

پویس ژنومی نشانه‌های انتخاب در اسب نژاد کرد

- **علیرضا خان احمدی***: گروه علوم دامی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران، صندوق پستی: ۱۶۳
- **قدرت‌الله رحیمی میانجی**: گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران، صندوق پستی: ۵۷۸۰
- **حسین مرادی شهر بابک**: گروه علوم دامی، پردیس دانشگاه تهران، کرج، ایران، صندوق پستی: ۴۱۱۱
- **سیدحسین حافظیان**: گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران، صندوق پستی: ۵۷۸۰
- **محمدباقر زندی باغچه مریم**: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران، صندوق پستی: ۳۱۳

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۶

چکیده

انتخاب جهش‌های مفید در برخی جمعیت‌ها سبب به‌جا گذاشتن نشانه‌هایی در سطح ژنوم می‌شود. به دلیل ارتباط این مناطق با صفات مهم اقتصادی شناسایی این مناطق از ژنوم از موضوعات مهم در پژوهش‌های ژنتیک حیوانی است. این پژوهش با هدف شناسایی مناطق ژنومی حامل نشانه‌های انتخاب در اسب نژاد کرد با استفاده از ریزآرایه نانویی اسب K ۷۰ انجام شد. تعداد ۲۸ رأس اسب نژاد کرد از مناطق مختلف کردستان و کرمانشاه انتخاب، بعد از خونگیری و استخراج DNA، تعیین ژنوتیپ شدند. جهت جستجوی نشانه‌های انتخاب از دو آزمون EHH و iHS در محیط R و با استفاده از بسته نرم‌افزاری rehh استفاده شد. به منظور بررسی ژن‌ها و QTL‌های احتمالی در مناطق کاندیدای انتخاب، از پایگاه داده‌های نشانگر تک نکلوتیدی اسب و پایگاه QTL حیوانات استفاده شد. با استفاده از آماره iHS، ۹ منطقه ژنومی روی کروموزوم‌های ۱۱، ۷، ۵ و ۱۵ به عنوان مناطق کاندیدای نشانه انتخاب، شناسایی شد. جهت ارزیابی اثر انتخاب در این مناطق از آماره EHH به همراه بررسی دیگرام‌های شاخه‌بندی هاپلوتیپی و بررسی طول LD استفاده شد. روی کروموزوم‌های ۷ و ۱۱ مناطقی به عنوان مناطق حامل نشانه‌های انتخاب مثبت شناسایی شده و مناطق ژنومی روی کروموزوم‌های ۵ و ۱۵ علی‌رغم فراوانی بالای آللی اثری از انتخاب مثبت اخیر در این نواحی ژنومی مشاهده نشد و آلل‌ها به عنوان آلل‌های رایج و قدیمی مشاهده شد. در این مناطق تعدادی ژن و QTL شناسایی شد که در زمینه فعالیت عضلانی، سیستم ایمنی و فعالیت‌های درون سلولی فعالیت دارند. بنابراین، این مناطق از ژنوم اسب کرد احتمالاً هدف انتخاب مثبت بوده است.

کلمات کلیدی: پویس ژنومی، نشانه‌های انتخاب، اسب کرد



مقدمه

Maynard-smith و همکاران، (۱۹۷۴) که با جایگاه‌های صفات کمی (QTL) مرتبط با صفات مهم اقتصادی در ارتباط هستند (مرادی و همکاران، ۱۳۸۹). Jessica و همکاران (۲۰۱۳) در پژوهشی به کمک پویش ژنومی با استفاده از ۱۰۵۳۶ چندشکلی تک نکلوتیدی اتوزومی روی ۸۱۴ اسب از ۳۶ نژاد به مطالعه تنوع ژنتیکی بین نژادها پرداختند. با استفاده از SNPهای اتوزومی کم‌ترین و بیش‌ترین تنوع درون نژادی با استفاده از هتروزیگوسیتیه مورد انتظار در نژاد کلی دستال (Clydestale) و تووا (Tuva) به ترتیب ۰/۲۳۲ و ۰/۳۱۱ محاسبه شد. تنوع درون نژادی در نژاد تروربد نسبت به سایر نژادها افزایش نشان داد. مقدار تنوع درون جمعیتی محاسبه شده با استفاده از این تعداد SNP و مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) در اسب تروربد پایین و دلیل آن فشارهای انتخاب بالا و بسته بودن جمعیت گزارش شد. Yun و همکاران (۲۰۰۱) در پژوهشی روی ۲۶۷ راس اسب از چهار نژاد که به دو گروه حساس و مقاوم به عفونت ارتريت و وروسی تقسیم شده بودند با استفاده از آرایه اسبی یک هاپلوتیپ شناسایی کردند که مرتبط با فنوتیپ حساس بود. این هاپلوتیپ روی کروموزوم ۱۱ واقع شده است. آنالیزهای بیولوژی سبب شناسایی چندین ژن درون این هاپلوتیپ شد. این ژن‌ها پروتئینی کد می‌کنند که سبب اتصال و ورود ویروس به بدن اسب‌ها می‌شود. Signer-Hasler و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه جایگاه‌های مؤثر بر ارتفاع جدوگاه اسب با استفاده از کاوش ژنومی در ۱۰۷۷ راس اسب فرانسوی مونتاگنر (Franches-Montagnes) با استفاده از ۴۰۰۰۰ SNP دو QTL مربوط به ارتفاع جدوگاه روی کروموزوم‌های ۳ و ۹ شناسایی کردند. نشانه‌های انتخاب شناسایی شده روی کروموزوم ۳ نزدیک به ژن‌های LCOL/NCAPG و در کروموزوم ۹ نزدیک به ژن ZFAT بوده است. مطالعات کاوش ژنومی در سایر گونه‌های بومی کشور شامل مرادی و همکاران (۱۳۸۹) کاوش ژنومی تمایز جمعیتی در گوسفند نژادهای زل و لری بختیاری. قلی‌زاده و همکاران (۱۳۹۳) پویش ژنومی جهت شناسایی مناطق ژنومی مؤثر بر نرخ دو قلوزایی گوسفندان نژاد بلوچی، مخبر و همکاران (۱۳۹۴) پویش ژنومی نشانه‌های انتخاب در گاو میش‌های خوزستانی و مازندرانی انجام شد. هدف این پژوهش شناسایی نشانه‌های انتخاب در ژنوم اسب نژاد کرد با استفاده از چندشکلی‌های تک نکلوتیدی SNP بوده است که در طی سالیان مورد انتخاب قرار گرفته است.

