

روابط تکاملی برخی از گونه‌های بومادران (*Achillea* spp.) متعلق به نواحی مختلف ایرانالهه فیاض<sup>۱</sup>، علیرضا عباسی<sup>۲\*</sup> و محمدرضا نقوی<sup>۳</sup>

۱، ۲ و ۳. دانشجوی دکتری، دانشیار و استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۴ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۴/۲۸)

## چکیده

ارزیابی روابط فیلوژنتیکی در ۱۰ گونه مختلف از گیاه بومادران متعلق به نواحی جغرافیایی مختلف ایران با استفاده از یک آغازگر ITS4 و یک آغازگر MatK 390 انجام گرفت. دو آغازگر MatK 390 و ITS4 در تمامی ۱۰ گونه تکثیر یافتند و بنابراین توالی‌یابی شدند. بر مبنای درخت فیلوژنتیکی حاصل از MatK 390 و ترسیم شده با روش حداکثر درست‌نمایی، تمامی ۱۰ گونه جنس *Achillea* در یک گروه مونوفایلیتیک قرار گرفتند و دو گروه خارجی (*Tanacetum vulgare* و *T. parthenium*) نیز در یک کلاد جداگانه جای گرفتند. همچنین بر اساس درخت فیلوژنتیکی حاصل از نشانگر ITS 4، ۹ گونه از تمامی ۱۰ گونه مورد مطالعه گیاه بومادران در یک گروه مجزا قرار گرفتند. درحالی‌که گونه موسوم به *A. alepica* همراه با چهار گروه خارجی (یعنی، *T. vulgare*، *T. millefolium*، *T. macrophyllum* و *Cotula cinerea*) در کلاستر مجزای دیگری قرار گرفتند. در نهایت، نتایج این تحقیق نشان داد که از هر دو سیستم نشانگری MatK 390 و ITS 4 می‌توان برای آنالیز فیلوژنتیکی و DNA بارکدینگ در گونه‌های مختلف بومادران بومی ایران استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: آنالیز فیلوژنتیک، نشانگر DNA، DNA بارکدینگ.

Evolutionary relationships in some selected species of Yarrow (*Achillea* spp.) collected from various regions of IranElaheh Fayyaz<sup>1</sup>, Alireza Abbasi<sup>2\*</sup> and Mohammad Reza Naghavi<sup>3</sup>

1, 2, 3. Ph.D. Candidate, Associate Professor and Professor, College of Agriculture &amp; Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: Feb. 23, 2019- Accepted: Jul. 19, 2019)

## ABSTRACT

Phylogenetic relationships were assessed in 10 different species of the Yarrow (*Achillea* spp.) originated from geographically different regions of Iran, using three different DNA markers namely ITS 4 and MatK 390. Both of them (MatK 390 and ITS 4) were amplified among all the 10 species, and the resultant amplicons were sequenced for further analyses. Phylogenetic tree of MatK 390 based on maximum likelihood could successfully place all the 10 species of the genus *Achillea* in a major cluster and outgroups (i.e., *Tanacetum vulgare* and *T. parthenium*) in the second major group. Taking phylogenetic tree of ITS 4 into account, all 9 out of 10 species of the genus *Achillea* were grouped into the first main cluster, while all four outgroups (i.e., *T. vulgare*, *T. millefolium*, *T. macrophyllum*, and *Cotula cinerea*) together with the one species of the genus *Achillea* (*A. alepica*) were placed in the second group. Altogether, the results of the current study demonstrated that both MatK 390 and ITS 4 are qualified enough to be utilized as a powerful DNA barcoding system and subsequently phylogenetics analysis in different species of the genus *Achillea* originated from geographically several regions of Iran.

Keywords: DNA barcoding, DNA markers, phylogenetic analysis.

\* Corresponding author E-mail: rezabbasi@ut.ac.ir

## مقدمه

بومادران با نام علمی *Achillea* spp. متعلق به تیره Asteraceae، گیاهی است چند ساله، اغلب کرکدار، با ارتفاع متفاوت در گونه‌های مختلف و انتهای ساقه اغلب ضخیم و چوبی شونده می‌باشد. برای این جنس در دنیا بیش از ۱۰۰ گونه و در ایران ۱۹ گونه علفی چند ساله که اغلب معطر هستند وجود دارد (Mozaffarian, 1998). از گونه *Achillea millefolium* در برخی مناطق دنیا علاوه بر استفاده‌های دارویی، به عنوان گیاه زینتی و پوششی نیز استفاده می‌کنند (Amin et al., 2008).

وجود تنوع بالا در خصوصیات مورفولوژیکی باعث شده که مرزهای گونه‌های خاص از این جنس کاملاً متمایز نبوده و شناسایی گونه‌ها را با کمی مشکل مواجه نموده است (Nemeth, 2005). بسیاری از گونه‌های این جنس تنوع مورفولوژیک بالایی را در نتیجه آثار محیطی از خود نشان داده‌اند که به‌عنوان مثال زیرگونه‌ای از *A. millefolium* ممکن است با گونه *A. collina* در شرایط آب و هوایی خشک اشتباه تشخیص داده شود (Dabrovska, 1977). مشابه با سایر گیاهان، به منظور بررسی تنوع ژنتیکی این گیاه، از نشانگرهای مختلف مورفولوژیکی، متابولیتی و مولکولی استفاده شده است. Taheri et al. (2016)، سه جمعیت مختلف بومادران (*A. wilhelmsii*) را از لحاظ صفات مورفولوژیک مورد بررسی قرار دادند که نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد دو مؤلفه اصلی اول حدود ۹۰ درصد از کل تغییرات را توجیه می‌نمایند. نتایج تجزیه بای پلات نشان داد که هر سه توده تقریباً از یکدیگر تفکیک شده‌اند. تجزیه خوشه‌ای نیز نتایج تجزیه بای پلات را به‌طور کامل تأیید نمود. Rahimmalek et al. (2009)، از نشانگرهای AFLP برای تعیین تنوع ژنتیکی بین و درون پنج گونه مهم اقتصادی بومادران *Achillea* که از مناطق مختلف کشور جمع‌آوری شده بودند، استفاده کردند و تنوع ژنتیکی قابل توجهی در گونه‌های مورد مطالعه از جمله *A. tenuifolia*، *A. filipendulina*، *A. millefolium*، *A. pachycephala* و *A. biebersteinii*، *santolina* مشاهده کردند. همچنین، در تحقیق دیگری، تنوع ژنتیکی ۲۶ نمونه از گونه *A. millefolium* با نشانگرهای

