

جایگاه تبارزایی بخشه *Satureoides* از سرده سنبله‌ای (تیره نعنائیان؛ زیر تیره نعنا)

## محیا خاکپاش و یاسمن سلمکی

قطب تبارزایی موجودات زنده و گروه علوم گیاهی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: یاسمن سلمکی، ysalmaki@ut.ac.ir

چکیده. بخشه *Satureoides* با چهار گونه و ویژگی‌هایی نظیر شکل رویشی علفی یکساله، برگ‌ها واژسرنیزه‌ای در قاعده باریک‌شده، کاسه گل خمره‌ای شکل به هنگام میوه‌دهی، وجود کرک متراکم در دهانه کاسه گل از جمله بخشه‌های سرده سنبله‌ای (*Stachys*) به‌شمار می‌رود که در شرق و جنوب ترکیه، سوریه، شمال عراق و غرب ایران پراکنش دارد. هدف اصلی پژوهش حاضر تعیین جایگاه تبارزایی بخشه *Satureoides* بر اساس گونه *Stachys melampyroides* به‌عنوان تنها نماینده این بخشه در ایران است. پژوهش حاضر نخستین مطالعه مولکولی بر روی بخشه *Satureoides* است که بر اساس نشانگر هسته‌ای (nrITS) و با استفاده از روش‌های پیشینه صرفه‌جویی و استنباط بیزی انجام شده است. در این پژوهش در مجموع، ۸۶ توالی (۹ برون‌گروه، ۷۷ درون‌گروه) مورد تحلیل قرار گرفتند. نتایج حاصل از تحلیل‌های تبارزایی ما نشان داد که بخشه *Satureoides* در تبارشاخه *Olisia* که یکی از ناهمگن‌ترین و بزرگترین تبارشاخه‌های سرده پراتبار سنبله‌ای به‌شمار می‌رود، جای می‌گیرد. همچنین نه تنها جایگاه بخشه *Satureoides* که بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی بیشترین قرابت را با بخشه *Neurocalyx* نشان داده تائید نمی‌شود، بلکه به‌عنوان گروه خواهری اعضای بخشه *Fragilicaulis* که گونه‌هایی صخره‌زی چندساله با ساقه‌های شکننده و گل‌های زرد هستند، شناخته می‌شود. بر اساس نتایج درخت مولکولی هسته‌ای، بخشه *Neurocalyx* نزدیک‌ترین گروه به تبارشاخه *Satureoides+Fragilicaulis* است. شایان ذکر است که قرابت گونه‌های یکساله با گونه‌های چندساله سنبله‌ای در درخت تبارزایی هسته‌ای نشان داده شده است. بنابراین به نظر می‌رسد "شکل رویشی یکساله" به‌طور مستقل در بین دودمان‌های چندساله تکامل یافته است.

واژه‌های کلیدی. تبارزایی، تحلیل استنباط بیزی، شکل رویشی یکساله، طایفه سنبله‌ای آسیایان، نشانگر هسته‌ای

Phylogenetic placement of *Stachys* sect. *Satureoides* (Lamiaceae; Lamioideae)

## Mahya Khakpash &amp; Yasaman Salmaki

Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms and Department of Plant Science, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

Correspondent author: Yasaman Salmaki, ysalmaki@ut.ac.ir

**Abstract.** *Stachys* sect. *Satureoides* includes four species characterized by being annual herbs having oblanceolate leaves, urceolate calyx in fruit and dense hairs at mouth and are distributed from Eastern and Southern Turkey, Syria, Northern Iraq to Western Iran. The main aim of present study is to determine the phylogenetic placement of *S.* sect. *Satureoides* based on *Stachys melampyroides*, as the only representative of this section in Iran. The present molecular study was conducted based on nuclear ribosomal ITS marker, using Maximum Parsimony and Bayesian Inference analyses. In total, 86 accessions (including nine outgroups and 77 ingroups) were included. Our results demonstrated that sect. *Satureoides* was placed in *Olisia* clade which is one of the most heterogenous and taxonomically challenging clades of *Stachys* as a paraphyletic genus. Moreover, not only sect. *Satureoides* was not found to be phylogenetically close to sect. *Neurocalyx*, as had been suggested by previous morphological studies, but also it was placed as a sister group of sect. *Fragilicaulis* which was characterized by chasmophilus species with fragile stems and yellow flowers. Our results revealed that sect. *Neurocalyx* could be the closest group to the *Satureoides+Fragilicaulis* clade. In addition, based on the nrITS phylogenetic tree, annual species of *Stachys* showed affinity to perennial *Stachys* species. Hence, it seems that "Annual habit" have been evolved among their perennial ancestors, independently.

**Key words.** phylogeny, Bayesian inference analysis, annual habit, Stachydeae, nrITS

## مقدمه

نعنائیان هاوایی، *Prasium*، *Phlomidioschema* و *Sideritis* نمونه برداری شدند (Salmaki et al., 2013). با توجه به پرگونه بودن سرده‌هایی نظیر *Sideritis* و سنبله‌ای تلاش شد تا از تمامی گروه‌های متنوع ریخت‌شناسی آرایه‌هایی انتخاب شوند. بدین ترتیب ۱۷ بخشه از مجموع ۲۰ بخشه موجود در سرده سنبله‌ای مورد تحلیل قرار گرفت و سرده سنبله‌ای همچنان به‌عنوان سرده پراتبار در نظر گرفته شد. به‌منظور تک‌تبار نمودن سرده بزرگ و پراتبار سنبله‌ای نام تبارزاییی " *Eurystachys* " Y. Salmaki & M. Bendiksby Lindqvist & Albert, (sensu lato در مطالعات پیشین (Salmaki et al., 2002) بود، به این تبارشاخه نسبت داده شد (Salmaki et al., 2013). این تبارشاخه تمام سرده‌های موجود در طایفه به‌جز *Melittis* L. را در خود جای داده است. علاوه‌براین دو رویکرد رده‌بندی به‌منظور تک‌تباری سرده سنبله‌ای پیشنهاد شد: (۱) رویکرد ادغام (Lumping approach): کاهش تعداد ۱۰ سرده موجود در تبارشاخه *Eurystachys* به یک سرده سنبله‌ای وسیع، (۲) رویکرد تفکیک (Splitting approach): حفظ سرده‌های تک‌گونه‌ای موجود و شکسته شدن سرده‌های پرگونه به چند سرده جدید. همچنین به‌تازگی در مطالعه تبارزاییی تکمیلی با افزودن نشانگرهای هسته‌ای (SS-NTS، nrITS، ETS) تبارشاخه *Eurystachys* به ۱۲ زیرتبارشاخه با حمایت بالا تقسیم گردید (Salmaki et al., 2019).

