

بررسی تنوع گونه‌های حلزون‌های خشکی‌زی (Mollusca: Gastropoda) اثر ملی طبیعی جنگل خشکه‌داران در استان مازندران با استفاده از تکنیک DNA بارکدینگ

سیما محمدی و فراهم احمدزاده*

ایران، تهران، دانشگاه شهید بهشتی، پژوهشکده علوم محیطی، گروه تنوع زیستی و مدیریت اکوسیستم‌ها

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۱۳

چکیده

حلزون‌های خشکی‌زی که به‌عنوان یکی از متنوع‌ترین جانوران کره زمین شناخته شده‌اند به دلیل ویژگی‌های اکولوژیکی خود نقشی کلیدی در حفظ پایداری اکوسیستم‌ها ایفا می‌کنند. این گونه‌ها در زیستگاه‌های مختلفی از جمله جنگل‌ها یافت می‌شوند. یکی از مهم‌ترین زیستگاه‌های این گروه از نرم‌تنان جنگل‌های هیرکانی واقع در شمال ایران می‌باشد. این پژوهش به شناسایی حلزون‌های خشکی‌زی ساکن در جنگل خشکه‌داران که از مهم‌ترین زیستگاه‌های ناحیه هیرکانی محسوب می‌شود با بکارگیری دو رویکرد ریخت‌شناختی و بارکدینگ DNA پرداخت. در ابتدا ۱۳۵ نمونه جمع‌آوری شده بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی صدف حلزون‌ها شامل اندازه صدف، رنگ صدف، دیسکی یا مخروطی بودن صدف، داشتن درپوش دریاچه، شکل دریاچه صدف و وجود یا عدم وجود ناف در صدف در سطح خانواده شناسایی شدند. سپس از هر خانواده ۲ تا ۳ فرد جهت انجام مطالعات ژنتیکی انتخاب شدند. توالی‌های مورد نظر جهت انجام آنالیزهای ژنتیکی شامل محاسبه مدل تکاملی، محاسبه فاصله ژنتیکی و در نهایت رسم درخت تبار شناختی پس از انجام مراحل آزمایشگاهی مربوط به تکثیر ژن COI بدست آمدند. نتایج بدست آمده مشخص نمود نمونه‌های جمع‌آوری شده متعلق به چهار خانواده، پنج جنس و شش گونه می‌باشند. همچنین بدلیل عدم وجود توالی مشابه با نمونه مربوط به گونه *Caspicyclotus sieversi* شناسایی این حلزون با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناسی مربوط به صدف و بر اساس کلیدهای شناسایی موجود صورت پذیرفت. با این وجود تنوع زیستی منطقه، بالا ارزیابی نشده و غالبیت افراد جامعه متعلق به دو جنس *Schileykula* و *Pyrenaearia* بوده‌اند. همچنین این دو جنس به‌مراه جنس *Theba* برای اولین بار در این پژوهش برای این منطقه گزارش شده‌اند. این مطالعه به‌عنوان اولین مطالعه بارکدینگ بر روی حلزون‌های جنگل‌های هیرکانی منجر به دست‌یابی به اطلاعات جدیدی در مورد تنوع زیستی این ناحیه شده است. با گسترده‌تر کردن نواحی مورد بررسی به‌مراه بررسی آماری جوامع حلزون می‌توان به اطلاعات جامعی در ارتباط با تنوع زیستی حلزون‌های جنگل‌های هیرکانی دست یافت و گونه‌های بومی این منطقه را پیش از حذف از طبیعت شناسایی نمود. اطلاعاتی از این دست در زمینه مدیریت زیستگاه و حفظ این اکوسیستم منحصربه‌فرد حائز اهمیت است.

واژه‌های کلیدی: حلزون‌های خشکی‌زی، بارکدینگ DNA، جنگل‌های هیرکانی، تنوع زیستی، ریخت‌شناسی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۲۹۹۰۶۰۰۱، پست الکترونیکی: F_ahmadzade@sbu.ac.ir

مقدمه

می‌شوند و پراکنش آن‌ها وابسته به عوامل مختلفی می‌باشد که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به رطوبت و دما اشاره نمود. علاوه بر این، ترکیب خاک زیستگاه به‌ویژه در دسترس بودن کلسیم نیز از عوامل محدود کننده پراکنش آن‌ها

حلزون‌های خشکی‌زی، متعلق به رده شکم‌پایان بخش مهمی از تنوع زیستی اکوسیستم‌ها را تشکیل می‌دهند (۹). این موجودات به‌طور گسترده‌ای در طیف مختلفی از زیستگاه‌ها شامل جنگل، باغ، مزارع و کوهستان یافت

می‌باشد زیرا وجود کلسیم در رژیم غذایی آن‌ها به جهت بازسازی پوسته صدف حلزون‌ها ضروری است (۱۹، ۲۱).