SSR مورد بررسی قرار گرفت و بر مبنای نتایج حاصل از PCoA و تجزیه کلاستر، تقریباً تمامی ژنوتیپ‌های مربوط به یک منطقه جغرافیایی خاص، در یک کلاستر مجزا قرار گرفتند (Rahimmalek et al., 2011). اخیراً نیز با استفاده از نشانگرهای ISSR و فنوتیپی تنوع ژنتیکی ۲۰ جمعیت از *Achillea fragrantissima* مورد بررسی قرار گرفته است. به‌طور کلی، تمامی ۲۰ جمعیت مورد استفاده در این تحقیق، در دو گروه عمده قرار گرفتند و در ضمن برخی از باندهای ISSR مشاهده‌شده با برخی صفات مورفولوژیکی نظیر اندازه گیاه، عملکرد بذر و ویگور بهتر گیاه همبستگی نشان دادند (Badr et al., 2017). علاوه بر انواع نشانگرهای مولکولی مرسوم، امروزه از نشانگرهای مبتنی بر توالی DNA نیز استفاده می‌شود که تحت عنوان بارکدینگ DNA نامگذاری می‌شوند. این روش اولین بار در یک مقاله جامعه شناسی گیاهی به کار برده شد (Arnot et al., 1993) و سپس توسط Hebert et al. (2003) مطرح شد و هدف کلی این تکنیک توسعه و ارتقای استانداردهای جهانی در زمینه شناسایی گونه‌ها است. در رابطه با جنس گیاه دارویی *Achillea* یا بومادران نیز چندین تحقیق در این زمینه انجام شده است. برای مثال، از نشانگرهای مختلفی نظیر ژن *ndhF* پلاستییدی (Watson et al., 2000)، دو نشانگر ITS ریبوزومی هسته‌ای و *trnLF* پلاستییدی (Oberprieler & Vogt, 2000) و نشانگر ITS (Francisco-Ortega et al., 2001) به منظور بررسی روابط بین جنسی در جنس *Achillea* استفاده شده است. نتایج حاصل از این تحقیقات، ارتباط ژنتیکی نزدیکی بین سه جنس *Achillea*، *Otanthus* و *Anacyclus* نشان داد. با این وجود، در تمامی این سه مطالعه، تنها یک گونه منفرد از جنس *Achillea* مورد استفاده قرار گرفته بود. در مطالعه دیگری و به منظور شناسایی گونه‌های مختلف جنس *Achillea* و بررسی روابط فیلوژنی و سیستماتیک در این جنس، از دو سیستم نشانگری nrITS و *trnL-F* استفاده شد (Guo et al., 2004). برخلاف سه مطالعه قبل، در این مطالعه تعداد نمونه بیشتری از جنس *Achillea* استفاده شد (حدود ۹۱

بارکدینگ DNA در برخی از انواع گونه‌های بومی جنس *Achillea* یا بومادران در ایران می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

#### مواد گیاهی

بذور مربوط به ۱۰ گونه مختلف گیاه بومادران از مرکز تحقیقات جنگل‌ها و مراتع واقع در پیکان‌شهر کرج تهیه شد (جدول ۱). با توجه به اطلاعات مندرج بر روی پاکت‌های ارسالی حاوی بذرها، تمامی ۱۰ گونه گیاهی بومادران از ۹ استان کشور جمع‌آوری شده‌اند. به منظور بررسی گونه‌های مورد مطالعه، بذور دریافتی در گلخانه باغ گیاهان دارویی همدان در مخلوطی از خاک مزرعه، ماسه و خاک برگ کشت شدند. پس از رشد به مرحله کافی، از هر گونه به مقدار کافی بافت گیاهی (برگ) تهیه شده، بلافاصله در نیتروژن مایع فریز شده و به‌منظور انجام کارهای آزمایشگاهی به آزمایشگاه انتقال یافتند.

نمونه و درضمن، برای ترسیم روابط فیلوژنی چندین گروه خارجی مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج این مطالعه جامع نشان داد که هر دو سیستم نشانگری، قابلیت تفکیک گونه‌های مختلف جنس *Achillea* و گروه‌های خارجی را دارا هستند و مقایسه این جنس با گروه‌های خارجی نیز نشان داد که جنس *Achillea* احتمالاً به‌صورت منوفایلیتیک می‌باشد (Guo et al., 2004).

علیرغم مطالعات انجام‌شده در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی و فیلوژنی در جنس *Achillea*، تحقیق جامعی در رابطه با بررسی فیلوژنی گونه‌های مختلف جنس *Achillea* بومی ایران و بر مبنای نشانگرهای مبتنی بر توالی DNA انجام نشده است. بنابراین، در تحقیق حاضر، با استفاده از دو سیستم نشانگری مبتنی بر توالی DNA موسوم به MatK و ITS، تجزیه فیلوژنی ۱۰ گونه مختلف جنس *Achillea* مورد ارزیابی قرار گرفت. این مطالعه، اولین تحقیق انجام‌شده در زمینه



شکل ۱. توزیع جغرافیایی تمامی ۱۰ گونه گیاهی بومادران جمع‌آوری شده از ۹ استان کشور ایران  
Figure 1. Geographical distribution of 10 species of the genus *Achillea* spp. collected from 9 provinces of Iran

جدول ۱. مشخصات مربوط به ۱۰ گونه جنس *Achillea* spp. و محل جمع‌آوری آنها

Table 1. Characteristics of 10 species of of the genus *Achillea* spp. and their sampling place

No	Sample ID	Species	Sampling place
1	31050	<i>A. alepica</i>	Lorestan
2	31051	<i>A. biebersteinii</i>	Lorestan
3	34000	<i>A. eriophora</i>	Yazd
4	30231	<i>A. filipendula</i>	Ardebil
5	42022	<i>A. millefolium</i>	Qom
6	27023	<i>A. nobilis</i>	Guilan
7	43384	<i>A. santolina</i>	Karaj
8	39374	<i>A. tenuifolia</i>	Qazvin
9	40051	<i>A. vermicularis</i>	Tehran
10	39899	<i>A. wilhelmsii</i>	Markazi

حاصل از PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. پس از تایید قطعات تکثیری، باندهای مشاهده با دقت از روی ژل جداسازی شده و به روش Glass milk تخلیص صورت گرفت. در ادامه، قطعات تکثیر یافته جهت توالی یابی به شرکت ماکروژن کره ارسال شد.

#### آنالیزهای جمعیتی

پس از خوانش دو طرفه ژن‌های مورد نظر با استفاده از آغازگرهای پیشرو و پسرو، از نرم‌افزار ChromasPro 2.1, Technelysium ( Pty Ltd, Tewantin, Australia) برای مشاهده نتایج استفاده شد و توالی‌ها در نرم‌افزار NotePad به صورت یک فایل با فرمت Text ذخیره شدند. سپس، به منظور انجام اصلاحات لازم بر روی قطعات هدف، هر توالی با هر دو آغازگر مربوط به خود، توسط نرم‌افزار Clustalw هم‌ردیف شد و داده‌های حاصل از آن مورد گزینش قرار گرفت. در ادامه، به جهت حصول اطمینان از نتایج دریافتی، از اطلاعات موجود در NCBI استفاده شد و طی عملیات همپوشانی توسط برنامه Blast، بررسی، مقایسه و تعیین هویت توالی تکثیر یافته مد نظر انجام پذیرفت. برای به‌دست‌آوردن contig‌های مد نظر، از نرم‌افزار CAP3 استفاده شد (Huang & Madan, 1999). در نهایت، به منظور بررسی روابط فیلوژنتیکی بین تمامی ۱۰ گونه مورد مطالعه در این تحقیق، نتایج نهایی حاصل از تعیین توالی با استفاده از نرم‌افزار مرتبط، نظیر MEGA 6 (Tamura et al., 2013) و با توجه به نتایج آنالیز تجزیه خوشه‌ای (روابط فیلوژنتیک)، میزان تنوع ژنتیکی در بین گونه‌های گیاهی مورد آزمایش ارزیابی شد. همچنین، به منظور ریشه دار کردن درخت فیلوژنی، برای هر دو سیستم نشانگری استفاده شده (یعنی ITS 4 و MatK 390)، از گروه‌های خارج (outgroups) مربوطه استفاده شد. برای مثال، برای نشانگر ITS، با توجه به مطالعه پیشین انجام گرفته بر روی جنس *Achillea* (Guo et al., 2004)، از توالی ITS چهار گونه موسوم به *T. millefolium* (AY603264)، *Tanacetum vulgare* (AY603262) و *T. macrophyllum* (AY603263) و

