

مجله تاکسونومی و بیوسیتماژیک، سال اول، شماره اول، زمستان ۱۳۸۸، صفحه ۸۰-۷۳

## شواهدی از انتخاب متعادل چند شکلی های *PAH-BglIII* و *PAH-EcoRI* در جمعیت اصفهان

زهرا فاضلی عطار، کارشناس ارشد ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران  
صادق ولیان بروجنی، دانشیار ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران\*

### چکیده

دو مارکر چندشکلی *BglIII* و *EcoRI* در اینترون ۱ و اینترون ۵ ژن فنیل آلانین هیدروکسیلاز (Phenylalanine Hydroxylase, PAH) شناخته شدند. برای آزمودن اینکه آیا این چندشکلی ها به مانند آلل های خنثی عمل می کنند یا در معرض فشار انتخاب در جمعیت اصفهان قرار دارند، ۱۱۰ فرد با روش PCR-RFLP تعیین ژنوتیپ گردیدند. فایل ورودی Arlequin با استفاده از اطلاعات هاپلو تپی با فاز شناخته شده آماده شد و آزمون های Neutrality (آزمون D تاجیما و آزمون Fu's Fs) با استفاده از برنامه Arlequin انجام شد. ۴۲ فرد در هر دو چندشکلی هتروزیگوت بودند و فاز هاپلو تپی آن ها ناشناخته باقی ماند. فاز هاپلو تپی *BglIII-EcoRI* فقط در ۶۸ فرد شناخته شد که برای آماده سازی فایل ورودی استفاده گردید. مقدار D تاجیما و مقدار Fs در جمعیت اصفهان به ترتیب ۱/۷ و ۱/۰۲ است. مقدار مثبت Fs و  $D > 0$  بیانگر آن است که این چندشکلی ها در جمعیت اصفهان تحت انتخاب متعادل هستند. اگرچه این چندشکلی ها در ناحیه غیر کد کننده ژن *PAH* قرار دارند، ولی آن ها آلل های خنثی نیستند و مقدار مثبت این آزمون ها، شواهدی برای انتخاب متعادل این چندشکلی ها در جمعیت اصفهان فراهم می سازند. نتایج این مطالعه می تواند درک ما را از تاریخ تکاملی و ساختار جمعیت اصفهان بهبود بخشد.

واژه های کلیدی: آزمون Neutrality، برنامه Arlequin، چندشکلی DNA، ژن *PAH*

### مقدمه

استفاده از آن ها می توان جایگزینی های نوکلئوتیدی را که به مانند آلل های خنثی عمل می کنند و یا در معرض فشار انتخاب در یک جمعیت قرار دارند بررسی کرد. یکی از آزمون های Neutrality که برای بررسی اثر فشار انتخاب بر روی یک ژن به کار برده می شود، D تاجیما (Tajima's D) است. این آزمون بر اساس مقایسه تنوع نوکلئوتیدی

مطابق با تئوری مولکولی تکامل خنثی، اکثر چندشکلی های DNA از لحاظ انتخاب خنثی هستند و تغییر در فراوانی آللی این لوکوس ها به دلیل رانش ژنتیکی تصادفی و به ندرت به دلیل انتخاب است. امروزه آزمون های Neutrality متعددی توسعه یافته است که با