از زمان فرآیند اهلی شدن اسب برحسب نیاز در زمینه‌های مختلف هم‌چون کشاورزی، نقل و انتقال و اهداف نظامی از این حیوان استفاده شده است. همین امر سبب به وجود آمدن تنوع وسیعی از این حیوان در دنیا شده است. اهلی کردن حیوانات به‌طور وسیعی مورفولوژی، خصوصیات رفتاری و عملکردی حیوانات امروزی را تغییر داده است (Diamond, ۲۰۰۲). در واقع این تغییرات پاسخ به فشارهای محیطی برای انتخاب صفات مختلف در حیوانات است که به تبع آن فراوانی ژنی و ژنوتیپی تغییر می‌کند (Harris و همکاران، ۲۰۰۶). دانش گسترده امروزی این امکان را فراهم نموده که با تکنولوژی‌های موجود بتوان نواحی از ژنوم که سبب این ویژگی‌ها شده است را شناسایی کرد (Diamond, ۲۰۰۲؛ Flory و همکاران، ۲۰۰۹). افزایش فراوانی جهش‌های به وجود آمده به دلیل پدیده انتخاب که فقط در برخی از جوامع مفید هستند سبب به وجود آمدن نشانه‌هایی در سطح ژنوم موجودات می‌شود (Akey, ۲۰۰۹؛ Biswas و همکاران، ۲۰۰۹). شناسایی نشانه‌های انتخاب فقط به وسیله بررسی فراوانی اللی، توسعه ساختار هاپلوتیپی، کاهش تنوع ژنتیکی در آن منطقه و افزایش الگوی عدم تعادل پیوستگی ژنی (LD) امکان‌پذیر می‌باشد (Qanbari و همکاران، ۲۰۱۱؛ ۲۰۱۴). امروزه شناسایی این نشانه‌ها یکی از موضوعات مهم و داغ متخصصین ژنتیک تکاملی است، زیرا این نشانه‌ها می‌توانند اطلاعات مهمی در رابطه با فرآیند تکامل و شکل‌گیری ژنوم در مناطق هدف انتخاب ارائه دهند (Nielsen و همکاران، ۲۰۰۱؛ ۲۰۰۵). هنگامی که جهشی در ژنوم رخ دهد و دارای مزیت انتخابی نسبت به سایر جایگاه‌های جهش یافته باشد به‌طوری‌که سبب افزایش فراوانی اللی شود به آن انتخاب مثبت می‌گویند (Kaplan و همکاران، ۱۹۸۹). هنگامی که انتخاب مثبت در یک جمعیت رخ دهد فراوانی آلل‌های خنثی مجاور آلل هدف انتخاب نیز افزایش می‌یابد و از طرفی این پدیده سبب افزایش در مقدار عدم تعادل پیوستگی ژنی در اطراف آلل مورد انتخاب شده که منجر به تشکیل یک هاپلوتیپ خاص در جمعیت می‌شود (Kim و همکاران، ۲۰۰۲). بنابراین، دو پدیده مهم، یکی تغییر فراوانی اللی و دیگری عدم تعادل پیوستگی ژنی قوی بین جایگاه‌های مجاور، دو معیار برای شناسایی نشانه‌های انتخاب مثبت می‌باشند (Sabeti و همکاران، ۲۰۰۲؛ ۲۰۰۶). این پدیده به‌عنوان اثر انتقال ژنتیکی همراه (Hitchhiking Approach) یا رانش ناشی از انتخاب (Selective Sweep) شناخته می‌شود (Barett و همکاران، ۲۰۰۷؛ Charlesworth, ۲۰۰۷؛



مواد و روش‌ها

نمونه‌های خون اسب نژاد کرد به تعداد ۳۲ راس (۱۵ راس نر و ۱۷ راس ماده) از استان‌های کردستان و کرمانشاه تهیه شد. در این پژوهش سعی شد براساس اطلاعات پرورش‌دهنده‌ها، از اسب‌هایی که رابطه خویشاوندی با یکدیگر نداشته و از لحاظ مورفولوژی و فنوتیپی دارای حداقل‌های خصوصیات نژادی باشند نمونه‌گیری به عمل آید. استخراج DNA از خون کامل به روش نمکی بهینه شده (Miller و همکاران، ۱۹۸۸) در شرکت ساینناگستر البرز مستقر در پارک علم و فناوری دانشگاه تهران انجام شد. تعیین کیفیت نمونه‌های DNA به وسیله ژل آگار ۰/۸ درصد و نانودرآپ مدل ۲۰۰۰ شرکت Thermo انجام شد. سپس نمونه‌های DNA استخراج شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان تعیین ژنوتیپ نگهداری شد و سپس به آزمایشگاه GeneSeek کشور آمریکا جهت تعیین ژنوتیپ انتقال داده شد. ژنوتیپ با استفاده ریزآرایه‌های نانویی اسبی که دارای ۷۰۰۰۰ نشانگر تک نوکلئوتیدی است با به‌کارگیری پروتکل استاندارد ارائه شده توسط شرکت ایلومینا، انجام شد. برای کنترل کیفیت، در اولین مرحله حیوانات با بیش از ۵ درصد ژنوتیپ از دست رفته (Sample Call Rate) حذف شدند. سپس دو فاکتور حداقل فراوانی آللی (MAF = Minor Allele Frequency) و نرخ ژنوتایپینگ نشانگرها در نمونه‌ها (Call Rate) محاسبه شده و نشانگرهایی که در مجموع حیوانات دارای MAF و نرخ ژنوتایپینگ نشانگرها در نمونه، به ترتیب کم‌تر از ۵٪ و ۹۵٪ بودند از آنالیزهای بعدی کنار گذاشته شد. در نهایت برای SNP‌های باقی‌مانده آزمون بررسی تعادل هاردی-واینبرگ به‌عنوان معیار خطای تعیین ژنوتیپ انجام شد. برای این منظور سطح احتمال ۶-۱۰ با استفاده از ضریب تصحیح بنفرونی ($\beta = \alpha/n$) در نظر گرفته شد. مراحل کنترل کیفیت توسط نرم‌افزار Plink (Version 1/9) انجام شد (Purcell و همکاران، ۲۰۰۷؛ Teo و همکاران، ۲۰۰۷).

آنالیزهای آماری

رتبه‌بندی هاپلوتیب یک پارچه iHS (Integrated Haplotype

Score): به‌منظور بررسی مناطق حامل نشانه‌های انتخاب، از آماره رتبه‌بندی هاپلوتیب یک پارچه به‌عنوان یک آماره درون جمعیتی استفاده شده است. برای محاسبه رتبه‌بندی هاپلوتیب یک پارچه ابتدا فایل ژنوتیپی افراد با نرم‌افزار Fastphase (Scheet و همکاران، ۲۰۰۶) تبدیل به فایل هاپلوتیپی شد. بعد از تولید فایل‌های هاپلوتیپی، با استفاده از بسته نرم‌افزاری rehh (Gautier و همکاران، ۲۰۱۲)

در محیط نرم‌افزار R مقادیر رتبه‌بندی هاپلوتیب یک پارچه برای کلیه نشانگرها در سراسر ژنوم با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$iHS = \frac{\log\left(\frac{iHHS_a}{iHHS_d}\right) - E_{ps}\left[\log\left(\frac{iHHS_a}{iHHS_d}\right)\right]}{sd_{ps}\left[\log\left(\frac{iHHS_a}{iHHS_d}\right)\right]}$$

$iHHS_a = iHHS_d$ = هموزیگوسیتی هاپلوتیب یک پارچه اجدادی، $iHHS_d$ = هموزیگوسیتی هاپلوتیب یک پارچه مشتق شده، $S = SNP$ = مرکز هاپلوتایپ، PS = فراوانی آلل S ، Sd = انحراف استاندارد و Eps = امید ریاضی به‌منظور شناسایی بهتر نشانه‌های انتخاب در سطح ژنوم به‌جای در نظر گرفتن ارزش هر نشانگر میانگین ارزش تعدادی از SNP‌های مجاور تحت عنوان پنجره (Wine) در نظر گرفته شد. در این پژوهش میانگین ارزش عددی تعداد ۵ نشانگر مجاور در نظر گرفته شد. سپس نشانگرهایی که ارزش رتبه‌بندی هاپلوتیب یک پارچه آن‌ها در صدک بالای ۹۹/۹۹٪ قرار داشت به‌عنوان مناطق کاندیدای انتخاب، در آنالیزهای بعدی استفاده شد. با استفاده از این بسته نرم‌افزاری علاوه بر محاسبات رتبه‌بندی هاپلوتیب یک پارچه برای کلیه نشانگرها، فایل ورودی نرم‌افزار sweep (Sabeti و همکاران، ۲۰۰۲) به‌منظور محاسبه فراوانی آللی، محاسبه عدم تعادل پیوستگی ژنی و مشاهده ساختار بلوک‌های هاپلوتیپی به‌صورت گرافیکی تهیه شد.