#### استخراج DNA و انجام واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR)

به منظور استخراج DNA از بافت‌های گیاهی، از روش CTAB تغییر یافته استفاده شد (Doyle & Doyle, 1990). به منظور بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراجی، مقدار دو میکرولیتر از هر نمونه بر روی حسگر دستگاه نانودارپ مدل ۱۰۰۰ قرار داده شد و میزان جذب هر یک در طول موج ۲۶۰ نانومتر و نیز نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ و ۲۶۰ به ۲۳۰ اندازه گیری شد. سنجش کیفیت و کمیت تمامی نمونه های DNA استخراج شده با ژل آگارز ۱٪ نیز انجام شد.

#### آغازگرهای مورد استفاده

در این تحقیق، از دو جفت آغازگر اختصاصی مربوط به ژن‌های *ITS* و *MatK 390* استفاده شد (جدول ۲). برای تکثیر از DNAهایی با غلظت ۲۰ ng/μL استفاده شد. حجم نهایی واکنش ۲۰ میکرولیتر بود. چرخه‌های حرارتی پی‌سی‌آر تکثیر اختصاصی با این جفت آغازگرها شامل مرحله اول؛ واسرشته‌سازی اولیه به مدت ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله دوم؛ ۳۵ چرخه، ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و ۵۸ (MatK) ۶۰ (ITS) درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه و مرحله سوم؛ بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

جدول ۲. مشخصات دو جفت آغازگر اختصاصی مربوط به

ژن‌های *ITS* و *MatK 390*

Table 2. Characteristics of 3 primers of *ITS* and *MatK 390* genes

Gene	Primer	Sequence
<i>ITS 4</i>	F	5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC3'
	R	5'GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G3'
<i>MatK 390</i>	F	5'CGA TCT ATT CAT TCA ATA TTT C3'
	R	5'TCT AGC ACA CGA AAG TCG AAG T3'

#### جداسازی قطعات تکثیر یافته و توالی یابی

برای تمامی ۱۰ گونه مورد مطالعه، پس از انجام PCR، قطعات تکثیر یافته بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد لود شدند. سپس، با استفاده از دستگاه Gel Doc، نتایج

مشابه با داده‌های حاصل از *MatK* 390، برای داده‌های نوکلئوتیدی نشانگر *ITS* 4 مربوط به ۱۰ گونه جنس *Achillea* و چهار گروه خارجی موسوم به *T. macrophyllum*، *T. millefolium*، *T. vulgare* و *C. cinerea* و بر مبنای دو معیار تکاملی BIC و AIC، از بین ۲۴ مدل پیشنهادی، مدل Kimura (1980) موسوم به K2+G (با در نظر گرفتن گروه‌های خارجی)، به عنوان بهترین مدل تکاملی نوکلئوتیدی، برای توالی‌های مورد مطالعه در نظر گرفته شد. در حقیقت، با توجه به این‌که، از بین مدل‌های پیشنهادی، این مدل کمترین میزان BIC را دارا بود (۵۲۳۶/۷۸)، بنابراین برای انجام سایر آنالیزهای فیلوژنی از مدل دو پارامتری کیمورا استفاده شد. در ضمن، با در نظر گرفتن هفت گروه خارجی و بر مبنای بهترین مدل پیشنهادی، فراوانی چهار باز آدنین، گوانین، سیتوزین و تیمین ۲۵ درصد در نظر گرفته شد. همچنین، میزان جایگزینی نوکلئوتیدی بین ۴ تا ۱۶ درصد متغیر بود (شکل ۳-b).

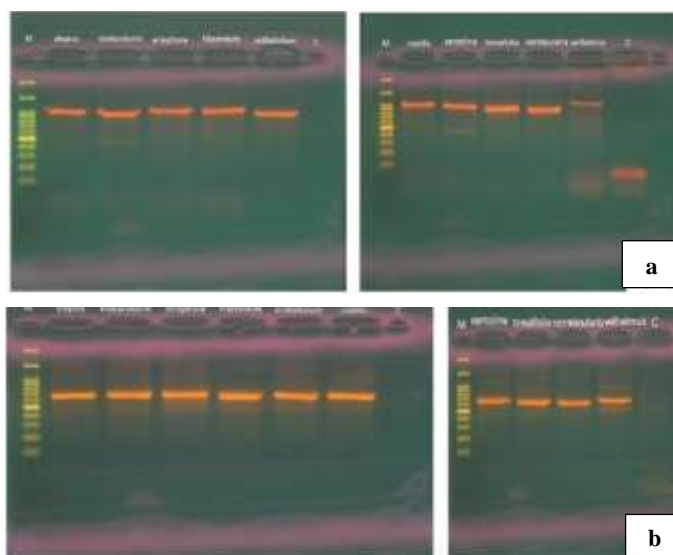
همچنین، به منظور بررسی میزان احتمال جایگزینی یک باز به باز دیگر (یعنی انواع جایگزینی‌های انتقالی Transitional substitutions و متقاطع Transversional substitutions)، از شاخصی موسوم به ماتریس جایگزینی برآورد حداکثر درست‌نمایی (Maximum Likelihood Estimate of Substitution Matrix) استفاده شد، که در آن میزان احتمال جایگزینی یک باز (ردیف) با باز دیگر (ستون) نشان داده می‌شود. همانطور که در جدول ۳ نشان داده شده است، برای ژن *MatK*، بیشترین میزان جایگزینی متقاطع (اعداد به صورت ایتالیک) برای T/U با A و برعکس، T/U با G و A با C به دست آمد، در حالی که بیشترین میزان جایگزینی انتقالی (اعداد به صورت **Bold**) برای T/U با A و C با G به دست آمد. برای *ITS4*، برای تمامی حالات جایگزینی متقاطع (اعداد به صورت ایتالیک) عدد مشابهی، یعنی ۴/۷۸ محاسبه شد و برای هر چهار حالت جایگزینی انتقالی (اعداد به صورت **Bold**) نیز تنها یک عدد، یعنی ۱۵/۴۴ به دست آمد.

*Cotula cinerea* (AY603260) به عنوان گروه خارجی استفاده شد. برای نشانگر *MatK*، نیز از توالی *MatK* متعلق به دو گونه موسوم به *T. vulgare* (JN895338) و *T. parthenium* (JN894898) به عنوان گروه خارجی استفاده شد (Guo et al., 2004). برای انجام آنالیز روابط فیلوژنتیکی و ترسیم درخت فیلوژنی از روش حداکثر درست‌نمایی (Maximum Likelihood) استفاده شد.