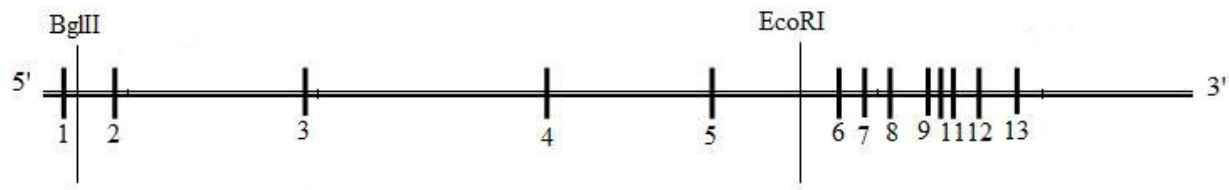
ژن فنیل آلانین هیدروکسیلاز (Phenylalanine Hydroxylase, PAH)، آنزیم فنیل آلانین ۴-مونوهیدروکسیلاز را کد می کند که تبدیل غیر قابل برگشت فنیل آلانین به تیروزین را بر عهده دارد. این آنزیم به طور طبیعی در کبد بیان می شود که بیان آن با مقدار کمتری در کلیه هم مشاهده شده است. از آن جهت که هیدروکسیلاسیون فنیل آلانین، مرحله محدودکننده سرعت در کاتابولیسم فنیل آلانین است، کمبود آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز باعث بروز فنوتیپ PKU می گردد (Kwok et al. and 1985; Madden, 2004). از جمله چندشکلی هایی که در ناحیه ژن PAH شناسایی شده است، مارکرهای چندشکلی با طول قطعات محدودکننده (RFLP) است. مارکرهای پلی مورف موجود در ناحیه ژنی با توجه به پیوستگی کاملی که با ژن PAH دارند، دارای کاربرد فراوانی در تحلیل پیوستگی ژن با جهش های ژنی هستند (Fazeli and Vallian, 2009). از جمله کاربرد آنها می توان به شناسایی ناقلان بیماری در خانواده های افراد بیمار اشاره نمود (Dworniczak et al., 1991).

با توجه به تفاوت فراوانی آللی و درجه هتروزیگوتی پلی مورف در جمعیت های مختلف، ضروری است قبل از به کارگیری مارکرهای مزبور، وضعیت آنها در جمعیت مورد مطالعه، مورد بررسی دقیق جمعیت شناختی قرار گیرد. در این مطالعه، دو مارکر چندشکلی BglIII و EcoRI که به ترتیب در اینترون ۱ و اینترون ۵ ژن PAH قرار دارند (شکل ۱) برای مطالعه آزمون Neutrality در جمعیت اصفهان انتخاب شدند. نتایج این مطالعه می تواند درک ما را از اثر فشار انتخاب بر روی ژن PAH در جمعیت اصفهان افزایش دهد.

حاصل از تعداد و تنوع نوکلئوتیدی حاصل از فراوانی آللی جایگاه های چند شکلی است (Carlson et al., 2005; Tajima, 1989). با استفاده از آزمون D تاجیما و سایر آزمون های Neutrality، مانند آزمون های Wu's H و Fu's Fs، که برای آزمون تئوری خنثی به کار برده می شوند، مشخص شده است که طیف فراوانی جایگاه چندشکلی ژن های گروه خونی ABO (Hughes and HLA, Seltsam et al., 2003) (Yeager, 1998)، لاکتاز (Bersaglieri et al., 2004) و TRPV6 (Akey et al., 2004; Stajich and TRPV6) (Hahn, 2005) با تئوری خنثی سازگار نیستند.

ژن هایی که تنوع فراوانی آللی آنها بالاست (همانند آنچه در مورد ژن های ABO و HLA مشاهده شده است) D تاجیما مثبت دارند و با انتخاب متعادل در جمعیت همراه هستند، در حالی که، ژن هایی که تنوع فراوانی آللی آنها پایین است (مانند لاکتاز و TRPV6) D تاجیما منفی دارند و با فشار انتخابی همراه هستند که یک واریانت سودمند را در جمعیت جایگزین سایر واریانت ها کرده است. ژن هایی که به تازگی در معرض انتخاب قرار گرفته اند و آلل سودمند هنوز آلل اصلی در جمعیت نشده است، برای مثال ژن Duffy (Hamblin and Di Rienzo, 2002) و ژن CCR5 (Claustres et al., 1998) به سادگی با استفاده از آزمون D تاجیما قابل مطالعه نیستند، در حالی که آنها را می توان با استفاده از آزمون Wu's بررسی کرد.

از جمله آزمون های Neutrality دیگری که برای مطالعه تأثیر انتخاب بر روی یک ژن به کار برده می شود، آزمون Ewens-Watterson (آزمون E-W) است. با استفاده از آزمون E-W می توان بررسی کرد که اثر انتخاب بر روی یک ژن در جمعیت جهت دار یا متعادل است (Watterson, 1978).