آماره هموزیگوسیتی هاپلوتیب توسعه یافته EHH

(Extended Haplotype Homozygosity): بعد از شناسایی مناطق کاندیدای انتخاب با استفاده از آماره iHS ، جهت شناسایی چگونگی اثر انتخاب در این مناطق از آماره هموزیگوسیتی هاپلوتیب توسعه یافته که یک آماره مبتنی بر LD و طول هاپلوتیب است استفاده شد. چنانچه این مناطق دارای فراوانی آللی بالا، طول هاپلوتیب و LD بالا باشد نشان‌دهنده انتخاب مثبت می‌باشد. مقدار این آماره با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$EHH = \frac{1}{n_{as}(n_{as} - 1)} \sum_{k=1}^{k_{as,t}} n_k(n_k - 1)$$

در این رابطه $as = SNP$ مرکزی هاپلوتیب، N_{as} = تعداد هاپلوتیب حامل آلل as ، $k_{as,t}$ = تعداد هاپلوتیب‌های توسعه یافته منحصر به‌فرد حامل آلل as از فاصله نشانگر s تا نشانگر t روی همان کروموزوم و N_k تعداد نمونه‌های حامل هاپلوتیب توسعه یافته k می‌باشد.

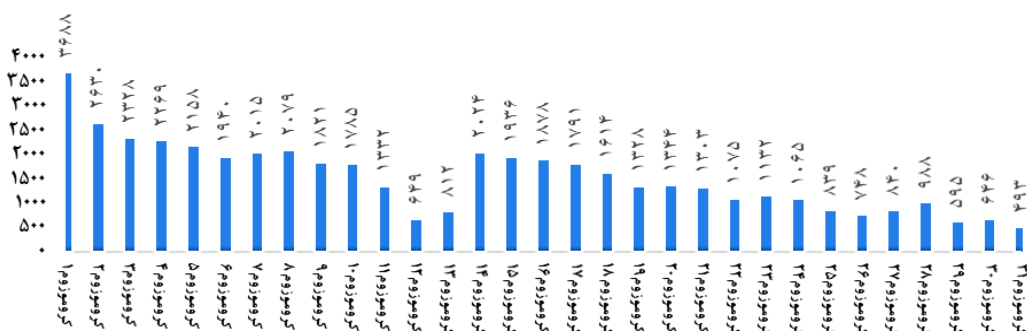
برای محاسبه این آماره ابتدا ساختار داده‌ها با استفاده از بسته نرم‌افزار rehh (Gautier و همکاران، ۲۰۱۲) در محیط R تشکیل شده سپس با استفاده از نرم‌افزار sweep نسخه ۱/۱ مقدار EHH محاسبه



بررسی شد. برای بررسی مناطق حامل QTL، مناطق کاندیدای انتخاب شناسایی شده با استفاده از پایگاه QTL حیوانات مورد بررسی قرار گرفت (<http://www.animalgenome.org>).

نتایج

در مجموع ۳۲ راس اسب نژاد کرد با ۶۵۱۵۷ نشانگر تک‌نکلئوتیدی تعیین ژنوتیپ شدند. ابتدا آنالیزهای کنترل کیفیت برای کلیه داده‌ها و همه اسب‌ها انجام شد. در آنالیزهای انجام شده به منظور تعیین کیفیت داده‌ها ۴ راس اسب کرد به دلیل این‌که بیش از ۵٪ ژنوتیپ گم شده داشتند از ادامه آنالیزها حذف شدند. هم‌چنین در ادامه آنالیزها ۱۷۹۹۷ نشانگر به دلیل نرسیدن به حد آستانه تعریف شده برای کنترل کیفیت داده‌ها، حذف شدند. در نهایت ۲۸ راس اسب کرد با ۴۷۱۶۰ نشانگر برای ادامه آنالیزها انتخاب شدند. متوسط میزان هتروزیگوسیتی در جمعیت اسب نژاد کرد برابر با ۰/۳۵۳ محاسبه شد. بیش‌ترین و کم‌ترین تعداد نشانگرها به‌ازای هر کروموزوم مربوط به کروموزوم شماره ۱ و کروموزوم شماره ۳۱ به‌ترتیب برابر با ۳۶۸۸ و ۴۹۳ نشانگر مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱: نشانگرهای چندشکلی تک‌نکلئوتیدی توزیع شده روی کروموزوم‌های اسب نژاد کرد

تابی در نظر گرفته شد. سپس داده‌های حاصل که ارزش پنجره آن‌ها در صدک بالای ۹۹/۹۹ قرار داشتند به‌عنوان مناطق کاندیدای انتخاب شناسایی شدند. نتایج آنالیز این آماره، ۹ منطقه ژنومی کاندیدای نشانه انتخاب را شناسایی نمود، این مناطق روی کروموزوم‌های ۱۱ (موقعیت ۳۱۸۶۵۱۸۷ و ۳۱۶۵۷۰۲۹ بازی)، ۷ (موقعیت ۴۰۲۷۸۱۸۸، ۴۰۰۸۵۸۰۱ و ۴۰۲۷۸۱۷۵ بازی)، ۵ (موقعیت ۶۵۴۹۵۷۵۹ و ۵۲۶۶۵۸۲۹ بازی) و ۱۵ (موقعیت ۷۲۳۲۸۱۹۰ و ۶۴۹۲۸۴۴۰ بازی) واقع شده‌اند (شکل ۲).

شد (Sabeti و همکاران ۲۰۰۲). یک استراتژی قدرتمند برای توصیف ژن‌های کاندیدا در پاسخ به انتخاب طبیعی یا مصنوعی عبارت است از شناسایی مناطقی از ژنوم که یک افزایش غیرمنتظره‌ای برای هموزیگوسیتی هاپلوتیپ موضعی نشان می‌دهند. به‌همین دلیل Sabeti و همکاران (۲۰۰۲) آماره‌ای تحت‌عنوان هموزیگوسیتی هاپلوتیپ توسعه یافته ارائه نمودند. این آماره براساس فرسایش LD هموزیگوسیتی هاپلوتیپ را در اطراف یک نشانگر تک‌نکلئوتیدی به‌عنوان مرکز هاپلوتیپ می‌سنجد.

