SalD39SFU	SalJ81SFU	0,33636	0,0222
Dökka	SalD39SFU	Omy301UoG	0,29272	0,02711	Ljósi	One11ASC	Ssa410UoS	0,33872	0,01177
Dökka	Ble5	Ssa410UoS	0,30219	0,03183	Ljósi	Smm22	Ssa408UoS	0,34014	0,02907
Dökka	Omy301UoG	Ssa408UoS	0,30389	0,02832	Ljósi	Smm24	Smm10	0,34778	0,0291
Dökka	Smm24	Ssa422UoS	0,31742	0,02715	Ljósi	SalD39SFU	SsaD157	0,35204	0,00617
Dökka	SalJ81SFU	Smm22	0,32468	0,02856	Ljósi	One11ASC	Ssa422UoS	0,35734	0,01071
Dökka	Smm17	Ble2	0,32764	0,01952	Ljósi	Smm24	Ssa408UoS	0,36003	0,02803
Dökka	SalJ81SFU	Smm17	0,33246	0,01909	Ljósi	Sfo23	Ble7	0,36184	0,02478
Dökka	Omy301UoG	Smm10	0,33258	0,03093	Ljósi	Smm24	One11ASC	0,36584	0,02027
Dökka	Smm24	Ssa408UoS	0,3427	0,0316	Ljósi	SalD39SFU	Omy301UoG	0,36687	0,02719
Dökka	Ble2	Ssa408UoS	0,3436	0,0254	Ljósi	Sfo23	Ble2	0,38489	0,02898
Dökka	SalJ81SFU	Ssa410UoS	0,35726	0,02825	Ljósi	Ble7	Ssa408UoS	0,39259	0,01953
Dökka	SalD39SFU	Ssa408UoS	0,38593	0,0308	Ljósi	Smm24	Ssa422UoS	0,40352	0,02565
Dökka	SalD39SFU	Ble5	0,39306	0,03268	Ljósi	Ble5	Ble7	0,40354	0,02854
Dökka	Sfo23	Ssa408UoS	0,39868	0,03263	Ljósi	SalJ81SFU	SSOSL456	0,40492	0,0296
Dökka	SalJ81SFU	Smm24	0,39899	0,0298	Ljósi	Sfo23	Omy301UoG	0,44407	0,03211
Dökka	One11ASC	Ble2	0,41705	0,00824	Ljósi	Ble2	SSOSL456	0,44764	0,02885
Dökka	Smm17	Smm22	0,41898	0,0296	Ljósi	Omy301UoG	SSOSL456	0,45309	0,0332
Dökka	Smm24	One11ASC	0,4209	0,01524	Ljósi	Ssa422UoS	SSOSL456	0,45751	0,02517
Dökka	Smm24	SSOSL456	0,47145	0,03424	Ljósi	Omy301UoG	Ssa408UoS	0,46461	0,03028
Dökka	Sfo23	Smm17	0,49175	0,02902	Ljósi	SalJ81SFU	One11ASC	0,47329	0,01652
Dökka	Ssa422UoS	Ssa410UoS	0,49541	0,03011	Ljósi	Smm17	Smm10	0,47581	0,02071
Dökka	Sfo23	Ssa422UoS	0,50068	0,03026	Ljósi	Smm17	Ble7	0,48515	0,01573
Dökka	Smm10	Ble2	0,50196	0,02286	Ljósi	Smm10	Smm22	0,50024	0,03042
Dökka	SalJ81SFU	Ssa408UoS	0,50776	0,02716	Ljósi	SalD39SFU	Ble7	0,51089	0,02261
Dökka	Ble7	Smm10	0,50816	0,02461	Ljósi	Ssa410UoS	SSOSL456	0,52283	0,03245

Dökka	Ssa422UoS	Smm22	0,53408	0,031	Ljósi	SsaD157	Ble2	0,53068	0,006
Dökka	Sfo23	Smm24	0,57607	0,03434	Ljósi	Smm17	Ssa422UoS	0,53898	0,01508
Dökka	Ble7	Smm22	0,57671	0,03052	Ljósi	SalJ81SFU	Smm10	0,53961	0,02661