شکل ۱- جایگاه مارکرهای چندشکلی *BglIII* و *EcoRI* که به ترتیب در اینترون ۱ و اینترون ۵ ژن *PAH* قرار دارند. ژن *PAH* دارای ۱۳ اگزون است. اگزون‌ها در ژن *PAH* با اعداد ۱-۱۳ مشخص شدند.

## مواد و روش‌ها

### تهیه نمونه

در این مطالعه، نمونه خون از ۱۱۰ فرد غیرخویشاوند از جمعیت اصفهان گرفته شد که زیرمجموعه‌ای از جمعیت اصفهان هستند. بنابراین، نتایج به دست آمده را می‌توان به تمام جمعیت اصفهان نسبت داد.

### استخراج DNA ژنومی و انجام PCR

از نمونه‌های خونی تهیه شده، DNA ژنومی با روش اصلاح شده استاندارد رسوب نمک استخراج شد (Miller *et al.*, 1988). پس از آن، ناحیه مربوط به دو مارکر ژن *PAH*، *PAH-BglIII* و *PAH-EcoRI* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر شد (Dworniczak *et al.*, 1991; Kidd, 2002). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۱۰ پیکو مول از هر پرایمر، ۲/۵ واحد آنزیم Taq پلیمرز و مخلوط dNTP در غلظت نهایی ۱۰ میلی مولار، در بافر 10X همراه PCR و  $MgCl_2$  انجام شد. پس از آن ژنوتیپ محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ تعیین شد.

### هضم آنزیمی محصول PCR

پس از انجام PCR، به منظور تعیین حضور یا عدم حضور جایگاه شکست آنزیم‌های *BglIII* و *EcoRI*، هضم آنزیمی بر روی محصولات تکثیر جایگاه‌های *BglIII* و *EcoRI* انجام شد. هضم آنزیمی محصول PCR با هر

کدام از این آنزیم‌ها بدین صورت انجام شد که به یک ویال ۱۰ میکروگرم از نمونه DNA محصول PCR به همراه ۵ واحد از آنزیم (۰/۵ میکرولیتر از آنزیم) و ۲/۵ میکرولیتر بافر اضافه گردید و با آب دو بار تقطیر به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. ویال حاوی مخلوط واکنش هضم آنزیمی به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در بن ماری قرار داده شد تا هضم آنزیمی کامل گردد. محصولات هضم آنزیمی توسط الکتروفورز با ژل ۱/۵ درصد آگاروز بررسی گردید (Fazeli and Vallian, 2009).