### نتایج و بحث

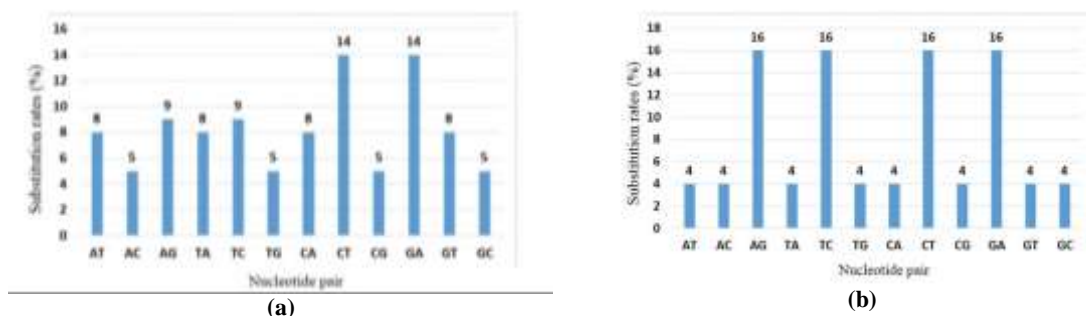
دو نشانگر *ITS* 4 و *MatK* 390 در تمامی ۱۰ گونه مورد مطالعه تکثیر یافتند. با توجه به نتایج حاصل از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد برای دو نشانگر *MatK* 390 و *ITS* 4 در تمامی ۱۰ گونه مورد مطالعه، قطعات تکثیری مورد انتظار، (به ترتیب، یعنی ۱۰۰۰ و ۷۰۰ جفت باز)، مشاهده شد و تقریباً هیچ‌گونه چندشکلی نیز در بین گونه‌ها مشاهده نشد (شکل ۲-a, b).

مربوط به ۱۰ گونه جنس *Achillea* به همراه دو گروه خارجی موسوم به *T. vulgare* و *T. parthenium* و بر مبنای دو معیار تکاملی مرسوم، موسوم به آزمون معیارهای اطلاعات بیزین (Bayesian Information Criterion) و اطلاعات آکایکه (AIC: Aaike Information Criterion)، از بین ۲۴ مدل پیشنهادی، مدل Tamura (1992) موسوم به T92+G (با در نظر گرفتن گروه خارجی)، به عنوان بهترین مدل تکاملی نوکلئوتیدی، برای توالی‌های مورد مطالعه در نظر گرفته شد. در حقیقت، Nei & Kumar (2000)، عنوان کرده‌اند که بهترین مدل جایگزینی نوکلئوتیدی DNA برای تخمین فواصل تکاملی بایستی کمترین میزان BIC را دارا باشد. بنابراین، با توجه به این‌که از بین ۲۴ مدل پیشنهادی، این مدل کمترین میزان BIC را دارا بود (۲۱۹۸/۲۶)، برای انجام سایر آنالیزهای فیلوژنی از مدل سه پارامتری Tamura (1992) استفاده شد. با در نظر گرفتن گروه خارجی و بر مبنای بهترین مدل پیشنهادی، فراوانی چهار باز آدنین، تیمین، سیتوزین و گوانین به ترتیب ۳۱/۱۱، ۳۱/۱۱، ۱۸/۸۹ و ۱۸/۸۹ درصد تخمین زده شد. در ضمن، میزان جایگزینی نوکلئوتیدی بین ۵ تا ۱۴ درصد متغیر بود (شکل ۳-a).



شکل ۲. نتایج الکتروفوروز ژل آگارز حاصل از تکثیر دو نشانگر MatK 390 (الف) و ITS 4 (ب) بر روی ۱۰ گونه جنس *Achillea* در تمامی ۱۰ گونه مورد مطالعه، قطعات تکثیری مورد انتظار (به ترتیب، یعنی ۱۰۰۰ و ۷۰۰ جفت باز)، مشاهده شد. برای تخمین اندازه باندها، از مارکر وزن مولکولی 100 bp استفاده شد.

Figure 2. Agarose gel electrophoresis results of MatK 390 (A) and ITS 4 (B) for 10 species of the genus *Achillea* spp.; In all the 10 species of the genus *Achillea* spp. the expected amplicon sizes of 1000 and 700 bp were observed. M: Molecular marker (100 bp).



شکل ۳. میزان جایگزینی نوکلئوتیدی برای هر جفت باز (با احتساب توالی گروه‌های خارجی) برای دو ژن MatK 390 (الف) و ITS 4 (ب)

جدول ۳. ماتریس جایگزینی برآورد حداکثر درست‌نمایی برای دو نشانگر MatK 390 (چپ) و ITS 4 (راست)

Table 3. Maximum likelihood estimate of substitution matrix for MatK 390 (Left) and ITS 4 (Right)

MatK 390					ITS 4				
	A	T/U	C	G		A	T/U	C	G
A	-	7.40	4.50	<b>9.90</b>	A	-	4.78	4.78	<b>15.44</b>
T/U	7.40	-	<b>9.90</b>	4.50	T/U	4.78	-	<b>15.44</b>	4.78
C	7.40	<b>16.30</b>	-	4.50	C	4.78	<b>15.44</b>	-	4.78
G	<b>16.30</b>	7.40	4.50	-	G	<b>15.44</b>	4.78	4.78	-

به‌دست‌آمده از ماتریس جایگزینی برآورد حداکثر درست‌نمایی، که برای هر دو حالت جایگزینی انتقالی و متقاطع، اعداد مشابهی به‌دست آمد، زمانی که این پارامتر محاسبه شد، بیشترین میزان جایگزینی متقاطع (اعداد به‌صورت ایتالیک) برای A با T و A با C مشاهده شد (یعنی ۴/۸۲) و بیشترین میزان جایگزینی انتقالی (اعداد به‌صورت **Bold**) نیز برای A با G به‌دست آمد (۱۷/۲).

علاوه بر شاخص فوق، همچنین، پارامتری تحت عنوان برآورد حداکثر درست‌نمایی مرکب الگوی جایگزینی نوکلئوتیدی (Maximum Composite Nucleotide Likelihood Estimate of the Pattern of Substitution) استفاده شد، که نتایج تقریباً مشابه با ماتریس قبلی برای ژن MatK 390 به‌دست آمد (جدول ۴). با این وجود، برای ژن ITS 4، برخلاف اعداد

جدول ۴. برآورد حداکثر درست‌نمایی مرکب الگوی جایگزینی نوکلئوتیدی برای دو ژن *MatK 390* (چپ) و *ITS 4* (راست)

Table 4. Maximum composite likelihood estimate of nucleotide substitution for *MatK 390* (Left) and *ITS 4* (Right)

<i>MatK 390</i>					<i>ITS 4</i>				
	A	T/U	C	G		A	T/U	C	G
A	-	6.87	4.45	<b>10.37</b>	A	-	4.59	4.55	<b>16.24</b>
T/U	7.62	-	<b>9.77</b>	4.35	T/U	4.82	-	<b>14.7</b>	4.55
C	7.62	<b>15.11</b>	-	4.35	C	4.82	<b>14.82</b>	-	4.55
G	<b>18.15</b>	6.87	4.45	-	G	<b>17.2</b>	4.59	4.55	-