Dökka	Smm10	Smm22	0,57678	0,03238	Ljósi	Sfo23	One11ASC	0,54145	0,0149
Dökka	Ble7	Ssa410UoS	0,57844	0,02861	Ljósi	Omy301UoG	Ssa410UoS	0,54735	0,03044
Dökka	Ble7	Ssa408UoS	0,5812	0,02734	Ljósi	SsaD157	Smm22	0,57233	0,00864
Dökka	Ble5	Ble2	0,59425	0,02859	Ljósi	Smm17	Ssa410UoS	0,57661	0,02305
Dökka	Smm17	Ssa422UoS	0,59503	0,02033	Ljósi	One11ASC	Ssa408UoS	0,58718	0,01466
Dökka	Ble7	Omy301UoG	0,61688	0,02743	Ljósi	Ble5	Smm17	0,5958	0,02862
Dökka	Ssa410UoS	Ble2	0,63144	0,02782	Ljósi	One11ASC	Smm22	0,63447	0,01961
Dökka	SalD39SFU	Ssa422UoS	0,63316	0,02478	Ljósi	Smm24	Ssa410UoS	0,64311	0,03085
Dökka	SalJ81SFU	One11ASC	0,64224	0,00943	Ljósi	Smm17	SsaD157	0,68143	0,0043
Dökka	SsaD157	Ble7	0,64416	0,00805	Ljósi	SsaD157	One11ASC	0,69928	0,00339
Dökka	SsaD157	Smm10	0,64997	0,00955	Ljósi	Ble5	One11ASC	0,70047	0,01767
Dökka	SalJ81SFU	SsaD157	0,65065	0,00958	Ljósi	Smm24	Omy301UoG	0,70766	0,03005
Dökka	Sfo23	Ble2	0,66582	0,02711	Ljósi	Smm10	Ssa408UoS	0,71047	0,02131
Dökka	Ble7	Ble2	0,66696	0,01864	Ljósi	Ble7	Ssa410UoS	0,71071	0,02122
Dökka	Ble7	SSOSL456	0,67046	0,02555	Ljósi	SSOSL456	Ssa408UoS	0,76306	0,02426
Dökka	SsaD157	SSOSL456	0,67892	0,01251	Ljósi	Smm17	One11ASC	0,7651	0,00835
Dökka	One11ASC	Ssa408UoS	0,68043	0,01243	Ljósi	SsaD157	Ssa408UoS	0,7662	0,00516
Dökka	SalD39SFU	SalJ81SFU	0,7022	0,02276	Ljósi	Ssa422UoS	Smm22	0,79418	0,02093
Dökka	Ble5	Omy301UoG	0,70299	0,03092	Ljósi	Smm24	SsaD157	0,79722	0,00646
Dökka	Omy301UoG	SSOSL456	0,71186	0,02935	Ljósi	SsaD157	Smm10	0,82104	0,00437
Dökka	SalD39SFU	Ble2	0,74153	0,02083	Ljósi	SalJ81SFU	Omy301UoG	0,82628	0,02241
Dökka	Sfo23	Omy301UoG	0,7561	0,02958	Ljósi	SsaD157	SSOSL456	0,83039	0,00538
Dökka	Smm17	Smm10	0,77858	0,0188	Ljósi	Ble7	Ssa422UoS	0,83599	0,01102
Dökka	Ssa410UoS	Ssa408UoS	0,79993	0,02632	Ljósi	Smm17	Ssa408UoS	0,85061	0,01278
Dökka	Ble7	Ssa422UoS	0,80726	0,01761	Ljósi	Smm10	Ble2	0,85112	0,0145
Dökka	SsaD157	Ssa408UoS	0,8077	0,01202	Ljósi	Omy301UoG	One11ASC	0,85161	0,01257
Dökka	Smm17	Smm24	0,81794	0,01929	Ljósi	Sfo23	SsaD157	0,8542	0,00555
Dökka	Sfo23	SalJ81SFU	0,82171	0,02131	Ljósi	SalJ81SFU	Ssa408UoS	0,87287	0,01461