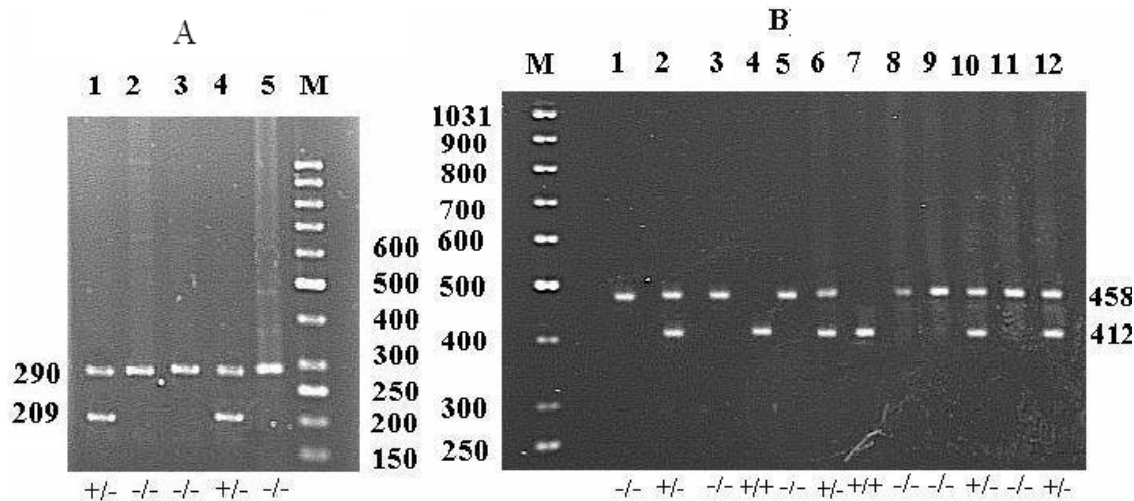
### آنالیزهای آماری

اطلاعات اولیه‌ای که برنامه Arlequin برای تخمین آزمون Neutrality استفاده می‌کند، باید از نوع توالی DNA یا اطلاعات مربوط به مارکرهای RFLP با فاز گامتی شناخته شده باشند (Schneider *et al.*, 2000). در این مطالعه، از اطلاعات هاپلوتیپی با فاز گامتی شناخته شده دو مارکر RFLP برای تخمین آزمون‌های Neutrality (آزمون‌های D تاجیما و Fu's Fs و آزمون E-W) در جمعیت اصفهان استفاده گردید. همچنین با استفاده از همین برنامه، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و هتروزیگوسیتی مشاهده شده این دو مارکر در جمعیت اصفهان تخمین زده شد.

## مشاهدات

امروزه به منظور بررسی اثر فشار انتخاب بر روی یک ژن در جمعیت از آزمون‌های Neutrality استفاده می‌گردد. در این مطالعه از اطلاعات هاپلوتیپی *BglIII-EcoRI* در ژن *PAH* برای تخمین D تاجیما، Fs و اجرای آزمون E-W (آزمون‌های Neutrality) استفاده گردید. مارکرهای *EcoRI* و *BglIII* به ترتیب در اینترون ۱ و اینترون ۵ ژن *PAH* قرار دارند (شکل ۱). تخمین فاز هاپلوتیپی با استفاده از تعیین ژنوتیپ دو مارکر *BglIII* و *EcoRI* در ۱۱۰ فرد غیر خویشاوند انجام گرفت. تکثیر ناحیه مربوط به مارکر *BglIII* و *EcoRI* به ترتیب قطعه‌ای با طول ۲۹۰ و ۴۵۸ جفت بازی تولید کرد که در صورت حضور جایگاه شکست آنزیم *BglIII* و *EcoRI* به ترتیب به قطعاتی با طول ۲۰۹ و ۸۱ جفت بازی و طول ۴۱۲ و ۴۶ جفت بازی شکسته شدند (شکل ۲).

فاز گامتی هاپلوتیپ *BglIII-EcoRI* مشاهده شده در ۱۱۰ فرد مورد مطالعه در جمعیت اصفهان در جدول ۱ نشان داده شده است. برای هر هاپلوتیپ اعداد از چپ به راست به ترتیب نشان‌دهنده آلل *EcoRI*، *BglIII* در ژن *PAH* است. برای مارکرهای *BglIII* و *EcoRI* اعداد ۰ و ۱ به ترتیب حضور (+) و عدم حضور (-) جایگاه شکست آنزیم محدودکننده را مشخص می‌کند. در اطلاعات ژنوتیپی، اعداد ۰، ۱ و ۲ به ترتیب برابر با ژنوتیپ‌های +/+, +/- و +/- است. با استفاده از اطلاعات ژنوتیپی، تنها فاز گامتی هاپلوتیپ *BglIII-EcoRI* در ۶۸ فرد تعیین گردید. ژنوتیپ ۴۲ فرد مورد مطالعه در هر دو مارکر *BglIII* و *EcoRI* هتروزیگوت بود. بنابراین، فاز هاپلوتیپی در این افراد ناشناخته باقی ماند.



شکل ۲- بررسی وضعیت ژنوتیپی مارکرهای *Eco RI* و *Bgl II* در جمعیت اصفهان

تعیین ژنوتیپ (A) مارکر *Bgl II* (B) *Eco RI*. به منظور بررسی وضعیت ژنوتیپی مارکرهای مزبور DNA ژنومی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر شده و سپس توسط آنزیم‌های محدود کننده مورد هضم قرار گرفته است. چنانکه در شکل نشان داده شده است، اطلاعات ژنوتیپی برای افراد هموزیگوت منفی، هموزیگوت مثبت و هتروزیگوت به ترتیب به صورت -/-، +/-، +/+ و +/- نشان داده شده‌اند. M نشان‌دهنده مارکر اندازه است. برای اطلاعات بیشتر به متن رجوع شود.