علیرغم نمونه‌برداری‌های وسیع و استفاده از نشانگرهای متنوع هسته‌ای و کلروپلاستی، همچنان جایگاه تبارزاییی سه بخشه (*Roseostachys*، *Pseudosideritopsis* Krestovsk.) *Satureoides* Bhattacharjee از سرده سنبله‌ای مورد مطالعه قرار نگرفته است. با توجه به پراکنش بخشه *Satureoides* در ایران، در این پژوهش بر آن شدیم تا به تعیین جایگاه تبارزاییی این بخشه بپردازیم. نخستین بار بخشه *Satureoides* با چهار گونه *S. burgsdorffiioides* (Benth.) Boiss.، *S. ramosissima melampyroides* Hand.-Mazz.، *S. saturejoides* Montbret & Aucher ex Benth. معرفی شد (Bhattacharjee, 1980). گونه‌های *S. burgsdorffiioides* و *S. melampyroides* به‌ترتیب در شرق عراق، شمال شرقی ترکیه و ایران، عراق، ترکیه، سوریه و دو گونه *S. ramosissima* و *S. saturejoides* به‌ترتیب در شرق ترکیه و شمال سوریه، شرق ترکیه پراکنش دارند (Rechinger, 1982; Davis, 1982). تمامی اعضای این بخشه به‌واسطه صفات ریخت‌شناسی نظیر گیاهانی علفی و یکساله، برگ‌های ساقه‌ای اغلب واژسرنیزه‌ای در

سرده سنبله‌ای (*Stachys* L.) با حدود ۳۰۰ گونه از جمله بزرگ‌ترین و پیچیده‌ترین سرده‌های زیرتیره نعنائیان (Lamiaceae) از تیره نعنائیان (Lamiaceae) به‌شمار می‌رود (Salmaki et al., 2012). از جمله مهمترین مراکز تنوع این سرده میتوان به نواحی مدیترانه‌ای، ایران-تورانی و جنوب‌غربی و مرکزی آسیا اشاره داشت (Bhattacharjee, 1980; Hedge, 1986). در جامع‌ترین رده‌بندی ارائه شده (Bhattacharjee, 2003; Krestovskaja, 1980)، گونه‌های دنیای قدیم سرده سنبله‌ای بر اساس تنوع بالا در صفات ریخت‌شناسی همچون شکل رویشی (انواع علفی یکساله، چندساله، ایستاده، پشته‌ای با انشعابات متراکم یا بندرت درختچه‌ای کوتاه)، انواع کرک‌های غده‌ای، ساده، ستاره‌ای، انواع ریزوم‌دار، دارای ساقه‌های منشعب با راس خاردار یا نوک دندانه‌های کاسه‌گل خاردار، خشکی‌رست، صخره‌زی و رویش برخی از گونه‌ها در نواحی مرطوب در ۲۰ بخشه جای می‌گیرند که از این میان ایران با دارا بودن ۱۲ بخشه: *Aucheriana* Bhattacharjee، *Ambleia* Benth.، *Eriostomum* (Hoffmanns. & Link) Dum.، *Infrarosularis* Bhattacharjee، *Fragilicaulis* Bhattacharjee، *Satureoides* Bhattacharjee، *Olisia* Dum.، *Stachys* Bhattacharjee، *Setifolia* Bhattacharjee، *Trinerves* Krestovsk.، *Thamnostachys* Kapeller، *Zietenia* (Gled) Benth. و حدود ۴۰ گونه از جمله مراکز تنوع گونه‌ای مهم این سرده به‌شمار می‌رود (Rechinger, 1982; Krestovskaja, 2003; Jamzad, 2012; Salmaki et al., 2012). در نخستین مطالعه تبارزاییی صورت گرفته بر روی سرده سنبله‌ای، با استفاده از نشانگرهای هسته‌ای و پلاستییدی نشان داده شد که سنبله‌ای سرده‌ای تک‌تبار نبوده و سرده‌هایی از قبیل: نعنائیان هاوایی (*Haplostachys* (A. Gray) Hillebr.، *Stenogyne* Benth.، *Phyllostegia* Benth.، *Prasium* L.، *Phlomidioschema* (Benth.) Vved. و *Sideritis* L. در درون سرده بزرگ سنبله‌ای جای می‌گیرند (Albert & Lindqvist, 2002). سپس در مطالعات تبارزاییی صورت گرفته بر روی زیرتیره نعنائیان (Scheen et al., 2010; Bendiksby et al., 2011) و جامع‌ترین مطالعه تبارزاییی طایفه سنبله‌ای آسیایان (*Stachydeae* Dumort.) بر اساس نشانگرهای هسته‌ای (nrITS) و پلاستییدی (*trnL-trnF*، *trnL* intron) و تمامی سرده‌های طایفه نظیر *Melittis* L.، *Chamaesphacos* Schrenk ex Fisch. & C.A.Mey.، *Thuspeinanta* T.Durand، *Hypogomphia* Bunge

ردیف‌خوانی شد ( EMBL-EBI Search Launcher, UK; (Madison & Madison, 2010).

### تحلیل و بررسی‌های تبارزایی

دو روش بیشینه صرفه‌جویی (Maximum Parsimony) و استنباط بیزی (Bayesian Inference) جهت تحلیل‌های تبارزایی انتخاب شدند. به‌منظور اجرای تحلیل بیشینه صرفه‌جویی از نرم‌افزار PAUP\* نسخه 4.0 a 169 استفاده شد. تخمین استحکام شاخه‌ها به روش Bootstrap برای داده‌های توالی هسته‌ای (nrITS) با پیش‌فرض hsearch bootstraps=1000 nreps=1000 addseq=random nchuck=10 chuckscore=1 اجرا شد و تنها حمایت شاخه‌های بیش از ۵۰ درصد بر روی شاخه‌ها نشان داده شده‌اند (Felsenstein, 1985; Swofford, 2003).

بازسازی روابط تبارزایی داده‌های توالی هسته‌ای (nrITS) بر اساس روش استنباط بیزی با استفاده از نرم‌افزار Mr Bayes نسخه 3.1.2 انجام شد (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). از آنجایی که این تحلیل وابسته به انتخاب مدل تکاملی است، نخست نسبت به انتخاب مدل تکاملی اقدام نمودیم. این مدل جایگزینی DNA، احتمال تبدیل هر یک از نوکلئوتیدها را به سایر نوکلئوتیدها در توالی همساخت محاسبه می‌کند. مجموعه داده توالی‌های هسته‌ای با استفاده از برنامه jModeltest نسخه 2.1.6 که بهترین مدل جایگزینی را بر اساس معیار اطلاعاتی (AIC) انتخاب می‌کند، مورد تحلیل قرار گرفت (Posada, 2008). همچنین روش استنباط بیزی با به‌کارگیری ۴ زنجیره مارکوف مونت کارلو (MCMC) شامل ۳ زنجیره گرم و ۱ زنجیره سرد آغاز شد که برای ۱۰ میلیون نسل اجرا گردید و هر ۱۰۰۰ نسل، یک درخت حفظ شد و در نهایت احتمال پسین درخت تبارزایی نیز محاسبه گردید.