شناسایی ژن‌ها و QTL‌های مرتبط با مناطق ژنومی تحت

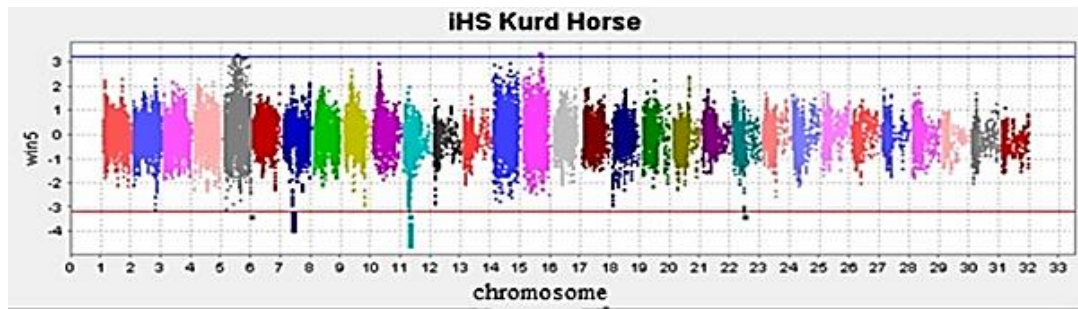
انتخاب: ناطق ژنومی که ارزش iHS بالایی داشتند و به‌عنوان مناطق کاندیدای انتخاب شناسایی شده بودند، به‌منظور بررسی ژن‌های موجود مورد بررسی بیش‌تری قرار گرفتند. اطلاعات مربوط به نواحی تحت انتخاب شامل شماره کروموزوم و موقعیت نشانگرهای انتخاب شده روی کروموزوم، جهت شناسایی ژن‌هایی که احتمالاً با نواحی انتخابی مرتبط هستند، استفاده شد. موقعیت کروموزومی این جایگاه‌ها به‌علاوه ۵۰۰ کیلوباز در بالادست و پایین‌دست SNP مرکزی با موقعیت ژن‌های لیست شده برای ژنوم اسب در پایگاه داده‌های نشانگر تک‌نکلئوتیدی اسب (HSDb) (<http://snugenome2.snu.ac.kr/HSDb/search.php>)

طول ژنوم اسب نژاد کرد با ۴۷۱۶۰ نشانگر برابر با ۲۲۴۱/۰۸ مگاباز محاسبه شد. متوسط فاصله دو نشانگر از یکدیگر برابر با ۴۷/۵۳ کیلوباز محاسبه شد.

نتایج حاصل از آماره رتبه‌بندی هاپلوتیپ یک‌پارچه (iHS):

در این پژوهش رتبه‌بندی هاپلوتیپ یک‌پارچه برای کلیه نشانگرها در جمعیت اسب نژاد کرد محاسبه شد. در این پژوهش به‌جای در نظر گرفتن ارزش یک SNP میانگین ارزش ۵ SNP تحت‌عنوان پنجره ۵

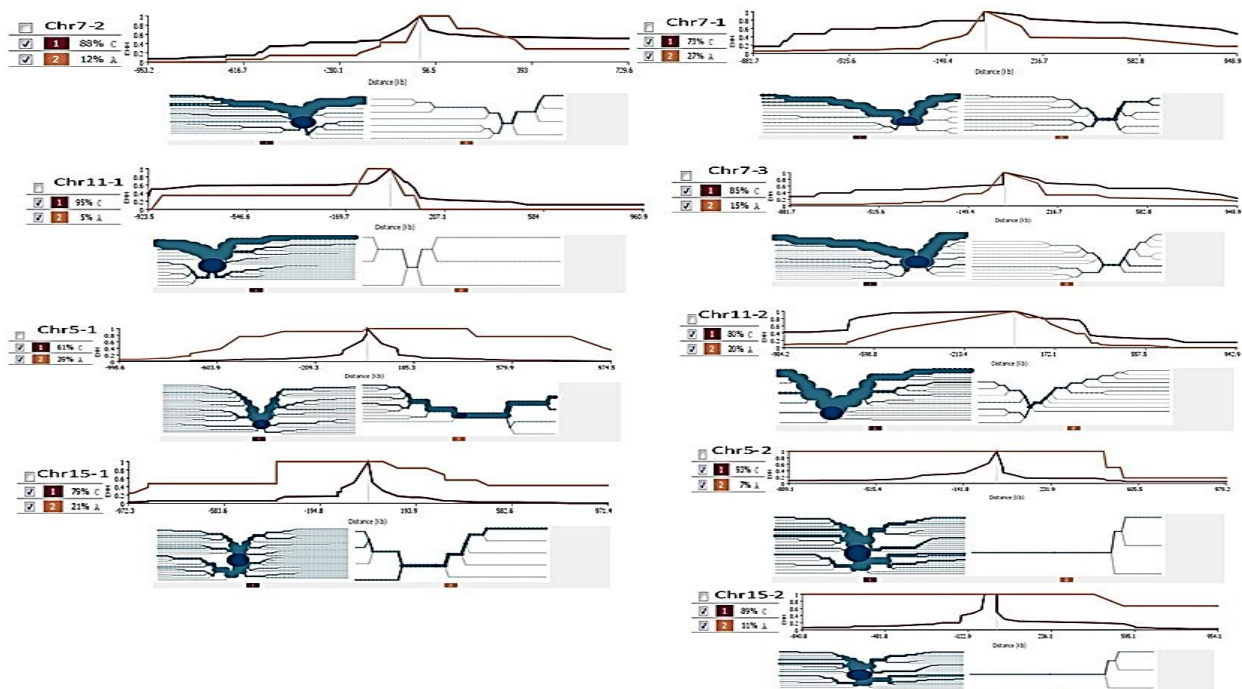




شکل ۲: مناطق کاندیدای نشانه انتخاب روی کروموزوم‌های ۵، ۷، ۱۱ و ۱۵ با استفاده از هموزیگوسیتی هاپلوتیپ یک پارچه

انتخاب، مناطق ژنومی روی کروموزوم‌های ۷ و ۱۱ حامل نشانه انتخاب بوده و مناطق ژنومی روی کروموزوم‌های ۵ و ۱۵ علی‌رغم فراوانی آلی بالا با توجه به طول EHH و فرسایش LD در اطراف آن‌ها، اثری از انتخاب مثبت اخیر در این نواحی ژنومی مشاهده نشد (شکل ۳).

در این پژوهش مناطقی که به‌عنوان مناطق کاندیدای انتخاب با استفاده از این آماره شناسایی شدند، برای بررسی چگونگی انتخاب در این نواحی از آماره EHH و بررسی طول عدم تعادل پیوستگی ژنی استفاده شد. با توجه به طول EHH، عدم تعادل پیوستگی ژنی، فراوانی آلی و گراف‌های شاخه‌بندی هاپلوتیپ در اطراف مناطق کاندیدای



شکل ۳: فراوانی آلی نشانگرهای SNP، توزیع EHH و گراف‌های شاخه‌بندی هاپلوتیپی در مناطق کاندیدای انتخاب

عمده ژن‌های شناسایی شده در سیستم ایمنی فعالیت دارند. هم‌چنین برخی از این ژن‌ها در فعالیت عضلات به‌واسطه تولید پروتئین‌های ذخیره کلسیم در عضلات نقش مهمی دارند. برخی از این ژن‌ها در تقسیم سلولی و بیوسنتز مواد درون سلول فعالیت دارند (جدول ۱).