جدول ۱- فازهای گامتی هاپلوتیپ *BglIII-EcoRI* مشاهده شده در ۱۱۰ فرد مورد مطالعه جمعیت اصفهان

| اطلاعات ژنوتیپی | فازهای گامتی هاپلوتیپ | فراوانی (تعداد افراد) |
|-----------------|-----------------------|-----------------------|
| ۱۲              | ۱۱                    | ۵                     |
|                 | ۱۰                    |                       |
| ۰۲              | ۰۱                    | ۴۲                    |
|                 | ۰۰                    |                       |
| ۲۱              | ۱۱                    | ۱۲                    |
|                 | ۰۱                    |                       |
| ۱۰              | ۱۰                    | ۱                     |
|                 | ۱۰                    |                       |
| ۲۰              | ۱۰                    | ۲                     |
|                 | ۰۰                    |                       |
| ۰۰              | ۰۰                    | ۲                     |
|                 | ۰۰                    |                       |
| ۰۱              | ۰۱                    | ۴                     |
|                 | ۰۱                    |                       |
| ۲۲              | نامشخص                | ۴۲                    |

شده و هتروزیگوسیتی مورد انتظار این دو مارکر در جمعیت اصفهان از اطلاعات ژنوتیپی ۱۱۰ فرد استفاده گردید. میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار و هتروزیگوسیتی مشاهده شده دو مارکر *EcoRI* و *BglIII* در جمعیت اصفهان که با استفاده از برنامه Arlequin تخمین زده شد، در جدول ۲ نشان داده شده است.

اطلاعات هاپلوتیپی ۶۸ فرد که فاز گامتی آن‌ها مشخص بود، برای تهیه فایل ورودی برنامه Arlequin استفاده گردید و مقدار D تاجیما و  $F_u$ 's  $F_s$  در جمعیت اصفهان به ترتیب برابر با ۱/۷ و ۱/۰۲ تخمین زده شد. مقدار  $F$  مورد انتظار و مشاهده شده در آزمون E-W برابر با ۰/۳۵ و ۰/۵۹ تخمین زده شد. برای تخمین هتروزیگوسیتی مشاهده

جدول ۲: درجه هتروزیگوسیتی چندشکلی های *EcoRI* و *BglIII* در ژن *PAH* در جمعیت اصفهان

| چندشکلی           | هتروزیگوسیتی مورد انتظار | هموزیگوسیتی مورد انتظار | هتروزیگوسیتی مشاهده شده | هموزیگوسیتی مشاهده شده |
|-------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| <i>PAH-BglIII</i> | ٪۴۳                      | ٪۵۷                     | ٪۵۱                     | ٪۴۹                    |
| <i>PAH-EcoRI</i>  | ٪۵۰                      | ٪۵۰                     | ٪۸۱                     | ٪۱۹                    |

## نتیجه گیری و بحث

در این مطالعه، از اطلاعات هاپلوتیپی *BgIII-EcoRI* در ژن *PAH* برای بررسی اثر انتخاب بر روی این ژن در جمعیت اصفهان استفاده گردید. اگر چه هر دو این چندشکلی‌ها در ناحیه غیر کد کننده ژن *PAH* قرار دارند و به نظر می‌رسد که تئوری خنثی در مورد آن‌ها صدق می‌کند، ولی تخمین مقدار  $D$  تاجیما و  $F_u$ 's  $F_s$  نشان می‌دهد که این چندشکلی‌ها در جمعیت اصفهان از نظر انتخاب خنثی نیستند. مقدار مثبت هر دو آزمون بیانگر آن است که این چندشکلی‌ها در جمعیت اصفهان تحت تأثیر انتخاب متعادل قرار دارند یا به تازگی تحت تأثیر مانع جمعیتی قرار گرفته‌اند.