### نتایج

درخت حاصل از روابط تبارزایی داده‌های توالی هسته‌ای (nrITS) بر اساس هر دو روش بیشینه صرفه‌جویی و استنباط بیزی بازسازی شد. از آنجایی که درخت‌های هر دو تحلیل بیشترین تطابق را با یکدیگر داشتند، در اینجا تنها درخت استنباط بیزی ارائه شده است (شکل ۲). در نتایج حاصل از تحلیل بیشینه صرفه‌جویی طول توالی‌های ردیف‌خوانی شده nrITS برابر با ۶۹۳ جفت‌باز است. طول درخت‌های مقرون به‌صرفه برابر با ۹۵۰ گام بدست آمد که دارای ۳۹۸ صفت پایدار و ۲۴۵ صفت اطلاع‌رسان بوده است. همچنین در این تحلیل شاخص‌هایی همچون: شاخص سازگاری (CI) برابر ۰/۵۰۷ و بدون صفات اطلاع‌رسان برابر ۰/۴۷۴، شاخص جورگرایی (HI)

قاعده باریک‌شده، کاسه‌گل خمره‌ای شکل به هنگام میوه‌دهی و دهانه کاسه‌گل دارای کرک‌پوش متراکم، از سایر بخشه‌های سنبله‌ای متمایز می‌شوند (Bhattacharjee, 1980). شایان ذکر است، اغلب گونه‌های سرده سنبله‌ای چندساله هستند و این سرده تنها حدود ۲۵ گونه یکساله دارد که اعضای بخشه *Satureoides* همگی جزو گونه‌های یکساله به‌شمار می‌روند. با توجه به اینکه گونه *S. melampyroides* تنها نماینده بخشه *Satureoides* در ایران به‌شمار می‌رود و برای گیاهان ایران به‌عنوان یک عنصر ایران-تورانی رکورد شده است (Salmaki et al., 2012)، مطالعه حاضر به تعیین جایگاه تبارزایی بخشه *Satureoides* بر اساس گونه *S. melampyroides* اختصاص دارد. گونه *S. melampyroides* با ویژگی‌های بارزی همچون، علفی یکساله، ساقه‌های باریک، ساده یا گاهی منشعب، ایستاده، فقدان برگ‌های قاعده‌ای با آرایش طوقه‌ای، برگ‌ها واژسرنیزه‌ای، گل‌آذین فراهمه (Verticillaster) به‌صورت سنبله‌های متراکم، کاسه‌گل خمره‌ای شکل به هنگام میوه‌دهی، کرک‌پوش متراکم در دهانه کاسه‌گل، لب پایینی جام‌گل به‌طور نامعلوم سه‌لوبه، از سایر گونه‌های سنبله‌ای متمایز می‌شود (شکل ۱). پراکنش این گونه در جنوب شرقی ترکیه، شمال عراق، غرب ایران است. هدف اصلی پژوهش حاضر تعیین جایگاه تبارزایی بخشه *Satureoides* بر اساس نشانگر هسته‌ای (nrITS) است.

### مواد و روش‌ها

به‌منظور تعیین جایگاه تبارزایی بخشه *Satureoides* ابتدا تمامی توالی‌های منتشر شده از بانک ژن استخراج شدند. راهبرد انتخاب آرایه‌های برون‌گروه بر اساس مطالعات پیشین (Salmaki et al., 2013) انجام شد. گونه *S. melampyroides* به‌عنوان تنها نماینده از بخشه *Satureoides* در ایران به مجموعه داده‌های مولکولی اضافه شد. جدول ۱ نمایه‌ای است که به اطلاعات آرایه‌های مورد مطالعه در این پژوهش اختصاص دارد. در مجموع، ۸۶ توالی متشکل از ۹ برون‌گروه و ۷۷ درون‌گروه مورد بررسی قرار گرفتند.

**استخراج DNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، هم‌ردیف‌سازی**  
به‌منظور استخراج DNA برگ‌های سالم از نمونه *S. melampyroides* از گیاکده دانشگاه تهران (TUH) جدا شد (جدول ۱). تمام مراحل استخراج DNA و تقویت نشانگر هسته‌ای (nrITS) طبق روش و مراحل موجود در مطالعات پیشین (Salmaki et al., 2013) انجام گردید. هم‌ردیف‌سازی اولیه با استفاده از T-Coffee اجرا شد. سپس ماتریس اطلاعاتی با استفاده از نرم‌افزار Mesquite نسخه 2.74 به‌صورت چشمی



شکل ۱- نمونه گیاهه‌ای گونه *S. melampyroides* در گیاهکده مرکزی دانشگاه تهران. A. جام گل، B. گل، C. کاسه گل (Salmaki et al., 2012).  
**Figure 1.** The herbarium specimen of *S. melampyroides* in the Central Herbarium of Tehran University. A. corolla, B. flower, C. calyx (Salmaki et al., 2012).

**جدول ۱-** نمایه اسامی، ناحیه جغرافیایی، اطلاعات گیاکده‌ای، شماره بانک ژن تمام آرایه‌های مطالعه شده در پژوهش حاضر. توالی جدید با علامت ستاره مشخص شده است. داده‌های فاقد اطلاعات به صورت N/A نشان داده شده است.

**Table 1.** List of names, geographic source, voucher information and GenBank accession number of the studied taxa in present study. The new generated sequence is indicated with an asterisk. Missing data are indicated with N/A.