بررسی ژن‌ها و QTL‌های شناسایی شده در مناطق کاندیدای انتخاب: در این پژوهش جهت شناسایی ژن‌های موجود در مناطق کاندیدای انتخاب، این مناطق در پایگاه داده‌های نشانگر تک‌نکلوتیدی اسب (HSDB) مورد بررسی قرار گرفت. در مناطق کاندیدای انتخاب



مؤثر بر سیستم ایمنی، گیرنده سطح سلول و بیان ژن، QTL مربوط به حساسیت نیش حشرات نیز شناسایی شد (جدول ۲).

هم‌چنین جهت بررسی QTL‌های احتمالی در این مناطق از پایگاه اطلاعاتی آنالین QTL‌های حیوانات استفاده شد. روی کروموزوم ۱۱ در محدوده منطقه کاندیدای نشانه انتخاب علاوه بر شناسایی ژن‌های

جدول ۱: ژن‌های شناسایی شده در مناطق کاندیدای انتخاب

عملکرد	ژن	موقعیت در ژنوم اسب	کروموزوم
عملکرد آن مرتبط است با آنتی ژن لنفوسیت CD48/BCM19 و LFA-3 و انواع دیگر سلول - در تحریک سلول‌های T نقش دارد	CD2-horse		
عضو سوم سوپر فامیلی ایموگلوبین	IGSF3		
لیگاندی از گلیکوپروتئین T لنفوسیت CD2، این اثر متقابل به واسطه تعامل با لنفوسیت‌های موجود در غده تیموس با کد کننده پروتئینی است که به عنوان لیگاند لنفوسیت T در حمل و نقل کاتیون‌های سلولی دخالت دارد	CD58	-۵۲۱۶۵۸۲۹	۵
کدکننده پروتئین Calsequestrin (پروتئین متصل به کلسیم) که دارای ظرفیت بالا و میل ترکیبی متوسط، به‌عنوان یک ذخیره کلسیم در عضلات و در هنگام انقباض عضلات کلسیم آزاد شده و وارد کانال کلسیم می‌شود. این ژن فرم آن پروتئینی به نام CASQ1 که در عضلات اسکلتی حدود ۸۰ بون کلسیم دارد در حالی که ایزوفرم CASQ2 در عضله قلب و حدود ۶۰ درصد کلسیم دارد.	SLC22A15	۵۲۱۶۵۸۲۹	
	F6Z1R3-horse		
به‌عنوان میانجی سیگنال ERBB2 و نقش مهمی در مسیر سیگنالینگ MEMO1-RHOH-DIAPH1 دارد	MEMO1		
نقش مهمی در آپوپتوز سلولی (مرگ سلولی) دارد.	NLRC4	-۶۴۴۲۸۴۴۰	۱۵
در نقل و انتقال عناصر در سیتوپلاسم	SLC30A6	۶۵۴۲۸۴۴۰	
در حفظ ساختار دستگاه گلژی	YIPF4		
کدکننده تعدادی از پروتئین‌های IgLON از خانواده Ig هستند	NTM	-۳۹۷۷۸۱۸۸	۷
کدکننده تعدادی از پروتئین‌های IgLON از خانواده Ig هستند - در فرایند بلوغ پروتئین - گیرنده سطح سلول	OPCML	۴۰۷۷۸۱۸۸	
کدکننده ریز RNA هسته	U6ata	-۳۹۵۸۵۸۰۱	۷
کدکننده آنزیم گوانوزین تری فسفاتاز (GTPas) - کدکننده پروتئین ترمیم DNA - رونویسی ژن	GPN1	۴۰۵۸۵۸۰۱	
کدکننده پروتئین متصل به زیرواحدهای نظارتی نوع ۱ و ۲ پروتئین کیناز A و اتصال آن به سطح غشاء خارجی سیتوپلاسمی میتوکندری	AKAP1		
کدکننده پروتئین s23 ریبوزوم میتوکندری	MRPS23		
نقش در پردازش mRNA کدکننده پروتئین متصل به RNA و به‌عنوان یک عضو از خانواده موساشی پروتئین - در چرخه سلولی و در بیان ژن دخالت دارد	MSI2	-۳۱۳۶۵۱۸۷	۱۱
فاکتور رونویسی به‌ویژه در نواحی غنی از CT/GC پروموتور اینترلوکین ۳	VEZF1	۳۳۳۶۵۱۸۷	
کدکننده پروتئین که در مسیر انتقال مواد حاصل از دستگاه گلژی - سیستم ایمنی - در حفظ ساختمان سلول	DYNLL2		

جدول ۲: QTL شناسایی شده در منطقه کاندیدای انتخاب روی کروموزوم ۱۱

کروموزوم	موقعیت ژنومی	QTL ID	SNP ID	Position	ژن	جهش	صفت
۱۱	۳۲۴۷۸۵۷۶-۳۱۴۷۸۵۷۶	۳۷۸۹۲	RS68944739	۳۲۰۱۰۷۵۵	MSI2	A/C	حساسیت به نیش حشرات

بحث

مسافت طی شده در ۱۱۸ راس اسب‌های تروبرد از آرایه‌های اسبی ۵۰K استفاده کردند و در نهایت از ۴۰۹۷۷ چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی، اسب‌ها برای مسافت‌های کوتاه کم‌تر از ۱۳۰۰ متر و متوسط ۱۹۰۰-۲۱۱۲ متر تعیین ژنوتیپ شدند. بیش‌تر SNP‌های مؤثر روی کروموزوم ۱۸ تقریباً ۶۹۰ کیلوگفت باز از ژن میوستاتین تعیین مکان شدند. به‌دلیل پدیده انتقال ژنتیکی همراه زمانی که نشانگرهای مجاور دارای ارزش بالای iHS هستند مبین نشانه‌های انتخاب در آن منطقه ژنومی می‌باشند. گروهی از محققین با استفاده از شبیه‌سازی داده‌ها نشان دادند که ارزش آماره iHS ایجاد شده به‌وسیله پنجره نشانگری نسبت به ارزش تک نشانگر بیش‌تر می‌باشد (Voight و همکاران، ۲۰۰۶).