این نرم‌تنان از اهمیت بالایی در زنجیره‌های غذایی و در نتیجه حفظ تعادل زیستگاه خود برخوردارند. از یک سو، به‌عنوان غذایی برای موجودات دیگر، از جمله پرندگان، حشرات و حیوانات کوچک عمل می‌کنند. از سویی دیگر با تجزیه مواد آلی به بازگشت عناصر ضروری حیات به طبیعت کمک می‌کنند (۱۳). می‌توان اینگونه بیان کرد که حذف آن‌ها می‌تواند اثرات نامطلوبی را بر اکوسیستم برجای گذارد. به‌عنوان مثال مطالعاتی که در اروپا انجام شد کاهش جمعیت پرندگان را مرتبط با از بین رفتن حلزون‌های خشکی به دلیل بارش باران‌های اسیدی دانستند (۷، ۱۸).

تحرك کم حلزون‌ها سبب شده تا این موجودات به تغییرات محیط اطراف خود از جمله تغییر در شرایط اقلیمی و یا ترکیب خاک منطقه حساس باشند و به آن‌ها واکنش نشان دهند. این واکنش‌ها در گونه‌های مختلف حلزون‌ها متفاوت است و می‌تواند بصورت تغییر در رنگ پوسته صدف، تغییر محدوده پراکنش و یا حتی حذف یک گونه از اکوسیستم باشد. این ویژگی سبب شده است تا حلزون‌ها خشکی‌زی بعنوان شاخص مناسبی برای ارزیابی وضعیت اکوسیستم‌ها در نظر گرفته شوند به گونه‌ای که با بررسی تنوع زیستی و همچنین ترکیب جوامع آن‌ها می‌توان به اطلاعات ارزنده‌ای در ارتباط با کیفیت زیستگاه‌شان دست پیدا کرد و همچنین زیستگاه‌های مختلف را با یکدیگر مقایسه نمود (۳۳).

در ارتباط با اهمیت اقتصادی این موجودات می‌توان به این موارد اشاره نمود که از نوروتوکسین‌هایی که در غدد بزاقی آن‌ها تولید می‌شود برای تولید داروها در علم پزشکی استفاده می‌شود. علاوه بر این حلزون‌های خشکی‌زی می‌توانند با تغذیه‌شان بر روی گیاهان از گسترش برخی آفات کشاورزی جلوگیری کنند. از سویی دیگر برخی از

گونه‌های حلزون، گاه خود به‌عنوان آفت محصولات زراعی و باغ‌ها عمل می‌کنند و باعث بروز خساراتی می‌شوند (۳۲). با در نظر گرفتن اهمیت زیست‌محیطی و اقتصادی این گروه از جانوران با مطالعه بر روی آن‌ها می‌توان به اطلاعات ارزنده‌ای دست یافت که هم در زمینه حفظ تنوع زیستی و هم در زمینه کنترل آفات حائز اهمیت می‌باشند.

یکی از مهم‌ترین زیستگاه‌های این موجودات در ایران جنگل‌های هیرکانی است این جنگل‌ها یکی از مهم‌ترین بازماندگان جنگل‌های سنوزوئیک می‌باشند و پناهگاه گونه‌های متنوعی در آخرین عصر یخبندان بوده‌اند و بسیاری از گروه‌های گیاهی از جمله *Albizia*، *Pterocarya* و *Parrotia* از آن زمان تنها در این منطقه باقی مانده‌اند (۳۷). تا کنون تحقیقات اندکی بر روی حلزون‌های جنگل‌های هیرکانی در ایران صورت پذیرفته است. این مطالعات که به شناسایی حلزون‌های خشکی‌زی جنگل‌های شمال ایران پرداخته‌اند منجر به گزارش حدود ۴۰ گونه حلزون در شمال ایران شده است (۱، ۲، ۵، ۶، ۱۴، ۱۶، ۲۰، ۳۶). شایان ذکر است در تمامی مطالعات صورت گرفته شناسایی حلزون‌ها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی صدف آن‌ها بوده است. ویژگی‌های ظاهری صدف که بمنظور شناسایی حلزون‌های خشکی‌زی مورد استفاده قرار می‌گیرند عبارتند از: جهت چرخش صدف (راستگرد و یا چپگرد)، مخروطی و یا دیسکی بودن صدف، رنگ صدف، وجود و یا عدم وجود برجستگی، پرز و یا طرح (خط، خال و ..) در سطح پوسته صدف، وجود و یا عدم وجود درپوش بر روی دریچه صدف، جنس و شکل درپوش صدف، شکل دریچه صدف، صاف و یا برگشته بودن دریچه صدف، باز و یا بسته بودن ناف صدف و اندازه آن و تعداد پیچ‌های صدف (۸). همانطور که پیش‌تر ذکر شد صدف حلزون‌ها ممکن است تحت تاثیر شرایط محیطی قرار گیرد و دچار تغییراتی ظاهری شود به این معنی که برخی از گونه‌ها مختلف حلزون‌ها مانند بسیاری دیگر از جانوران ممکن است ظاهری مشابه داشته باشند اما ساختار