Species	Geographic source	Voucher information	GenBank accession number: nrITS
<b>Outgroup</b>			
<i>Ballota nigra</i> L.	Iran	Y. Salmaki et al. 39813 (TUH)	JN680358
<i>Betonica officinalis</i> L.	Cult.	C. Lindqvist and V.A. Albert 357 (UNA)	KF529533
<i>Betonica scardica</i> Griseb.	Greece	J. Ugelvig and L. S. Christiansen 1048 (C)	KF529534
<i>Galeopsis angustifolia</i> Ehrh. ex Hoffm.	Norway	E. Dahl s.n. 26.08.1979 (O)	KF529535
<i>Galeopsis bifida</i> Boenn.	N/A	N/A	EU827106
<i>Phlomis fruticosa</i> L.	Greece	E. Julin s.n. 1985 (UPS)	KF529539
<i>Phlomoides laevigata</i> (Bunge) Kamelin & Makhm. (= <i>Eremostachys laevigata</i> Bunge)	Kurdistan	J. Frödin 202 (UPS)	KF769022
<i>Phlomoides tuberosa</i> (L.) Moench	Kyrgyzstan	Fyatov and Kuzgechov 259 (LE)	JN680387
<i>Pseudodictamnus hirsutus</i> (Willd.) Salmaki & Siadati (= <i>Ballota hirsuta</i> Benth.)	Morocco	D. Podlech 53328 (M)	JN680359
<b>Ingroup</b>			
<i>Chamaesphacos ilicifolius</i> Schrenk ex Fisch. & C.A.Mey.	Iran	K. H. Rechinger 50961 (C)	KF529540
<i>Haplostachys haplostachya</i> (A.Gray) H.St.John	Hawaii	S. Perlman 14328 (NY)	KF529541
<i>Hypogomphia bucharica</i> Vved.	Uzbekistan	A. Vvedensky AV6427 (C)	KF529542
<i>Hypogomphia turkestanica</i> Bunge	C Asia	O. Paulsen 275 (C)	KF529543
<i>Melittis melissophyllum</i> L. (1)	Cult.	M. Bendiksby 09-010 (O)	KF529544
<i>Melittis melissophyllum</i> (2)	Hungary	M. E. Steiner et al. 1127 (UPS)	KF529545
<i>Phlomidioschema parviflorum</i> (Benth.) Vved.	Afghanistan	J. S. Andersen and I. C. Petersen 394 (C)	KF529546
<i>Phyllostegia velutina</i> (Sherff) H.St.John	Hawaii	V. A. Albert et al. HI03-061 (O)	KF529547
<i>Phyllostegia waimeae</i> Wawra	Hawaii	V. A. Albert et al. HI03-027 (O)	KF529548
<i>Prasium majus</i> L. (1)	Greece	A. Strid et al. 39091 (C)	KF529549
<i>Prasium majus</i> (2)	Spain	M. Thulin 5752 (UPS)	KF529550
<i>Sideritis antiatlantica</i> (Maire) Rejdali	Morocco	ASG s.n. (ORT)	AF335625
<i>Sideritis glauca</i> Cav.	Spain (Alicante)	J. Barber 248 (TEX)	AF335630
<i>Sideritis gomeraea</i> de Noé ex Bolle	Spain (CI-La Gomera)	J. Barber 256 (TEX)	AF335608
<i>Sideritis montana</i> L. (1)	Balkan Peninsula	J. Barber 212 (TEX)	AF335612
<i>Sideritis montana</i> (2)	Cult.	M. Bendiksby MB09-002 (O)	KF529551
<i>Sideritis nutans</i> Svent.	C I-La Gomera	J. Barber 201 (TEX)	DQ900767
<i>Sideritis perfoliata</i> L.	Cult.	J. Barber 294 (TEX)	AF335618
<i>Sideritis romana</i> L. (1)	Italy	J. Barber 209 (TEX)	AF335614
<i>Sideritis romana</i> (2)	Greece (Skiros)	S. Snogerup and B. Snogerup 16918 (UPS)	KF529552
<i>Sideritis scardica</i> Griseb.	Cult.	J. Barber 211 (TEX)	AF335619
<i>Sideritis syriaca</i> L.	Greece	M. Bendiksby and A.-C. Scheen 04-008 (O)	KF529553
<i>Sideritis tragoriganum</i> Lag.	Spain (Lagasca)	J. Barber 241 (TEX)	AF335639
<i>Stachys acerosa</i> Boiss. (1)	Persia	K. H. Rechinger 47425 (C)	KF529554
<i>Stachys acerosa</i> (2)	Iran	Y. Salmaki and S. Zarre 38881 (TUH)	KF529555
<i>Stachys aegyptiaca</i> Pers. (1)	Egypt	N/A 50085 (MSB)	KF529557
<i>Stachys aegyptiaca</i> (2)	Palestine	M. Zohary & J. D'Angelis 570 (UPS)	KF529558
<i>Stachys aethiopica</i> L.	Mozambique	B. Petterson 2146 (UPS)	KF529559
<i>Stachys annua</i> (L.) L.	Turkey	M. Nydegger 42679 (MSB)	KF529563
<i>Stachys annua</i> subsp. <i>annua</i> (= <i>Stachys pubescens</i> Ten.)	Azerbaijan	K. H. Rechinger 41292 (C)	KF529629
<i>Stachys arenaria</i> Vahl	Morocco	D. Podlech 48272 (MSB)	KF529566
<i>Stachys arvensis</i> (L.) L.	Germany	W. L. Dietrich 6143 (M)	KF529567
<i>Stachys atherocalyx</i> K. Koch	Iran	Y. Salmaki et al. 39801 (TUH)	KF529569
<i>Stachys benthamiana</i> Boiss.	Iran	Y. Salmaki and S. Zarre 35897 (TUH)	KF529572

جدول ۱- ادامه.

Table 1. Continued.