موانع جمعیتی، فرآیندهای تکاملی هستند که مانع تولید مثل درصد بالایی از جمعیت می‌گردند. موانع جمعیتی می‌تواند باعث افزایش درون‌زادآوری یا اثر بنیانگذار گردد (Pasternak, 2005) که معمولاً باعث کاهش هتروزیگوسیتی می‌گردند. در جمعیت مورد مطالعه، هتروزیگوسیتی مشاهده شده چندشکلی *BgIII* تقریباً با هموزیگوسیتی مشاهده شده برابر است و هیچ کاهش هتروزیگوسیتی نسبت به هموزیگوسیتی مشاهده نمی‌شود. در مورد چندشکلی *EcoRI*، هتروزیگوسیتی در جمعیت اصفهان فراوانی بالاتری نسبت به هموزیگوسیتی دارد، بنابراین، به نظر نمی‌رسد که مانع جمعیتی نقش مهمی را در مثبت بودن مقدار آزمون  $D$  تاجیما و  $F_u$ 's  $F_s$  در جمعیت اصفهان داشته باشد.

انتخاب متعادل مربوط به فرآیندهای انتخابی است که چندین آلل مختلف یک ژن در استخر ژنی یک جمعیت در فراوانی بالا حفظ می‌گردد. در این شرایط، معمولاً هتروزیگوت‌ها سازگاری زیستی و تولید مثلی بالاتری نسبت به هموزیگوت‌ها را دارا هستند (Schneider et

2000, *al.*) همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، هتروزیگوسیتی مشاهده شده چندشکلی *EcoRI* در ژن *PAH* در جمعیت اصفهان بسیار بالاتر از هتروزیگوسیتی مورد انتظار این مارکر است که شواهدی بر انتخاب متعادل بر روی چندشکلی *EcoRI* در ژن *PAH* در جمعیت اصفهان است. با وجود اینکه چندشکلی *EcoRI* در اینترون ۵ ژن *PAH* (ناحیه غیر کد کننده) قرار دارد، ولی به نظر می‌رسد که افراد هتروزیگوت در چندشکلی *EcoRI* سازگاری زیستی بالاتری نسبت به افراد هموزیگوت دارند. در واقع، نتایج حاصل از آزمون‌های Neutrality به همراه مقایسه نتایج حاصل از تخمین هتروزیگوسیتی مورد انتظار و هتروزیگوسیتی مشاهده شده، مؤید آن است که چندشکلی *EcoRI* در جمعیت اصفهان تحت تأثیر انتخاب متعادل قرار دارد.

آزمون دیگری که به طور گسترده در ژنتیک جمعیت به منظور تخمین اثر انتخاب بر روی یک ژن به کار برده می‌شود، آزمون  $E-W$  است. در این آزمون، مجموع هموزیگوسیتی مشاهده شده برای هر هاپلوتیپ در یک لوکوس ( $F_o$ ) با مجموع هموزیگوسیتی مورد انتظار برای هر هاپلوتیپ در یک لوکوس ( $F_e$ ) مقایسه می‌گردد. در صورتی که ژنی تحت تأثیر انتخاب خنثی، تکامل یابد، مقدار  $F_o$  با  $F_e$  برابر خواهد بود. مقدار  $F_o$  و  $F_e$  برای هاپلوتیپ *BgIII-EcoRI* در ژن *PAH* در جمعیت اصفهان برابر با ۰/۳۵ و ۰/۵۹ تخمین زده شد. از آن جهت که مقدار  $F_e$  هاپلوتیپ *BgIII-EcoRI* در ژن *PAH* در جمعیت اصفهان بزرگتر از مقدار  $F_o$  است، بنابراین، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که این هاپلوتیپ در ژن *PAH* در جمعیت اصفهان تحت تأثیر انتخاب متعادل قرار دارد.

Hamblin, M. T., Thompson, E. E. and Di Rienzo, A. (2002) Complex signatures of natural selection at the Duffy blood group locus. *The American Journal of Human Genetics* 70: 369-383.

Hughes, A. L. and Yeager, M. (1998) Natural selection and the evolutionary history of major histocompatibility complex loci. *Frontiers in Bioscience*. 3: d509-d516.

Kidd, K. K. 2002. *PAH EcoRI Polymorphism*. Available: [http://info.med.yale.edu/genetics/kkidd/PAH\\_EcoRI.html](http://info.med.yale.edu/genetics/kkidd/PAH_EcoRI.html).