انتخاب ۴۷۱۶۰ نشانگر از ۶۵۱۵۷ نشانگر به این دلیل بوده است که در مطالعات ژنومی، کنترل کیفیت داده‌ها یک مرحله بسیار مهم برای به‌حداقل رساندن خطای تعیین ژنوتیپ می‌باشد. برای اطمینان از بالا بودن کیفیت داده‌های مورد استفاده در آنالیزهای بعدی، یک‌سری کنترل‌هایی برای حذف داده‌های با کیفیت پایین و با اطلاعات کم از آنالیزهای بعدی انجام شد. برای اجرای این مرحله از آستانه‌های تعریف شده در بخش مواد و روش‌ها استفاده شد (Purcell و همکاران، ۲۰۰۷). Emmeline و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه پویش ژنومی برای صفت



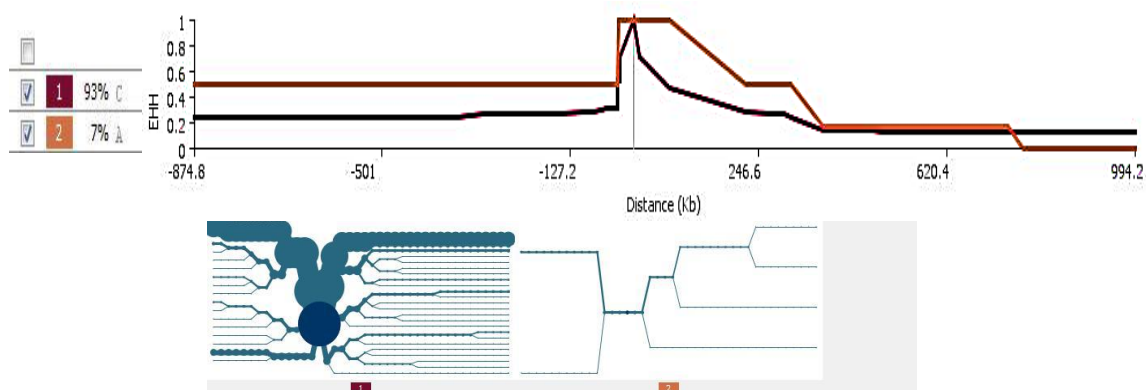
نتیجه پژوهش‌های آن‌ها نشانه‌های انتخاب متفاوتی را در ژنوم گاو زبو نشان داد. معیارهایی هم‌چون فراوانی آللی بالا، طول EHH و LD بالا در اطراف آلل مرکزی در یک هاپلوتیب مبین نشانه انتخاب مثبت در یک جمعیت می‌باشد (Sabeti و همکاران، ۲۰۰۶). بنابراین، مناطق ژنومی روی کروموزوم‌های ۷ و ۱۱ در اسب هدف انتخاب مثبت بوده است. علاوه بر جایگاه‌های موردنظر جایگاه‌های مجاور آلل انتخابی که دارای EHH بالایی هستند هدف انتخاب بوده و در دام‌ها علاوه بر انتخاب طبیعی انتخاب مصنوعی نیز در افزایش آن‌ها مؤثر می‌باشد. در نتیجه این جایگاه‌ها می‌توانند به‌عنوان جایگاه‌های کاندیدا برای ژن‌های با اثر عمده باشند (Hayes و همکاران، ۲۰۰۸). برای بررسی ژن‌ها و QTL‌های احتمالی موجود در این نواحی از پایگاه نشانگرهای تک‌نوکلئوتیدی اسب (HSDB) و پایگاه QTL حیوانات استفاده شد. این پایگاه برای ارائه نشانگرهای تک‌نوکلئوتیدی ژن محور به‌واسطه داده‌های حاصل از توالی‌یابی اسب ترابرد در مقایسه با ژنوم انسان و موش ارائه شده است. در مناطق کاندیدای انتخاب در این پژوهش ۱۸ ژن شناسایی شد هرچند هیچ‌کدام از این ژن‌ها به‌عنوان ژن کاندیدا معرفی نشده‌اند اما برخی از آن‌ها دارای فعالیت مهمی هستند و می‌توانند در این نژاد مورد بررسی بیش‌تری قرار گیرند. روی کروموزوم ۵ ژن‌های CD58 و CD2 شناسایی شد. CD (Cluster of designation) خانواده‌ای از پروتئین‌هایی هستند که دارای فعالیت‌های متعددی می‌باشند و اغلب به‌عنوان گیرنده یا لیگاند مهم سلولی عمل می‌کنند. برخی از آن‌ها دارای فعالیت سیگنالی و برخی فعالیت چسبندگی سلولی دارند. CD58 یک عضو از خانواده ایمینوگلوبین و کدکننده پروتئینی است که به‌عنوان یک لیگاند لنفوسیت T است و سبب چسبیدن لنفوسیت T و فعال شدن آن می‌شود (Zola و همکاران، ۲۰۰۷). ژن SLC22A15 کدکننده پروتئین کلسکوسترین (Clasequestrin) است. این پروتئین به‌عنوان یک پروتئین متصل به کلسیم و ذخیره‌کننده کلسیم در عضله است. با توجه به اهمیت یون کلسیم به‌عنوان عامل فیزیولوژی آغازکننده انقباض عضله که واکنش متقابل میوزین و اکتین را تغییر می‌دهد (انصاری و همکاران، ۱۳۸۲) و از طرفی با توجه به این که فعالیت عضلات یکی از هماهنگ‌ترین و منظم‌ترین فرایندهای حرکتی در اسب است بنابراین توجه و بررسی چنین ژن‌هایی می‌تواند در زمینه مسابقات با اسب مهم باشد. در منطقه حامل انتخاب شناسایی شده روی کروموزوم ۱۱ تعدادی ژن شناسایی شد که در بین آن‌ها ژن MS12 عنوان ژن کاندیدا و QTL برای حساسیت به نیش حشرات (جداول ۱ و ۲) شناسایی شده است (Scharink و همکاران، ۲۰۱۲).

به‌همین دلیل به‌جای درنظر گرفتن ارزش هر نشانگر میانگین ارزش ۵ نشانگر مجاور تحت عنوان پنجره نشانگری درنظر گرفته شد که سبب آشکار شدن بهتر نشانه‌های انتخاب در سطح ژنوم به‌جای درنظر گرفتن ارزش یک نشانگر شد. در نتیجه ۹ منطقه ژنومی کاندیدای نشانه انتخاب شناسایی شد. مرادی و همکاران (۱۳۸۹) در مطالعه کاوش ژنومیک تمایز جمعیتی در نژادهای زل و لری بختیاری با استفاده از نشانگرهای تکنوکلئوتیدی از آزمون Fst ویر و کوکرهام و با درنظر گرفتن پنجره ۵ نشانگری، ۵ ناحیه ژنومی روی کروموزوم‌های ۲، ۵، ۷ و X به‌عنوان مناطق کاندیدای انتخاب شناسایی نمودند. برای ارزیابی نشانه‌های انتخاب بر پایه‌روش‌های عدم تعادل لینکاژی از آزمون هموزیگوسیتی هاپلوئیدی بسط داده شده استفاده شد. این آماره ابزار قدرتمندی است که فرسایش عدم تعادل پیوستگی ژنی در اطراف منطقه کاندیدای انتخاب را با بررسی خصوصیات هاپلوتیپی درون یک جمعیت مورد بررسی قرار می‌دهد (Sabeti و همکاران، ۲۰۰۲). جهت شناسایی نشانه‌های انتخاب با استفاده از داده‌های چندشکل آماره هموزیگوسیتی هاپلوتیپ توسعه یافته نسبت به سایر آماره‌ها مفید می‌باشد (Nielsen و همکاران، ۲۰۰۵). نتایج این آزمون به‌همراه بررسی دیگرام‌های شاخه‌بندی هاپلوتیپی در این نژاد وجود نشانه‌های انتخاب مثبت روی کروموزوم‌های ۷ و ۱۱ را تأیید کرد (شکل ۳) درحالی‌که مناطق ژنومی روی کروموزوم‌های ۵ و ۱۵ نشانی از انتخاب مثبت اخیر مشاهده نشد و آلل‌های مشاهده شده در این مناطق آلل‌های رایج و قدیمی می‌باشند (شکل ۳). گراف شاخه‌بندی هاپلوتیپی در اطراف این آلل‌ها فرسایش عدم تعادل پیوستگی ژنی را به‌خوبی منعکس می‌کند (شکل ۳). در این گراف‌های قطر هر شاخه بیانگر تعداد نمونه‌هایی است که دارای هاپلوتیپ‌های مشابهی هستند. براساس نظریه Kimura (۱۹۸۹) آلل‌های جهش یافته یا از بین می‌روند و یا برای افزایش فراوانی به زمان طولانی نیاز دارند در این مدت به‌دلیل نوترکیبی، عدم تعادل پیوستگی ژنی موجود در اطراف این آلل‌ها به‌صورت عمده فرسایش می‌یابد و از غالب شدن یک هاپلوتایپ خاص در جامعه جلوگیری می‌کند (مرادی و همکاران، ۱۳۸۹). در این حالت آلل‌های متداول مشاهده شده در سطح ژنوم عموماً قدیمی بوده و دارای دامنه کوتاهی از عدم تعادل پیوستگی ژنی می‌باشند (Sabeti، ۲۰۰۲). Bahbahani و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعه نشانه‌های انتخاب مثبت در گاوهای زبو افریقا به‌منظور آگاهی از فشار انتخاب، با استفاده از آماره‌های FST و iHS و Rsb، ۲۴ ناحیه ژنومی کاندیدای انتخاب روی ۱۴ کروموزوم‌های اتوزومی و X شناسایی نمودند.