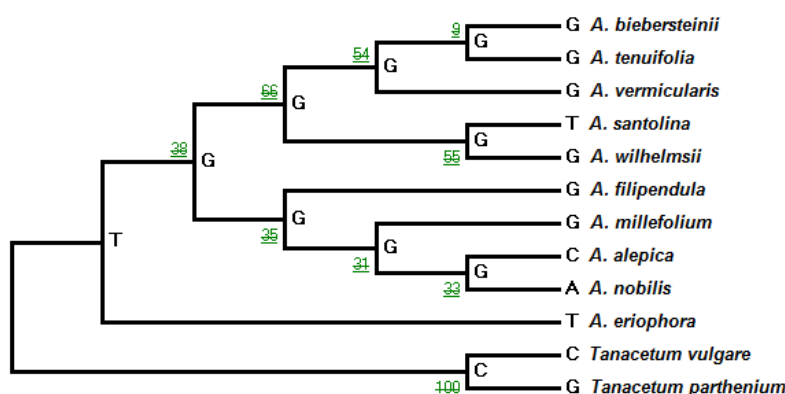
دوم نوکلئوتید G به‌عنوان جد نوکلئوتیدی مشترک پیشنهاد شدند. این امر نشان می‌دهد که علی‌رغم وجود تنوع بین‌گونه‌ای در جنس *Achillea* بومی ایران بالاست، هرچند در بین آنها برخی رابطه خویشاوندی نزدیک‌تری با یکدیگر دارند، در صورتی که برخی نیز به نسبت فاصله تکاملی یا خویشاوندی بیشتری دارند.

برخلاف نتایج حاصل از درخت فیلوژنی به‌دست‌آمده از توالی نشانگر *MatK 390*، درخت فیلوژنی حاصل از ژن *ITS 4* خروجی نسبتاً متفاوت‌تری ارائه نمود (شکل ۵)، هرچند در مجموع، بین گونه‌های مختلف تفکیک انجام گرفت. به‌طور خلاصه، تمامی ۱۰ گونه مورد مطالعه جنس *Achellia* همراه با چهار گروه خارجی، در دو کلاستر مجزا قرار گرفتند، به گونه‌ای که در کلاستر اول، ۹ گونه از جنس *Achillea* قرار گرفتند، در حالی که چهار گروه خارجی به همراه یکی از گونه‌های جنس *Achillea* موسوم به *A. alepica* گروه دوم را تشکیل دادند. گروه اول، خود به سه زیرگروه اصلی تقسیم شد که در زیر گروه اول ۷ گونه (یعنی *A. tenuifolia*، *A. millefolium*، *A. wilhelmsii*، *A. vermicularis*، *A. eriophora* و *A. filipendula* و *A. nobilis*) قرار گرفتند و نوکلئوتید T نیز به‌عنوان جد نوکلئوتیدی مشترک در نظر گرفته شد. در زیرگروه‌های دوم و سوم نیز به‌ترتیب دو گونه *A. santolina* و *A. biebersteinii* قرار گرفتند و نوکلئوتیدهای T و A نیز به‌عنوان جد نوکلئوتیدی مشترک در نظر گرفته شدند. کلاستر دوم نیز به دو زیرگروه تقسیم شد، به گونه‌ای که زیر گروه اول تنها شامل *A. Alepica* بود و زیرگروه دوم نیز شامل تمامی چهار گروه خارجی بود. در ضمن، برای هر دو زیرگروه، نوکلئوتید T به‌عنوان جد نوکلئوتیدی مشترک پیشنهاد شد.

#### بررسی روابط فیلوژنی

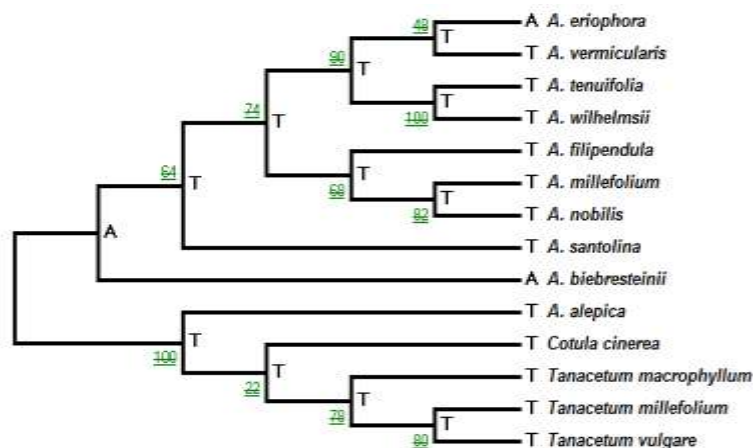
به‌طور کلی، با توجه به نتایج حاصل از درخت فیلوژنتیکی ترسیم‌شده با الگوریتم حداکثر درست‌نمایی، تمامی ۱۰ گونه مورد مطالعه در این تحقیق، تفاوت‌هایی را از لحاظ توالی با یکدیگر نشان دادند، به گونه‌ای که در کلاسترهای جداگانه قرار گرفتند. جزئیات به شرح ذیل می‌باشد.

درخت فیلوژنی حاصل از حداکثر درست‌نمایی با توالی *MatK* مربوط به دو گونه *T. vulgare* و *T. parthenium* ریشه‌دار شد. به‌طور خلاصه و بر اساس داده‌های توالی *MatK 390*، تمامی ۱۰ گونه مورد مطالعه جنس *Achellia* همراه با دو گروه خارجی در دو کلاستر جداگانه تقسیم بندی شدند (شکل ۴)، به گونه‌ای که تمامی ۱۰ گونه جنس *Achellia* در یک گروه فراگیر (Monophyletic) قرار گرفتند و دو گروه خارجی نیز در یک جداگانه جای گرفتند. با این وجود، گروه اول نیز خود به سه زیرگروه تقسیم شد. ۵ گونه اول یعنی *A. biebersteinii*، *A. vermicularis*، *A. tenuifolia* و *A. wilhelmsii* و *A. santolina* در زیرگروه اول قرار گرفتند و نوکلئوتید G نیز به‌عنوان جد نوکلئوتیدی مشترک در نظر گرفته شد. زیرگروه دوم شامل ۴ گونه *A. Alepica*، *A. nobilis*، *A. filipendula* و *A. millefolium* بود و مشابه با گروه قبلی، نوکلئوتید G به‌عنوان جد نوکلئوتیدی مشترک در نظر گرفته شد. زیرگروه سوم نیز تنها دارای یک گونه موسوم به *A. eriophora* بود و نوکلئوتید T به‌عنوان جد نوکلئوتیدی مشترک در نظر گرفته شد. در نهایت، همانطور که انتظار می‌رفت، دو گونه *T. vulgare* و *T. parthenium* (به‌عنوان گروه خارجی) نیز در یک گروه مجزا قرار گرفتند، با این تفاوت که برای گونه اول نوکلئوتید C و برای گونه



شکل ۴. درخت تبارشناسی به‌دست‌آمده از توالی نشانگر MatK 390 مربوط به ۱۰ گونه گیاهی از جنس *Achillea* با استفاده از روش حداکثر درست‌نمایی و محتمل‌ترین اجداد برای چهار نوکلئوتید<sup>۱</sup>. دو گونه *T. vulgare* و *T. parthenium* به‌عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شده‌اند. اعداد پایین شاخه نمایانگر شاخص بوت استرپ حاصل از روش حداکثر درست‌نمایی می‌باشد.