Species	Geographic source	Voucher information	GenBank accession number: nrITS
<i>Stachys bombycina</i> Boiss.	Turkey	R. Ulrich 1997 (M)	KF529573
<i>Stachys byzantina</i> K. Koch	Iran	Y. Salmaki et al. 3652 (TUH)	KF529578
<i>Stachys corsica</i> Pers.	Corsica	B. Jonsell 1428 (UPS)	KF529582
<i>Stachys circinata</i> L'Hér	Spain	M. Thulin 5733 (UPS)	KF529581
<i>Stachys distans</i> Benth.	Lebanon	H. Roessler 5211 (M)	KF529585
<i>Stachys ehrenbergii</i> Boiss.	Lebanon	C. Bräuchler s.n. (M)	KF529588
<i>Stachys fruticulosa</i> M. Bieb. (1)	Azerbaijan	T. Heideman s.n. 22.04.1936 (O)	KF529592
<i>Stachys fruticulosa</i> (2) (= <i>S. araxina</i> Kopell.)	Turkey	M. Nydegger 46587 (MSB)	KF529565
<i>Stachys glutinosa</i> L.	Corsica	H. Merxmüller and W. Lippert 31239 (M)	KF529594
<i>Stachys hildebrandtii</i> Vatke	Ethiopia	O. Ryding et al. 2215 (UPS)	KF529599
<i>Stachys inflata</i> Benth.	Iran	Y. Salmaki 35910 (TUH)	KF529601
<i>Stachys inflata</i> subsp. <i>caucasica</i> (Stschegl.) Takht. (= <i>Stachys schtschegleevii</i> Sosn. ex Grossh.)	Iran	Y. Salmaki et al. 39838 (TUH)	KF529637
<i>Stachys kermanshahensis</i> Rech.f.	Iran	Y. Salmaki and S. Zarre 36522 (TUH)	KF529603
<i>Stachys kurdica</i> Boiss. & Hohen.	Iran	Y. Salmaki and S. Zarre 36513 (TUH)	KF529605
<i>Stachys kurdica</i> subsp. <i>kurdica</i> (= <i>S. ballotiformis</i> Vatke)	Iran	Y. Salmaki and S. Zarre 35877 (TUH)	KF529604
<i>Stachys lamarckii</i> Benth.	South Africa	P. H. Clcoks 18973 (M)	KF529606
<i>Stachys lavandulifolia</i> Vahl (1)	Iran	Y. Salmaki 36521 (TUH)	KF529609
<i>Stachys lavandulifolia</i> (2)	Iran	J. S. Andersen and A.G. Jensen 7032 (C)	KF529610
<i>Stachys maritima</i> Gouan	Romania	I. Gergely 3362 (US)	KF529612
<i>Stachys megalodonta</i> Hausskn. & Bornm.	Iran	Y. Salmaki and S. Zarre 25190 (TUH)	KF529613
<b><i>Stachys melampyroides</i> Hand.-Mazz.*</b>	<b>Iran</b>	<b>Veiskarami 23907 (TUH)</b>	<b>OR536575</b>
<i>Stachys menthoides</i> Kotschy and Boiss.	Turkey	Duncan and Tait 191 (M)	KF529615
<i>Stachys mucronata</i> Sieber ex Spreng.	Greece	R. Ulrich 1990 (M)	KF529618
<i>Stachys natalensis</i> Hochst.	Swaziland	O. Ryding 2332 (UPS)	KF529619
<i>Stachys neurocalycina</i> Boiss.	Palestine	A. Damin and U. Plitmann 13511 (MSB)	KF529621
<i>Stachys nephrophylla</i> Rech.f.	Iraq	K. H. Rechinger 11250 (WU) (Typus)	KF529620
<i>Stachys nigricans</i> Benth.	Swaziland	O. Ryding 2347 (UPS)	KF529622
<i>Stachys ocymastrum</i> (L.) Briq.	Spain	P. Garin 17388 (MSB)	KF529623
<i>Stachys rupestris</i> Montbret & Aucher ex Benth	Turkey	M. Nydegger 42299 (MSB)	KF529633
<i>Stachys setifera</i> subsp. <i>setifera</i> (= <i>Stachys setifera</i> subsp. <i>iranica</i> (Rech.f.) Rech.f.)	Iran	Y. Salmaki and S. Zarre 36502 (TUH)	KF529636
<i>Stachys spruneri</i> Boiss.	Greece, Attikis	A. Strid. et al. 26691 (C)	KF529640
<i>Stachys subaphylla</i> Rech.f.	Iran	Y. Salmaki et al. 36868 (TUH)	KF529641
<i>Stachys sylvatica</i> L.	Border Italy/France	M. Bendiksby and A. Tribsch 06-011 (O)	KF529643
<i>Stachys tetragona</i> Boiss. & Heldr.	Greece	D. Phitos 3990 (M)	KF529646
<i>Stachys trinervis</i> Aitch. and Hemsl.	Iran	Y. Salmaki and S. Zarre 36765 (TUH)	KF529647
<i>Stachys turcomanica</i> Trautv. (1)	Iran	Y. Salmaki et al. 38080 (TUH)	KF529649
<i>Stachys turcomanica</i> (2)	Iran	Y. Salmaki et al. 38080 (TUH)	KF529650
<i>Stachys yemenensis</i> Hedge	Yemen	M. Thulin et al. 8165 (UPS)	KF529651
<i>Stenogyne bifida</i> Hillebr.	Hawaii	V. Albert et al. HI03-32 (O)	KF529652
<i>Suzukia luchuensis</i> Kudô	Japan	S. Tawada and S. Hatusima 18179 (US)	KF529654
<i>Suzukia shikikunensis</i> Kudô	Taiwan	C-C. Liao et al. 564 (A)	KF529655
<i>Thuspeinanta brahuica</i> (Boiss.) Briq.	Iran	K. H. and F. Rechinger 4701 (US)	KF529656
<i>Thuspeinanta persica</i> (Boiss.) Briq.	Iraq	K. H. Rechinger 9604 (S)	KF529657

(Bhattacharjee, 1980). این بخش در فلورا ایرانیکا دارای دو گونه *S. melampyroides* و *S. burgsdorffioide* است که به ترتیب در شرق عراق، شمال شرقی ترکیه و عراق، ترکیه، سوریه پراکنش دارند (Rechinger, 1982). اما هیچکدام از این گونه‌ها در گیاهان نعنائیان ایران لحاظ نشدند (Jamzad, 2012). تا اینکه در سال 2012، Salmaki و همکاران، گونه *S. melampyroides* را بر اساس نمونه جمع آوری شده از استان لرستان توسط "ویس کرمی (TUH-23907)" برای گیاهان ایران گزارش کردند (Salmaki et al., 2012). بدین ترتیب با اضافه شدن با رکورد شدن این گونه و افزوده شدن بخشه *Satureoides* به جمع بخشه‌های ایرانی سرده سنبله‌ای، تعداد بخشه‌های این سرده در ایران به ۱۲ بخشه افزایش یافت.

بر اساس جامع‌ترین رده‌بندی‌های ارائه شده برای سرده سنبله‌ای (Bhattacharjee, 1980)، نزدیک‌ترین بخشه به بخشه *Satureoides* که اعضای آن اغلب در نواحی ترکیه، شمال عراق، سوریه (بین‌النهرین) پراکنش دارند، بخشه تک‌گونه‌ای *Neurocalyx* است که تنها به واسطه گونه یکساله *S. neurocalycina* شناخته می‌شود (Bhattacharjee, 1980). ویژگی‌هایی نظیر بدون کرک بودن گیاه، نداشتن برگک، لب‌های جام‌گل بیرون‌زده از کاسه‌گل از جمله صفات متمایز کننده بخشه تک‌گونه‌ای *Neurocalyx* به شمار می‌رود. به‌تازگی و بر اساس مرور آرایه‌شناسی بخشه *Satureoides*، علاوه بر تائید شباهت‌های ریخت‌شناسی این دو بخشه به نزدیکی محدوده پراکنش گونه‌ها نیز اشاره شده است (Krestovskaya, 2018). بخشه *Neurocalyx* علاوه بر سوریه در لبنان و فلسطین نیز یافت می‌شود (شکل ۳).