Dökka	SalJ81SFU	Omy301UoG	0,82697	0,01999	Ljósi	Ssa410UoS	Smm22	0,87492	0,01985
Dökka	Ble5	SSOSL456	0,83177	0,02615	Ljósi	SalD39SFU	Ssa422UoS	0,87997	0,00974
Dökka	Omy301UoG	Smm22	0,83253	0,02571	Ljósi	Smm24	Ble7	0,90369	0,01419
Dökka	One11ASC	Smm10	0,846	0,00758	Ljósi	Ble5	SsaD157	0,92332	0,00428
Dökka	SalD39SFU	Ble7	0,85371	0,01677	Ljósi	Smm10	Ssa422UoS	0,94141	0,00812
Dökka	SsaD157	Smm22	0,85943	0,01464	Ljósi	Ssa410UoS	Ble2	0,9492	0,00914
Dökka	Ble5	Smm10	0,86632	0,02318	Ljósi	Ssa422UoS	Ssa410UoS	0,95821	0,0047
Dökka	SalD39SFU	SSOSL456	0,87333	0,02086	Ljósi	SalD39SFU	Ssa408UoS	0,96	0,00764
Dökka	SalD39SFU	Ssa410UoS	0,89311	0,0203	Ljósi	SalJ81SFU	Ssa410UoS	0,96495	0,00721
Dökka	One11ASC	Ssa410UoS	0,89739	0,00801	Ljósi	SalD39SFU	Smm10	0,96776	0,00725
Dökka	One11ASC	Smm22	0,90112	0,00922	Ljósi	Ble2	Smm22	0,9746	0,00867
Dökka	Sfo23	SsaD157	0,90665	0,01041	Ljósi	Ble7	Smm10	0,99428	0,00179
Dökka	Smm17	Ssa408UoS	0,90881	0,01372	Ljósi	Omy301UoG	Ssa422UoS	0,99668	0,00179
Dökka	SalD39SFU	Smm22	0,91354	0,01705	Ljósi	SalD39SFU	Sfo23	1	0
Dökka	Smm24	Ble2	0,91589	0,01369	Ljósi	Sfo23	SalJ81SFU	1	0
Dökka	Omy301UoG	Ssa410UoS	0,92548	0,01697	Ljósi	Ble5	SalJ81SFU	1	0
Dökka	Sfo23	Ble7	0,92586	0,01386	Ljósi	Sfo23	Smm17	1	0
Dökka	SSOSL456	Ssa408UoS	0,93034	0,01629	Ljósi	Sfo23	Smm24	1	0
Dökka	SalD39SFU	One11ASC	0,9358	0,00489	Ljósi	Ble5	Smm24	1	0
Dökka	Smm24	Smm10	0,97207	0,01043	Ljósi	Ble5	Omy301UoG	1	0
Dökka	Smm22	Ssa408UoS	0,9794	0,0095	Ljósi	Sfo23	Smm10	1	0
Dökka	SalD39SFU	Smm10	0,97954	0,00796	Ljósi	Ble5	Smm10	1	0
Dökka	Sfo23	Smm10	0,98259	0,00824	Ljósi	Sfo23	Ssa410UoS	1	0
Dökka	SalD39SFU	Sfo23	1	0	Ljósi	Ble5	Ble2	1	0
Dökka	Ble5	Smm24	1	0	Ljósi	Sfo23	Smm22	1	0
Dökka	SsaD157	One11ASC	1	0	Ljósi	Ble5	Smm22	1	0
Dökka	Sfo23	Ssa410UoS	1	0	Ljósi	Smm24	Smm22	1	0
Dökka	SsaD157	Ble2	1	0	Ljósi	SalD39SFU	SSOSL456	1	0
Dökka	Ble5	Smm22	1	0	Ljósi	Sfo23	SSOSL456	1	0
Dökka	Smm24	Smm22	1	0	Ljósi	Ble5	SSOSL456	1	0
Dökka	Sfo23	SSOSL456	1	0	Ljósi	Smm24	SSOSL456	1	0
Dökka	SalD39SFU	SsaD157	Not	possible	Ljósi	Ble5	Ssa408UoS	1	0
Dökka	Ble5	SsaD157	Not	possible	Ljósi	SalD39SFU	Ble5	no i	nformation
Dökka	SsaD157	Ssa422UoS	Not	possible	Ljósi	Sfo23	Ble5	no i	nformation