Figure 4. Phylogenetic tree constructed from MatK 390 in 10 species of the genus *Achillea* spp. based on maximum likelihood and most probable ancestor of nucleotides. Both *T. vulgare* and *T. parthenium* are outgroups. Numbers indicate Bootstrap percentages



شکل ۵. درخت تبارشناسی به‌دست‌آمده از توالی نشانگر ITS4 مربوط به ۱۰ گونه گیاهی از جنس *Achillea* با استفاده از روش حداکثر درست‌نمایی و محتمل‌ترین اجداد برای چهار نوکلئوتید. چهار گروه خارجی موسوم به *T. macrophyllum*، *T. millefolium*، *T. vulgare* و *C. cinerea* به‌عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شده‌اند. اعداد پایین شاخه نمایانگر شاخص بوت استرپ حاصل از روش حداکثر درست‌نمایی می‌باشد.

Figure 5. Phylogenetic tree constructed from ITS in 10 species of the genus *Achillea* spp. based on maximum likelihood and most probable ancestor of nucleotides. All four species of *C. cinerea*, *T. macrophyllum*, *T. vulgare* and *T. millefolium* are outgroups. Numbers indicate Bootstrap percentages

۳۹۰، نوکلئوتید غالب، باز گوانین (G) می‌باشد ولی برای درخت فیلوژنی حاصل از ITS، نوکلئوتید غالب باز تیمین (T) بود. بنابراین، ترکیبی از چندین سیستم نشانگری به همراه سایر نشانگرها نظیر نشانگرهای مولکولی SSR و همچنین مورفولوژیک می‌تواند به درک صحیح‌تری از روابط فیلوژنی حاکم بر این جنس *Achillea* بیانجامد.

به‌عنوان دومین نکته حائز اهمیت، مقایسه دو درخت فیلوژنی نشان داد که در جنس *Achillea* استفاده از

مقایسه دو درخت فیلوژنی حاصل از هر دو سیستم نشانگری ITS و MatK 390 نشان می‌دهد که اولاً هر سیستم نشانگری خود می‌تواند منجر به یک الگوی تفکیک جمعیتی مجزا گردد، که در آنها نوکلئوتیدهای متفاوتی نیز می‌توانند به‌عنوان جد نوکلئوتیدی مشترک پیشنهاد شوند. برای مثال، با وجود مشابه بودن گونه‌های مورد مطالعه برای هر دو سیستم نشانگری استفاده‌شده در این تحقیق، برای درخت فیلوژنی حاصل از MatK



بوت استرپ حاصل حدود ۵۵ درصد بود) ولی با سیستم نشانگری ITS در کلادهای جداگانه قرار گرفتند. دلیل این امر نیز می‌تواند وجود برخی عوامل از جمله خطا در نامگذاری گونه مورد مطالعه (عدم تشخیص صحیح هنگام نمونه‌برداری)، تغییر در بک گراند ژنتیکی هر ژنوتیپ وجود جایگزینی‌های متعدد و گاه برگشت ناپذیر در توالی DNA طی یک دوره طولانی مدت تکاملی ناشی از جدایی جغرافیایی و ... باشد. از بین عوامل یادشده، جدایی جغرافیایی می‌تواند بسیار با اهمیت می‌باشد، چرا که این امر خود منجر به انشقاق یا گونه‌زایی می‌گردد، به گونه‌ای که دو جمعیت از یک گونه به دلیل موانع جغرافیایی از یکدیگر جدا شده و بنابراین قادر به آمیزش با یکدیگر نخواهند بود. نتیجه این امر، خود منجر به فرار ژنی شده و نهایتاً هر جمعیت مسیر تکاملی خود را به صورت مستقل ادامه می‌دهد. با نگاهی به منشأ دو گونه یاد شده، که یکی از کرج (*A. santolina*) و دیگری از مرکزی (*A. wilhelmsii*) می‌باشند، این احتمال قوت می‌گیرد که با توجه به فاصله جغرافیایی بین این دو منطقه، احتمالاً جدایی جغرافیایی تا حدودی منجر به ایزوله شدن دو گونه از یکدیگر شده است. نقطه حایز اهمیت دیگر میزان تفاوت در ژنوم دو گونه بر حسب دو جایگاه نشانگری است، به گونه‌ای که بر اساس MatK 390 هر دو گونه تقریباً از شباهت بالایی برخوردار هستند، اما هنگام استفاده از ITS، دو گونه تفاوت بیشتری نشان می‌دهند، که احتمالاً این امر خود ناشی از میزان تغییرات رخ داده بیشتر در ناحیه ITS در مقایسه با MatK 390 می‌باشد. از سوی دیگر، اگر نتایج درخت فیلوژنی حاصل از MatK 390 را مد نظر قرار دهیم، زیرگروه سوم تنها دارای یک گونه موسوم به *A. eriophora* بود که منشأ آن استان یزد می‌باشد، که از لحاظ بعد مسافتی نیز نسبت به سایر مناطق نمونه‌برداری فاصله مکانی بیشتری دارد و بخوبی از سایر گونه‌ها جدا شده است. حال اگر درخت فیلوژنی حاصل از ITS 4 را در نظر بگیریم این گونه با ۶ گونه دیگر در زیرگروه اول (یعنی *A. tenuifolia*، *A. millefolium*، *A. wilhelmsii*، *A. vermicularis*، *A. filipendula* و *A. nobili*) قرار می‌گیرد. این امر

می‌تواند به جداسازی تمامی گونه‌های مورد مطالعه به صورت یک گروه منوفایلیتیک منجر شود، درحالی‌که پس از ترسیم درخت فیلوژنی حاصل از ITS، یکی از گونه‌های این جنس موسوم به *A. Alepica* در clade مربوط به گروه خارجی قرار گرفت. بنابراین، استفاده از سیستم‌های نشانگری بیشتر و متنوع می‌تواند ابهام ایجادشده را برطرف نماید، مبنی بر این‌که آیا گونه *A. Alepica* به گروه‌های خارجی نزدیک‌تر است یا این‌که تنها در این جایگاه، گونه مد نظر به سمت گروه‌های خارجی تمایل (شیفت) پیدا کرده است. با توجه به نتایج این تحقیق و عدم وجود مطالعه مبتنی بر فیلوژنی *A. Alepica*، تفسیر بیشتر برای نتایج فوق امکان‌پذیر نمی‌باشد و تنها در صورتی می‌توان با قطعیت در رابطه با فاصله تکاملی زیاد این گونه با ۹ گونه دیگر جنس *Achillea* بحث نمود که نتایج نشانگرهای دیگری نیز موجود و در دسترس باشد. البته، باید ذکر کرد که نتایج درخت فیلوژنی حاصل از MatK 390، به خوبی این تفاوت را نشان می‌دهد و تنها برای اطمینان بیشتر، استفاده از دیگر سیستم‌های نشانگری توصیه می‌گردد. مقایسه نتایج فوق با نتایج حاصل از تحقیقات پیشین در رابطه با جنس *Achillea* نشان می‌دهد که استفاده از هر دو سیستم نشانگری ITS 4 و MatK 390 (به استثنای نتایج فیلوژنی حاصل از ITS برای گونه *A. Alepica*)، می‌تواند منجر به تفکیک واضح گونه‌ها و زیرگونه‌های این جنس از گروه‌های خارجی گزارش شده در تحقیقات پیشین گردد، همان‌طور که در تحقیق Guo et al. (2004)، نتایج فیلوژنی حاصل از ITS به وضوح گونه‌ها و زیرگونه‌های این جنس را از گروه‌های خارجی تفکیک نمود.