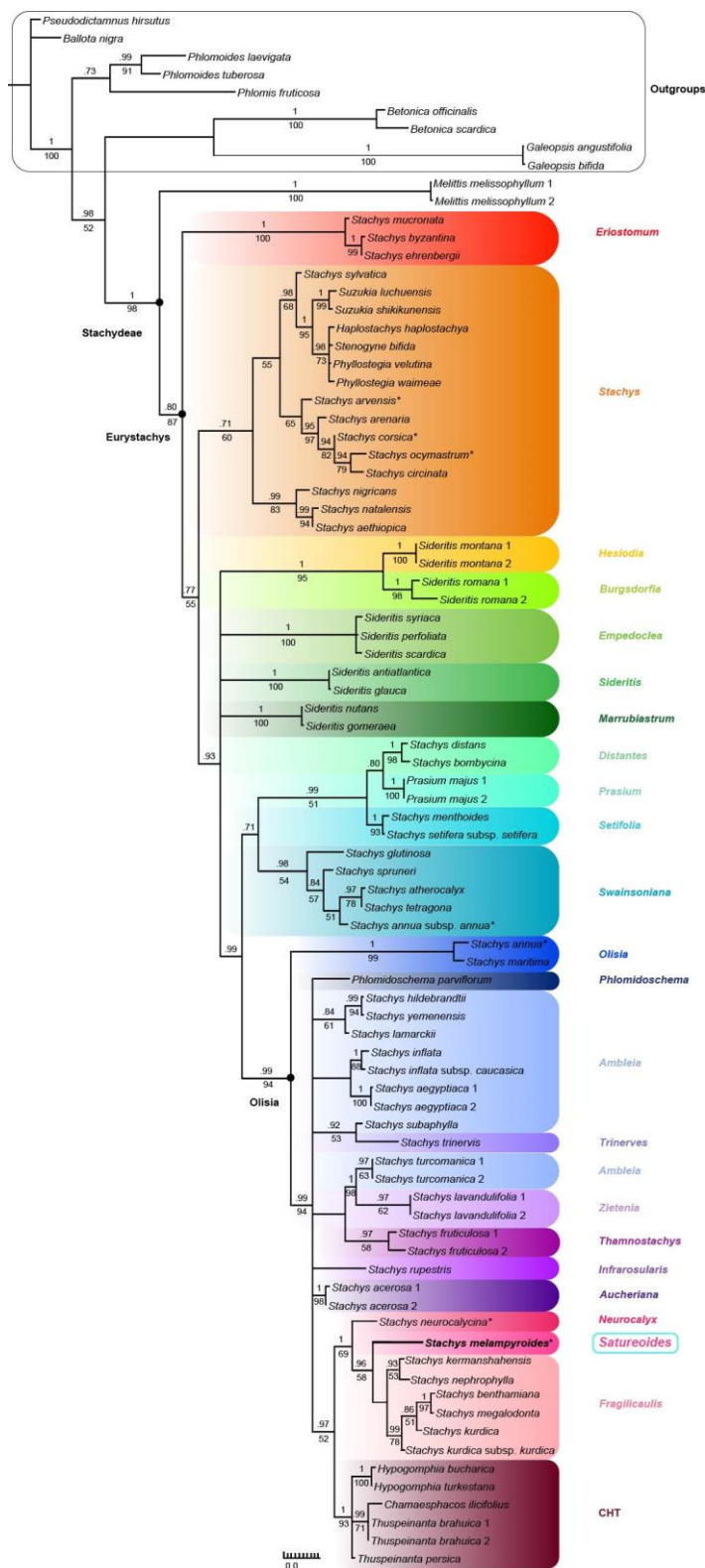
بر اساس نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل استنباط بی‌زی، بخشه *Satureoides* به‌عنوان یکی از گروه‌های مرکزی در تبارشاخه بزرگ و ناهمگن *Olisia* جای می‌گیرد. نتایج حاصل از مطالعات تبارزایی ما، جایگاه بخشه *Neurocalyx* را به‌عنوان نزدیک‌ترین گروه به بخشه *Satureoides* که در رده‌بندی‌های سنتی پیشین به آن اشاره شده بود را تائید نمی‌کند (شکل ۲). بر اساس درخت حاصل از تحلیل نشانگر هسته‌ای nrITS اعضای بخشه *Fragilicaulis* گروه خواهری بخشه *Satureoides* محسوب می‌شود و بیشترین قرابت را با گونه *S. melampyroides* نشان می‌دهند. جالب توجه است که تمامی اعضای بخشه *Fragilicaulis* به واسطه شکل رویشی چندساله، صخره‌زی، ساقه‌های شکننده و گل‌های زرد با رگه‌های قرمز به خوبی از سایر گونه‌های سرده سنبله‌ای متمایز می‌شوند (Rechinger, 1982; Salmaki et al., 2012).

برابر ۰/۴۹۲ و بدون صفات اطلاع‌رسان برابر ۰/۵۲۵، شاخص بقا یا گروه‌پذیری (RI) برابر ۰/۷۸۱ و شاخص سازگاری تصحیح‌شده (RC) برابر ۰/۳۹۶ محاسبه گردید. لازم به ذکر است که با استفاده از برنامه jModeltest نسخه 2.1.6 مدل تکاملی GTR+I+ $\Gamma$  را برای استنباط بی‌زی نشانگر هسته‌ای (nrITS) انتخاب شد. ضرایب حمایت شاخه‌ها با ارزش  $BS > 50\%$  حاصل از تحلیل بیشینه صرفه‌جویی به همراه مقادیر احتمال پسین حاصل از تحلیل استنباط بی‌زی به ترتیب در پایین و بالای شاخه‌ها قید گردیده است (شکل ۲). در این پژوهش، تمام ۱۲ زیرتبارشاخه *Eurystachys* از جمله تبارشاخه *Olisia* با حمایت بالا ( $PP=0.99$ ;  $BS=94\%$ )، در تائید مطالعات پیشین (Salmaki et al., 2019) بازسازی شدند. بخشه *Satureoides* در یکی از زیرتبارشاخه‌های متعلق به *Olisia* با حمایت بالا ( $PP=1.00$ ;  $BS=69\%$ ) در کنار ۹ بخشه دیگر سرده سنبله‌ای شامل: *Fragilicaulis*, *Aucheriana*, *Ambleia*, *Olisia Neurocalyx*, *Bhattacharjee Infrarosularis*, *Zietenia*, *Trinerves*, *Thamnostachys* قرار می‌گیرد. بر اساس درخت هسته‌ای گونه یکساله *S. melampyroides* به عنوان گروه خواهری بخشه *Fragilicaulis* جای گرفت. لازم به ذکر است که گونه *S. melampyroides* در یک تبارشاخه درونی‌تر نسبت به گونه یکساله *S. neurocalycina* Boiss. قرار می‌گیرد.