بالاتر از ۰/۲ در سراسر فاصله ۱ سانتی‌مورگانی در اطراف آلل مرکزی می‌باشد. با توجه به گراف شاخه‌بندی هاپلوتیپی در اطراف این آلل و فراوانی آللی، این جایگاه ژنی در این جمعیت یک آلل متداول می‌باشد که به سمت تثبیت شدن نزدیک شده است. این جایگاه در بسیاری از نژادهای اسب هم‌چون اسب سوئدی و هلند شناسایی شده است (Scharink و همکاران، ۲۰۱۲).

در این پژوهش جهت بررسی اثر انتخاب در جایگاه ژنی MS12 آلل جهش یافته (rs68944739) که به‌عنوان QTL برای حساسیت به نیش حشرات شناسایی شده است را به‌عنوان مرکز هاپلوتیپ انتخاب نموده و با استفاده از آماره EHH و بررسی طول عدم تعادل پیوستگی ژنی در اطراف آن مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴). در این بررسی آلل مشتق شده C با فراوانی بالا (۹۳٪) و طول هموزیگوسیتی هاپلوتیپ



شکل ۴: توزیع هموزیگوسیتی هاپلوتیپ توسعه یافته و گراف‌های شاخه‌بندی هاپلوتیپی در اطراف آلل rs68944739 روی کروموزوم ۱۱ در اسب نژاد کرد

تشکر و قدردانی

در پایان ضمن تقدیر و تشکر از مدیر محترم شرکت دانش بنیان سارینا گستر به‌خاطر تامین هزینه‌های مالی این تحقیق و از مرکز اصلاح نژاد کشور به‌خاطر مساعدت‌های لازم در اجرای این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

۱. انصاری پیرسرای، ز.؛ جعفری صیادی، ع. و نویدشاد، ب.، ۱۳۸۲. مباحثی از بیوشیمی در علوم دامی. انتشارات حق شناس. ۱۵۰ صفحه.
۲. مخبر، م.؛ مرادی شهربابک، م.؛ صادقی، م.؛ مرادی شهربابک، ح. و ویلیامز، ج.، ۱۳۹۴. پویش ژنومی نشانه‌های انتخاب در گاو میش‌های خوزستانی و مازندرانی. علوم دامی ایران. دوره ۶۴، شماره ۲، صفحات ۱۱۹ تا ۱۳۱.
۳. مرادی، م. ح.؛ نجاتی جوارمی، ا.؛ مرادی شهربابک، م.؛ دادز، ک. و مکایوان، ج.، ۱۳۸۹. کاوش ژنومیک تمایز جمعیتی در

آنالیز پویش ژنومی نشانه‌های انتخاب در اسب نژاد کرد با استفاده از نشانگرهای چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی برای اولین بار در ایران در این نژاد انجام شد. مناطق شناسایی شده به‌عنوان مناطق کاندیدای انتخاب با استفاده از آماره iHS و جهت ارزیابی انتخاب با استفاده از آماره EHH، مناطق ژنومی روی کروموزوم‌های ۷ و ۱۱ حامل نشانه‌های انتخاب مثبت بود در حالی که مناطق روی کروموزوم ۵ و ۱۵ با توجه به فراوانی آللی بالا در این مناطق هیچ‌گونه اثری از انتخاب مثبت اخیر در این مناطق مشاهده نشده است. با توجه به نتایج این پژوهش و گزارش سایر محققین آماره‌های iHS و EHH برای شناسایی نشانه‌های انتخاب، به‌عنوان آماره‌های مبتنی بر LD و طول هاپلوتیپی جهت شناسایی نشانه‌های انتخاب درون جمعیتی، مناسب می‌باشند. نتایج به‌دست آمده از بررسی ژن‌ها و QTL موجود در مناطق کاندیدای نشانه‌های انتخاب، مشخص شد که این ژن‌ها نقشی در سیستم ایمنی، فعالیت‌های عضلانی و سلولی دارند. در نتیجه می‌توان با بررسی بیش‌تر در زمینه سازگاری و فعالیت‌های ورزشی در اسب نژاد کرد از عملکرد این ژن‌ها در پژوهش‌های آتی استفاده کرد.