نکته قابل توجه این‌که در مطالعه Guo et al. (2004)، هر دو گونه *A. santolina* و *A. wilhelmsii* معادل با یکدیگر در نظر گرفته شده‌اند (یعنی  $A. wilhelmsii = A. santolina$ ) و نتایج درخت فیلوژنی نیز هر دو ژنوتیپ استفاده شده از گونه *A. wilhelmsii* را در یک کلاد Clade (با بوت استرپ ۱۰۰ درصد) قرار داد. مشابه با این امر، در این مطالعه نیز دو ژنوتیپ از هر دو گونه فوق‌الذکر استفاده شد که هر دو با سیستم نشانگری MatK 390 در یک clade قرار گرفتند (هرچند میزان

امر خود ناشی از توزیع جغرافیایی ناهمگن (Fragmented geographical distribution) می‌باشد (Gharibi et al., 2011). عنوان شده است که گونه گیاهی بومادران (*A. millefolium*) فاقد مکانیسم تخصصی برای پراکندگی ژنی با مسافت‌های طولانی Long-distance gene dispersal می‌باشد. بنابراین، با فرض این‌که گرده افشانی با حشرات صورت می‌گیرد و پراکندگی بذری نیز با عوامل متعددی نظیر پرندگان، انسان و حیوانات انجام می‌شود، بنابراین، به‌نظر می‌رسد که در این گونه گیاهی مهاجرت ژنی برای مسافت‌های طولانی به‌صورت پدیده‌ای نادر انجام پذیرد (Löfgren, 2002).

از سوی دیگر، به‌نظر می‌رسد که هرچند دو گونه *A. alepica* و *A. biebersteinii* از یک منطقه جغرافیایی مشابه نشأت گرفته‌اند (یعنی لرستان)، اما هر دو در گروه‌های مجزا قرار می‌گیرند و حتی نوکلئوتیدهایی که به‌عنوان جد نوکلئوتیدی مشترک در نظر گرفته می‌شوند نیز متفاوت می‌باشند. این امر، احتمالاً ناشی از تفاوت در سطح توالی نوکلئوتیدی و در نتیجه، فاصله ژنتیکی بیشتر بین این دو گونه می‌باشد. درضمن، ذکر این نکته حایز اهمیت است که بین دو گونه، احتمالاً و علی‌رغم وجود منطقه جغرافیایی مشترک، تبادل ژنتیکی محسوس رخ نداده است و باصطلاح هر دو از پایه ژنتیکی منحصر به فرد برخوردارند. برای گونه *A. alepica* این امر بیشتر قابل توجه است، چراکه اگر درخت فیلوژنی حاصل از ITS 4 را در نظر بگیریم، این گونه تمایل دارد تا با گروه‌های خارجی در یک گروه قرار بگیرد. با مروری بر تحقیقات پیشین در زمینه سایر موجودات نیز می‌توان به چنین تفاوت‌هایی پی برد. برای مثال، در تحقیقی که بر روی جمعیت‌های مختلف گوسفند نژاد Awassi انجام شد، نوکلئوتیدهایی که به‌عنوان جد نوکلئوتیدی مشترک بین جمعیت‌های مختلف در نظر گرفته شدند متنوع بودند و نکته قابل توجه این‌که حتی برای افراد درون یک جمعیت با یک منشأ جغرافیایی مشابه نیز نوکلئوتیدهای متفاوتی به‌عنوان جد نوکلئوتیدی مشترک گزارش شدند (Al-Tiyat & Aljumaah, 2014).

نشان می‌دهد که احتمالاً نشانگر *MatK* 390 قابلیت بیشتری برای تفکیک گونه‌ها هم از لحاظ ژنتیکی و هم از لحاظ جغرافیایی دارد.

علی‌رغم موارد فوق، نشانگرهای استفاده‌شده در این تحقیق قادر به جداکردن تمامی گونه‌ها بر مبنای منشأ جغرافیایی آنها نبودند، که این امر احتمالاً به خاطر وجود تفاوت ژنتیکی متنوع در بین گونه‌ها می‌باشد، به گونه‌ای که حتی دو گونه با منشأ جغرافیایی یکسان (برای مثال، لرستان) نیز ممکن است در clade‌های مجزا قرار بگیرند. برای توضیح این مشاهده، بایستی عنوان کرد که در عمده تحقیقات پیشین، معمولاً از یک گونه خاص (برای مثال، گونه *A. millefolium*)، اکوتیپ‌های مختلف جمع‌آوری شده است که در چنین مواردی معمولاً جمعیت‌های هر ناحیه جغرافیایی خاص (یعنی اکوتیپ‌ها) بهتر تفکیک می‌شوند، اما در اینجا گونه‌های متفاوت با یک گراند ژنتیکی متفاوت استفاده شده‌اند که معمولاً تحت چنین شرایطی امکان این‌که دو گونه متفاوت با یک منشأ جغرافیایی در دو clade مجزا قرار بگیرند وجود دارد. برای مثال، Gharibi et al. (2011)، با استفاده از ۱۴ نشانگر مولکولی ISSR به همراه نشانگرهای مورفولوژیک، میزان چند شکلی ژنتیکی را در گیاه داروئی بومادران (*A. millefolium*) متعلق به مناطق جغرافیایی مختلف ایران را مورد بررسی قرار دادند. بر مبنای نتایج حاصل از PCoA و تجزیه کلاستر، غالب نمونه‌های متعلق به یک منطقه جغرافیایی مشابه، در یک گروه مجزا قرار گرفتند (Gharibi et al., 2011). همچنین، در تحقیق دیگری، تنوع ژنتیکی ۲۶ نمونه از گونه *A. millefolium* با نشانگرهای SSR مورد بررسی قرار گرفت و بر مبنای نتایج حاصل از PCoA و تجزیه کلاستر، تقریباً تمامی ژنوتیپ‌های مربوط به یک منطقه جغرافیایی خاص، در یک کلاستر مجزا قرار گرفتند (Rahimalek et al., 2011).