## بحث

اگرچه در طی سال‌های اخیر مطالعات تبارزایی مولکولی جامعی با نمونه‌برداری وسیع از اغلب گروه‌های متنوع ریخت‌شناسی سرده‌های طایفه سنبله‌ای آسیایان صورت گرفته است، اما همچنان موقعیت سه بخشه از سرده سنبله‌ای در هیچ‌یک از این تحلیل‌های تبارزایی مشخص نشده است. در این پژوهش، برای نخستین بار موقعیت تبارزایی بخشه *Satureoides* مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته است و جایگاه تبارزایی گونه *S. melampyroides* به‌عنوان تنها نماینده این بخشه در ایران، بر اساس نشانگر هسته‌ای (nrITS) بررسی شده است.

نخستین بار بخشه *Satureoides* (با چهار گونه *S. S. ramosissima*, *S. melampyroides burgsdorffioides*, *S. saturejoides*) بر اساس ویژگی‌هایی نظیر گیاهان علفی یکساله، ساقه‌های در قاعده منشعب، برگ‌ها واژسرنیزه‌ای در قاعده باریک‌شده، کرک‌پوش متراکم یا پراکنده، وجود کرک غده‌ای، گل‌آذین فراهمه دارای ۴ تا ۶ گل، بدون برگک، کاسه‌گل منظم و لوله‌ای، دندانه‌های کم و بیش مساوی با راس نوک‌ریشکی، با حلقه کرکی متراکم در دهانه کاسه‌گل، لوله جام‌گل بیرون‌زده و فندقچه‌های بیضی شکل توصیف شد



شکل ۲- درخت اجماع حاصل از استنباط بی‌زی بر اساس نشانگر هسته‌ای (nrITS). جایگاه تبارزایشی ۱۲ زیرتبارشاخه *Eurystachys* و تمام گروه‌های زیرتبارشاخه *Olisia* بازسازی شده است که با رنگ‌های مختلف متمایز شده‌اند. بخشه *Satureoides* در کادر آبی نشان داده شده است. تمام گونه‌های یکساله مورد مطالعه در پژوهش حاضر با علامت ستاره نمایان شده‌اند. حمایت شاخه‌های حاصل از احتمال پسین تحلیل بی‌زی (0.9) و بوت‌استرپ (50٪) در تحلیل بیشینه صرفه‌جویی به ترتیب در بالا و پایین تبارشاخه‌ها قید شده‌اند.

**Figure 2.** The consensus tree inferred from Bayesian analysis based on nrITS. The phylogenetic placement of 12 subclades of *Eurystachys* and all *Olisia*'s subclade were reconstructed and distinguished with different colors. *Stachys* sect. *Satureoides* is demonstrated in the blue box. All studied annual species in the present study are marked with an asterisk. Posterior probability values  $\geq 0.9$  and bootstrap values  $\geq 50\%$  are reported above and below branches, respectively.



شکل ۳- پراکنش گونه‌های *S. melampyroides* (■) و *S. neurocalycina* (●).

**Figure 3.** Distribution of *S. melampyroides* (■) and *S. neurocalycina* (●).

*Satureoides* شناخته نشد اما در کنار گروه قاعده‌ای تبارشاخه *Satureoides+Fragilicaulis* به‌عنوان خویشاندان نزدیک این بخشه محسوب می‌شود. نتایج حاصل از یافته‌های تبارزایی پژوهش حاضر گرچه به‌نوعی نزدیکی بخشه *Neurocalyx* به گروه مورد مطالعه را به تصویر می‌کشد اما به وجود تفاوت‌هایی بین این دو نیز دلالت دارد. در تأیید این مسئله میتوان به تفاوت‌هایی نظیر وجود کرک‌پوش ساده، غده‌ای پایه‌دار و دندانه کاسه سرنیزه‌ای-درفشی در بخشه *Satureoides* متمایز کننده آن از بخشه *Neurocalyx* که فاقد کرک با دندانه‌های کاسه مستطیلی-سرنیزه‌ای است، اشاره داشت (Bhattacharjee, 1980).

### نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر برای نخستین بار جایگاه تبارزایی بخشه *Satureoides* از سرده سنبله‌ای بر اساس نشانگر هسته‌ای (nrITS) در تبارشاخه *Olisia* مشخص گردید. تمام اعضای این بخشه را گونه‌های یکساله تشکیل می‌دهند که بر اساس مطالعات ریخت‌شناسی قرابت زیادی را با بخشه تک‌گونه‌ای و یکساله *Neurocalyx* نشان می‌دهد. در حالیکه بر اساس یافته‌های حاصل از درخت تبارزایی هسته‌ای پژوهش حاضر، نزدیک‌ترین گروه به *Satureoides* بخشه *Fragilicaulis* با گونه‌های چندساله و صخره‌زی، ساقه‌های شکننده و گل‌های زرد است و بخشه *Neurocalyx* در جایگاه بیرونی‌تری نسبت به این دو تبارشاخه قرار می‌گیرد. همانطور که در مطالعات تبارزایی بر روی سرده‌های مختلف نشان داده است که گونه‌های یکساله در کنار

این درحالیست که پیش‌تر در سایر مطالعات تبارزایی بر روی تیره‌های مختلف گیاهی (*Astragalus* L. (Fabaceae) *Nemesia* Vent. *Euphorbia* L. (Euphorbiaceae) (Scrophulariaceae)) نیز قرابت گونه‌های یکساله با گونه‌های چندساله در درخت‌های تکاملی به تصویر کشیده شده است (Daston et al., 2008; Frajman & Schönswetter, 2011; Azani et al., 2017). در نتیجه به نظر می‌رسد که "شکل رویشی یکساله" به‌صورت چندین بار و موازی (Parallel descent) در درخت‌های تبارزایی رخ می‌دهد و گونه‌های یکساله در زمان‌های مختلف به‌طور مستقل در بین اجداد چندساله تکامل یافته‌اند. به‌طور مثال در درخت هسته‌ای پژوهش حاضر گونه‌های یکساله سنبله‌ای در سه تبارشاخه متفاوت از دودمان‌های مستقل حضور دارند که عبارتند از: گونه *S. ocymastrum* (L.) *S. corsica* Pers *arvensis* (L.) L. Briq. در تبارشاخه *Stachys*، گونه *S. annua* subsp. *annua* (= *S. pubescens* Ten.) و *Swainsoniana* در تبارشاخه *Olisia* و گونه‌های *S. annua* (L.) L. و *S. melampyroides* که در درخت هسته‌ای *Olisia* در تبارشاخه *Olisia*، که در درخت هسته‌ای با نمایه ستاره مشخص شده‌اند (شکل ۲). از جمله نکات جالب توجهی که میتوان به آن اشاره داشت این است که اغلب گونه‌های یکساله سرده سنبله‌ای در نواحی مدیترانه‌ای پراکنش دارند، که البته بررسی مطالعات جغرافیای زیستی و منشا آن‌ها نیازمند تحلیل‌های بیشتری در مطالعات آتی است.