Kwok, S. C. M., Ledley, F. D., DiLella, A. G., Robson, K. J. H and Woo, S. L. C. (1985) Nucleotide sequence of a full-length complementary DNA clone and amino acid sequence of human phenylalanine hydroxylase. *Biochemistry* 24: 556- 561.

Libert, F., Cochaux, P., Beckman, G., Samson, M., Aksenova, M., Cao, A., Czeizel, A., Claustres, M., de la Rua, C., Ferrari, M., Ferrec C., Glover G., Grinde B., Guran S., Kucinskis V., Lavinha J., Mercier B., Ogur G., Peltonen L., Rosatelli C., Schwartz M., Spitsyn V., Timar L., Beckman L. and Vassart G. (1998) The *deltaccr5* mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe. *Human Molecular Genetics* 7: 399-406.

Madden, M. (2004) Phenylketonuria: Defects in amino acid metabolism. *South Carolina Journal of Molecular Medicine* 5: 57-61.

Miller S. A., Dykes D. D. and Polesky H. F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16: 1215.

Pasternak, J. J. (2005) An introduction to human molecular genetics, mechanisms of inherited diseases. 2<sup>nd</sup> Ed. John Wiley & Sons, Inc.

Schneider, S., Roesli, D. and Excofier, Y. L. (2000) Arlequin: A software for population genetics data analysis, version 2.000. Genetics and Biometry Laboratory. University of Geneva, Switzerland.

اگر چه نتایج مطالعه حاضر بر روی چندشکلی های *EcoRI* و *BgIII* در ژن *PAH* می تواند درک ما را از تاریخچه تکاملی و ساختار ژنتیکی جمعیت اصفهان افزایش دهد، البته لازم است تا مطالعات بیشتری بر روی ژن های مختلف در جمعیت اصفهان انجام شود تا بصیرت ما در مورد ساختار ژنتیکی جمعیت اصفهان، که یکی از بزرگترین جمعیت های ایران است، افزایش یابد.

### منابع

Akey, J. M., Eberle, M. A., Rieder, M. J., Carlson, C. S., Shriver, M. D., Nickerson, D. A and Kruglyak, L. (2004) Population history and natural selection shape patterns of genetic variation in 132 genes. *PLoS Bioogyl* 2: 286.

Bersaglieri, T., Sabeti, P. C., Patterson, N., Vanderploeg, T., Schaffner, S. F., Drake, J. A., Rhodes, M., Reich, D. E. and Hirschhorn, J. N. (2004) Genetic signatures of strong recent positive selection at the lactase gene. *The American Journal of Human Genetics* 74: 1111-1120.

Carlson, C. S., Thomas, D. J., Eberle, M. A., Swanson, J. E., Livingston, R. J., Rieder, M. J. and Nickerson, D. A (2005) Genomic regions exhibiting positive selection identified from dense genotype data. *Genome Research* 15: 1553-1565.

Dworniczak, B., Wedemeyer, N. and Horst, J. (1991) PCR detection of the *BgIII* RFLP at the human phenylalanine hydroxylase (*PAH*) locus. *Nucleic Acids Research* 19; 1958.

Fazeli Zahra and Vallian Sadeq (2009) Estimation Haplotype Frequency of *BgIII/EcoRI/VNTR* Markers at the *PAH* Gene Region in Iranian Population. *International Journal of Human Genetics* 9(2):115-121.

Hamblin, M. T. and Di Rienzo, A. (2000) Detection of the signature of natural selection in humans: Evidence from the Duffy blood group locus. *The American Journal of Human Genetics* 66: 1669-1679.

Seltsam, A., Hallensleben, M., Kollmann, A. and Blasczyk, R. (2003) The nature of diversity and diversification at the ABO locus. *Blood* 102: 3035-3042.

Stajich, J. E. and Hahn, M. W. (2005) Disentangling the effects of demography and selection in human history. *Molecular Biology and Evolution* 22: 63-73.

Tajima, F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.

Watterson, G. (1978) The homozygosity test of Neutrality. *Genetics* 88: 405-417.