از جمله دیگر دلایلی که می‌تواند توضیحی بر جدانشدن تمامی گونه‌ها بر مبنای منشأ جغرافیایی آنها باشد، تفاوت ژنتیکی گسترده‌ای است که معمولاً در بین جمعیت‌ها و گونه‌های مختلف گیاه بومادران متعلق به نواحی مختلف جغرافیایی وجود دارد، که این

## نتیجه گیری کلی

که در عمده تحقیقات پیشین، معمولاً از یک گونه خاص (برای مثال، گونه *A. millefolium*)، اکوتیپ‌های مختلف جمع‌آوری شده است که در چنین مواردی معمولاً جمعیت‌های هر ناحیه جغرافیایی خاص (یعنی اکوتیپ‌ها) بهتر تفکیک می‌شوند، اما در اینجا گونه‌های متفاوت با یک گراند ژنتیکی متفاوت استفاده شده‌اند که معمولاً تحت چنین شرایطی امکان این‌که دو گونه متفاوت با یک منشأ جغرافیایی در دو clade مجزا قرار بگیرند وجود دارد. درضمن، نتایج این تحقیق نشان داد که علی‌رغم ایجاد چندشکلی بین گونه‌های مختلف و همچنین بین گونه‌های جنس و گروه‌های خارجی، ظاهراً نشانگر *MatK 390* از قدرت تفکیک بیشتری برخوردار است، چراکه تمامی ۱۰ گونه مورد مطالعه مربوط به جنس را از گروه‌های خارجی جدا نمود ولی *ITS 4* قادر به تفکیک یکی از گونه‌ها نشد. درنهایت، نتایج این تحقیق نشان داد که از هر دو سیستم نشانگری *MatK 390* و *ITS 4* می‌توان برای آنالیز فیلوژنتیکی در گونه‌های مختلف بومادران بومی ایران استفاده نمود و این‌که تنوع بین گونه‌ای نسبتاً بالایی بین گونه‌های مختلف بومادران بومی ایران وجود دارد.

به‌طور کلی، در این تحقیق، روابط فیلوژنتیکی ۱۰ گونه مختلف از گیاه بومادران با استفاده از یک آغازگر ITS4 و یک آغازگر *MatK 390* مورد ارزیابی قرار گرفت. دو آغازگر *MatK 390* و *ITS 4* در تمامی ۱۰ گونه مورد مطالعه تکثیر یافتند. نتایج مبتنی بر دو معیار تکاملی BIC و AIC، نشان داد که دو سیستم نشانگری *MatK 390* و *ITS 4* به ترتیب از مدل Tamura (1992) موسوم به T92+G و مدل Kimura (1980) موسوم به K2+G پیروی می‌کنند. همچنین، مقایسه نتایج فیلوژنی حاصل از دو سیستم نشانگری *MatK 390* و *ITS 4* نشان داد که استفاده از هر سیستم نشانگری خاص، می‌تواند به تفکیک گونه‌ها با حالات مختلف (یعنی کلاسترهای مختلف) منجر شود. درضمن، نشانگرهای استفاده‌شده در این تحقیق قادر به جداکردن تمامی گونه‌ها بر مبنای منشأ جغرافیایی آنها نبودند، که این امر احتمالاً به خاطر وجود تفاوت ژنتیکی متنوع در بین گونه‌ها می‌باشد، به گونه‌ای که حتی دو گونه با منشأ جغرافیایی یکسان (برای مثال، لرستان) نیز ممکن است در کلادهای مجزا قرار بگیرند. برای توضیح این مشاهده، بایستی عنوان کرد

## REFERENCES

1. Al-Atiyat, R. & Aljumaah, R. (2014). Genetic distances and phylogenetic trees of different Awassi sheep populations based on DNA sequencing. *Genetics and Molecular Research*, 13(3), 6557-6568.
2. Amin, G., Sourmaghi, M. S., Azizzadeh, M., Yassa, N. & Asgari, T. (2008). Seasonal variation of the essential oil composition of cultivated yarrow in Tehran-Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 11(6), 628-633.
3. Arnot, D. E., Roper, C. & Bayoumi, R. A. (1993). Digital codes from hypervariable tandemly repeated DNA sequences in the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite gene can genetically barcode isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 61(1), 15-24.
4. Badr, A., El-Shazly, H. H., Ahmed, H. I. S., Hamouda, M., El-Khateeb, E. & Sakr, M. (2017). Genetic diversity of *Achillea fragrantissima* in Egypt inferred from phenotypic variations and ISSR markers associated with traits of plant size and seed yield. *Plant Genetic Resources*, 15(3), 239-247.
5. Dabrowska, J. (1977). Observations of the fruit size of nine taxons from the genus *Achillea* L. representing natural di-, tetra-, hexa- and octaploids. *Herba Pol*, 28(23), 55-66.
6. Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12(13), 39-40.
7. Francisco-Ortega, J., Barber, J. C., Santos-Guerra, A., Febles-Hernández, R. & Jansen, R. K. (2001). Origin and evolution of the endemic genera of Gonosperminae (Asteraceae: Anthemideae) from the Canary Islands: evidence from nucleotide sequences of the internal transcribed spacers of the nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany*, 88(1), 161-169.
8. Gharibi, S., Rahimmalek, M., Mirolohi, A., Majidi, M. M. & Tabatabaei, B. E. S. (2011). Assessment of genetic diversity in *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* and *Achillea millefolium* subsp. *elbursensis* using morphological and ISSR markers. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(11), 2413-2423.
9. Guo, Y.-P., Ehrendorfer, F. & Samuel, R. (2004). Phylogeny and systematics of *Achillea* (Asteraceae-Anthemideae) inferred from nrITS and plastid trnL-F DNA sequences. *Taxon*, 53(3), 657-672A.

10. Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L. & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.
11. Huang, X. & Madan, A. (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research*, 9(9), 868-877.
12. Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111-120.
13. LÖfgren, A. (2002). Effects of isolation on distribution, fecundity, and survival in the self-incompatible *Achillea millefolium* (L.). *Ecoscience*, 9(4), 503-508.
14. Mozaffarian, V. (1998). *Dictionary of Iranian Plant Names*. Farhang Moaser, Tehran. (in Farsi)
15. Nei, M. & Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*: Oxford university press.
16. Nemeth, E. (2005). Essential oil composition of species in the genus *Achillea*. *Journal of Essential Oil Research*, 17(5), 501-512.
17. Oberprieler, C. & Vogt, R. (2000). The position of *Castrilanthemum Vogt & Oberprieler* and the phylogeny of Mediterranean *Anthemideae* (Compositae) as inferred from nrDNA ITS and cpDNAtrnL/trnF IGS sequence variation. *Plant Systematics and Evolution*, 225(1-4), 145-170.
18. Rahimmalek, M., Tabatabaei, B. E. S., Arzani, A. & Etemadi, N. (2009). Assessment of genetic diversity among and within *Achillea* species using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Biochemical Systematics and Ecology*, 37(4), 354-361.
19. Rahimmalek, M., Tabatabaei, B. E. S., Arzani, A. & Khorrami, M. (2011). Development and characterization of microsatellite markers for genomic analysis of yarrow (*Achillea millefolium* L.). *Genes & Genomics*, 33(5), 475.
20. Taheri, E., Shirzadian-Khorramabad, R., Sharifi-Sirchi, G., Sabouri, A. & Abbaszadeh, K. (2016). Assessment of Genetic Diversity of Three Yarrow's Wild Masses in Hormozgan Province Using Morphological Traits. *Plant Genetic Researches*, 2(2), 73-82. (in Farsi).
21. Tamura, K. (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+ C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*, 9(4), 678-687.
22. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.
23. Watson, L. E., Evans, T. M. & Boluarte, T. (2000). Molecular phylogeny and biogeography of tribe Anthemideae (Asteraceae), based on chloroplast gene *ndhF*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 15(1), 59-69.