اگرچه بخشه *Neurocalyx* در درخت تبارزایی حاصل از نشانگر هسته‌ای nrITS به‌عنوان نزدیک‌ترین بخشه به

*Astragalus* (Fabaceae) and its systematic implications. Botanical Journal of the Linnean Society 184: 347-365.

**Bendiksby, M. Thorbek, L., Scheen, A.-C., Lindqvist, C. and Ryding, O.** 2011. An updated phylogeny and classification of Lamiaceae subfamily Lamioideae. Taxon 60: 471-484.

**Bhattacharjee, R.** 1980. Taxonomic studies in *Stachys*. II. A new infrageneric classification of *Stachys* L. Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh 38: 65-96.

**Datson, P.M., Murray, B.G., Steiner, K.E.** 2008. Climate and the evolution of annual/perennial life-histories in *Nemesia* (Scrophulariaceae). Plant Systematics and Evolution 270: 39-57.

**Davis, P.H.** 1982. The Flora of Turkey and the East Aegean islands, University Department of Botany Edinburgh 7: 254-257.

**Felsenstein, J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.

**Frajman, B. & Schönswetter, P.** 2011. Giants and dwarfs: molecular phylogenies reveal multiple origins of annual spurges within *Euphorbia* subg. *Esula*. Molecular Phylogenetics and Evolution 61: 413-424.

**Hedge, I.C.** 1986. Labiatae of south-west Asia: diversity, distribution and endemism. Proceedings of the Royal Society of Edinburgh 89: 23-35.

**Jamzad, Z.** 2012. Flora of Iran, 76: Lamiaceae, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education & Extension Organization, Tehran pp.: 152-251.

**Krestovskaya, T.V.** 2003. A new section of the genus *Stachys* (Lamiaceae). Novosti Sistematiki Vysshikh Rastenii 35: 147-148.

**Krestovskaya, T.V.** 2018. Review of species of the *Stachys* section *Satureoides* (Lamiaceae). Novitates Systematicae Plantarum Vascularium 49: 125-129.

**Lindqvist, C. & Albert, V.A.** 2002. Origin of the Hawaiian endemic mints within North American *Stachys* (Lamiaceae). American Journal of Botany 89: 1709-1724.

**Maddison, D.R. & Maddison, W.P.** 2010. MacClade4: Analysis of phylogeny and character evolution. Version 4.03. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

**Notredame, C., Higgins, D.G. & Heringa, J.** 2000. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. Journal of Molecular Biology 302: 205-217.

**Posada, D.** 2008. JModelTest: phylogenetic model averaging. Molecular Biology and Evolution 25: 1253-1256.

**Rechinger, K.H.** 1982. *Stachys*. In: Rechinger, K.H., (Ed.), Flora Iranica 150. Graz, Akademische Druck-u. Verlagsanstalt pp.: 354-396.

گونه‌های چندساله قرار گرفته‌اند، در پژوهش حاضر نیز به وضوح قرارگیری گونه‌های یکساله در کنار گونه‌های چندساله در درخت تبارزایی مشاهده شد که به نظر می‌رسد "شکل رویشی یکساله" به صورت مستقل و در زمان‌های مختلف در بین اجداد چندساله خود تکامل یافته‌اند. پیشنهاد می‌شود با توجه به اینکه برخی بخشه‌های سرده سنبله‌ای تک‌تبار نیستند، در صورت امکان جایگاه سایر گونه‌های بخشه *Satureoides* نیز در مطالعات تبارزایی آتی مورد بررسی قرار گیرد.

### سپاسگزاری

بر خود لازم میدانیم از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (طرح پژوهشی INSF 4001651 دکتر یاسمن سلمکی) و بنیاد ملی علوم طبیعی چین (طرح‌های پژوهشی NFSC 31872648, 32161143015 دکتر چونلای زیانگ) بابت حمایت از پژوهش حاضر تشکر نماییم. همچنین از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران، موسسه مبادلات آکادمیک آلمان (DAAD) و همچنین بنیاد علمی الکساندر هومبولد بابت حمایت از پژوهش حاضر سپاسگزاریم. شایان ذکر است که از پروفیسور گونتر هوپیل و تانیا ارنست در موسسه گیاهشناسی مونیخ آلمان بابت همکاری در آزمایشگاه مولکولی گیاهی سپاسگزاری می‌گردد.

### REFERENCES

**Azani, N., Bruneau, A., Wojciechowski, M.F. & Zarre, S.** 2017. Molecular phylogenetics of annual

- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P.** 2003. Mr Bayes 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Salmaki, Y., Zarre, S., Govaerts, R. & Bräuchler, C.** 2012. A taxonomic revision of the genus *Stachys* (Lamiaceae: Lamioideae) in Iran. *Botanical Journal of the Linnean Society* 170: 573-617.
- Salmaki, Y., Zarre, S., Ryding, O., Lindqvist, C., Bräuchler, C., Heubl, G., Barber, J. & Bendiksby, M.** 2013. Molecular phylogeny of tribe Stachydeae (Lamiaceae subfamily Lamioideae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69: 535-551.
- Salmaki, Y., Heubl, G. & Weigend, M.** 2019. Towards a new classification of tribe Stachydeae (Lamiaceae): naming clades using molecular evidence. *Botanical Journal of the Linnean Society* 190: 345-358.
- Scheen, A.-C Bendiksby, M., Ryding, O., Mathiesen, C., Albert, V.A. and Lindqvist, C.** 2010. Molecular phylogenetics, character evolution and suprageneric classification of Lamioideae (Lamiaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 97: 191-219.
- Swofford, D.L.** 2003. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods). Version 4.0b10, Sinauer, Sunderland, Massachusetts.

\*\*\*\*\*

**How to cite this article:**

**Khakpash, M. & Salmaki, Y.** 2023. Phylogenetic placement of *Stachys* sect. *Satureoides* (Lamiaceae; Lamioideae). *Nova Biologica Reperta* 10: 158-168. (In Persian).

خاکپاش، م. و سلمکی، ی. ۱۴۰۲. جایگاه تبارزایشی بخشه *Satureoides* از سرده سنبله‌ای (تیره نعنائیان؛ زیرتیره نعنا). یافته‌های نوین در علوم زیستی ۱۰:

۱۶۸-۱۵۸.