- bovine chromosome six. *Animal Genetics*. Vol. 39, pp: 105-111.
۱۶. **Jessica Petersen, J.L.; Mickelson, J.R.; Cothran, E.G.; L.S. and Andersson, J.A., 2013.** Genetic diversity in the modern horse illustrated from genome-wide SNP data. *PLOS ONE*. Vol. 8, No. 1, pp: 54997.
 ۱۷. **Kaplan, N.L.; Hudson, R.R. and Langley, C.H., 1989.** The Hitchhiking Effect revisited. *Genetics*. Vol. 123, pp: 887-899.
 ۱۸. **Kim, Y. and Stephan, W., 2002.** Detecting a local signature of genetic hitchhiking along a recombining chromosome. *Genetics*. Vol. 160, pp: 765-777.
 ۱۹. **Kimura, M., 1989.** The neutral theory of molecular evolution and the world view of neutralists. *Genome*. Vol. 31, pp: 24-31.
 ۲۰. **Maynard-Smith, J. and Haigh, J., 1974.** The hitch-hiking effect of a favorable gene. *Genetic Research*. Vol. 23, pp: 23-35.
 ۲۱. **Miller, S.A.; Dykes, D.D. and Pole sky, H.F., 1988.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. Vol. 16, 1215 p.
 ۲۲. **Nielsen, R., 2001.** Statistical tests of selective neutrality in the age of genomics. *Heredity*. Vol. 86, pp: 641-647.
 ۲۳. **Nielsen, R., 2005.** Molecular signatures of natural selection. *Annual Review of Genetics*. Vol. 39, pp:197-218.
 ۲۴. **Purcell, S.; Neale, B.; Todd-Brown, K.; Thomas, L.; Ferreira, M.A.; Bender, D.; Maller, J.; Sklar, P.; Bakker, P.I. and Daly, M.J., 2007.** PLINK: a tool set for whole genome association and population-based linkage analyses. *The American Journal of Human Genetics*. Vol. 81, pp: 559-575.
 ۲۵. **Qanbari, S.; Gianola, D.; Hayes, B.; Schenkel, F.; Miller, S.; Moore, S.; Thaller, G. and Simianer, H., 2011.** Application of site and haplotype-frequency based approaches for detecting selection signatures in cattle. *BMC Genomics*. Vol. 16, pp: 12-318.
 ۲۶. **Qanbari, S.; Pausch, H.; Janse, S.; Somel, M.; Strom, T.M.; Fries, R.; Nielsen, R. and Simianer, H., 2014.** Classic selective sweeps revealed by massive sequencing in cattle. *PLOS Genet*. Vol. 10, pp:1004148.
 ۲۷. **Sabeti, P.; Reich, D.E.; Higgins, J.M.; Levine, H.Z.; Richter, D.J.; Schaffner, S.F.; Gabriel, S.B.; Platko, J.V.; Patterson, N.J.; McDonald, G.J.; Ackerman, H.J.; Campbell, S.J.; Altshuler, D.; Cooper, R.; Kwiatkowski, D.; Ward, R. and Lander, E.S., 2002.** Detecting recent positive selection in the human genome from haplotype
 - نژادهای زل و لری بختباری. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*. دوره ۲، شماره ۲، صفحات ۵۸ تا ۷۰.
 ۴. **قلی‌زاده، م.؛ رحیمی‌میانجی، ق. و نجاتی‌جواری، ا.، ۱۳۹۳.** بررسی عدم تعادل لینکاژی و مطالعه ارتباط ژنومی هاپلوتیپی جهت شناسایی مناطق ژنومی مؤثر بر دوقلوزایی در گوسفندان نژاد بلوچی. *پژوهش‌های تولیدات دامی*. سال ۵، شماره ۱۰، صفحات ۱۶۶ تا ۱۷۸.
 ۵. **Akey, J.M., 2009.** Constructing genomic maps of positive selection in humans. Where do we go from here? *Genome Research*. Vol. 19, pp: 711-722.
 ۶. **Bahbahani, H.; Clifford, H.; Wragg, D.; Mbole-Kariuki, M.N.; Tassell, C.V.; Sonstegard, T.; woolhouse, M. and Hanotte, O., 2015.** Signatures of positive selection in East African Shorthorn Zebu: A genome-wide single nucleotide polymorphism analysis. *Scientific Reports*. Vol. 5, pp: 1-13.
 ۷. **Barrett, R.D.H. and Schluter, D., 2007.** Adaptation from standing genetic variation. *Trends in Ecology and Evolution*. Vol. 23, pp: 38-44.
 ۸. **Biswas, S. and Akey, J.M., 2006.** Genomic insights into positive selection. *Trends in Genetics*. Vol. 22, pp: 437-436.
 ۹. **Charlesworth, B., 2007.** A hitch-hiking guide to the genome: A commentary on 'The hitch-hiking effect of a favourable gene' by John Maynard Smith and John Haigh. *Genetic Research*. Vol. 89, pp: 389-390.
 ۱۰. **Diamond, J., 2002.** Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature*. Vol. 418, pp:700-707.
 ۱۱. **Emmeline, W.H.; Beatrice, A.M.; Jingjing, G.U.; Ronan, W. and David, E.M., 2010.** A genome-wide SNP-association study onfirms a sequence variant (g.66493737C>T) in the equine myostatin (MSTN) gene as the most powerful predictor of optimum racing distance for Thoroughbred racehorses. *BMC genetics*. Vol. 11, pp: 1-10.
 ۱۲. **Flory, L.; Fritz, S.; Jaffrézic, F.; Boussaha, M.; Gut, I.; Heath, S.; Foulley, J.L. and Gautier, M., 2009.** The genome response to artificial selection: A case study in dairy cattle. *PLOS One*. Vol. 4, pp: 6595.
 ۱۳. **Gautier, M. and Renaud, V., 2012.** Reh: An R package to detect footprints of selection in genome-wide SNP data from haplotype structure. *Bioinformatics*. Vol. 28, pp: 1176-1177.
 ۱۴. **Harris, E.E. and Meyer, D., 2006.** The molecular signature of selection underlying human adaptations. *American Journal of Physical Anthropology*. Vol. 131, pp: 89-130.
 ۱۵. **Hayes, B.; Lien, S.; Nilsen, H.; Olsen, H.G.; Berg, P.; MacEachern, S.; Potter, S. and Meuwissen, T.H.E., 2008.** The origin of selection signatures on



- structure. *Nature*. Vol. 419, pp:832-837.
۲۸. **Sabeti, P.; Schaffner, S.F.; Fry, B.; Lohmueller, J.; Varilly, P.; Shamovsky, O.; Palma, A.; Mikkelsen, T.S.; Altshuler, D. and Lande, E.S., 2006.** Positive natural selection in the human lineage. *Science*. Vol. 3129, pp: 1614-1620.
۲۹. **Scheet, P. and Stephens, M., 2006.** A fast and flexible statistical model for large-scale population genotype data: applications to inferring missing genotypes and haplotypic phase. *The American Journal of Human Genetics*. Vol. 78, pp: 629-644.
۳۰. **Schurink, A.; Ducro, B.J.; Bastiaansen, J.W.M.; Frankena, K. and van Arendonk, J.A.M., 2012.** Genome wide association study of insect bite hypersensitivity in Dutch Shetland pony mares. *Animal genetics*. Vol. 44, pp: 44-52.
۳۱. **Teo, Y.Y.; Fry, A.E.; Clark, T.G.; Tai, E.S. and Seielstad, M., 2007.** On the Usage of HWE for identifying genotyping errors. *Annals of Human Genetics*. Vol. 71, pp: 701-703.
۳۲. **Voight, B.F.; Kudravalli, S.; Wen, X. and Pritchard, J.K., 2006.** A map of recent positive selection in the human genome. *PLOS Biology*. Vol. 4, pp: 72.
۳۳. **Yun Young, G.O.; Ernest, B.; Deborah, G.; Cook, J.; Stephen, J.; Coleman, J.; James, N.; MacLeod, N.; Kuey-Chu, C.; Peter, J.; Timoney, J. and Udeni Balasuriya, B.R., 2011.** Genome-wide association study among four horse breeds identifies a common haplotype associated with in vitro CD3+ T cell susceptibility/resistance to equine arteritis virus infection. *Journal of Virology*. Vol. 24, pp:13174-13184.
۳۴. **Zola, H.; Swart, B.; Banham, A.; Barry, S.; Beare, A.; Bensussan, A.; Bounsell, L.; Buckley, D.; Bühring, H.J.; Clark, G.; Engel, P.; Fox, D.; Jin, B.Q.; Macardle, P.J.; Malavasi, F.; Mason, D.; Stockinger, H. and Yang, X., 2007.** CD molecules -human cell differentiation molecules. *Journal Immunology Methods*. Vol. 319, pp: 1-5.