ژنتیکی متفاوتی داشته باشند و یا بالعکس در نتیجه شناسایی آن‌ها تنها بر اساس ویژگی‌های ظاهری ممکن است منجر به اشتباه و شناسایی نادرست شود که بدنبال آن سبب ارزیابی نادرستی از تنوع زیستی منطقه شود که از لحاظ تصمیمات حفاظتی حائز اهمیت است (۲۵، ۲۷، ۳۴). جهت غلبه بر این مشکل و برطرف نمودن عدم قطعیت‌ها در شناسایی، در سال‌های اخیر استفاده از روش‌های شناسایی مولکولی (بارکدینگ DNA) به‌عنوان ابزاری دقیق و سریع جهت شناسایی گونه‌های مختلف جانوری از جمله حلزون‌ها بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۱۷، ۲۶).

در این پژوهش تنوع زیستی حلزون‌های جنگل خشکه-داران، به‌عنوان یکی از منحصربه‌فرد ترین مناطق ناحیه هیرکانی از نظر تنوع زیستی، مورد بررسی قرار گرفته است. جهت افزایش قطعیت در نتایج، شناسایی حلزون‌ها با به‌کارگیری تکنیک بارکدینگ DNA با استفاده از ژن COI صورت پذیرفت. از آنجایی که این پژوهش اولین مطالعه بارکدینگ بر روی حلزون‌ها در محدوده‌ی مورد مطالعه می‌باشد می‌تواند منجر به یافتن اطلاعات جدیدی در ارتباط با ترکیب جوامع حلزون‌های جنگل‌های خشکه-داران شود که در زمینه مدیریت این اکوسیستم منحصربه‌فرد شایان توجه باشد.

مواد و روشها

منطقه مورد مطالعه: اثر طبیعی ملی خشکه داران با مساحتی حدود ۲۶۵ هکتار در استان مازندران در کیلومتر ۱۲ جاده تنکابن-چالوش و در شرق شهرنشتارود در شمال کشور ایران قرار گرفته است (شکل ۱). طول جغرافیای منطقه از $30^{\circ} 02' 51''$ تا $05^{\circ} 00' 51''$ و عرض جغرافیایی $30^{\circ} 42' 36''$ تا $45^{\circ} 00' 36''$ می‌باشد. اقلیم این منطقه با متوسط دمای ۱۶ درجه سانتیگراد و بارندگی سالیانه ۱۱۰۰ میلی‌متر مرطوب و معتدل می‌باشد. این جنگل جلگه‌ای و بکر از آخرین بازمانده‌های اکوسیستم

های جنگلی جلگه‌ای شمال ایران به‌شمار می‌رود و زیستگاه گونه‌های گیاهی و جانوری مختلفی است که از دیرباز در این منطقه می‌زیسته‌اند. از جمله این گونه‌ها ی با اهمیت می‌توان به توسکا، ممرز، بلوط، گربه وحشی حواصیل خاکستری و باکلان اشاره نمود. ویژگی‌های زیست‌محیطی خاص این منطقه سبب گشته تا از سال ۱۳۵۴ تحت عنوان اثر طبیعی ملی مورد حفاظت قرار گیرد (۳). این جنگل بخشی از جنگل‌های هیرکانی به‌شمار می‌رود که بدلیل شرایط زیستگاهی خاص و تنوع زیستی منحصربه‌فرد به‌عنوان یکی از مهم‌ترین بیوم‌های کره زمین شناخته می‌شود. شایان ذکر است این جنگل‌ها بدلیل خدمات اکوسیستمی ارزشمندی که ارائه می‌دهند بر روی زندگی مردم بومی منطقه نیز تاثیرگذارند. حفظ این اکوسیستم در گرو شناخت کامل تنوع زیستی این منطقه و بدنبال آن مدیریت مناسب جهت حفظ این ذخیره‌گاه زیست‌کره می‌باشد (۳۷).

نمونه‌برداری: حلزون‌ها بدلیل نیازهای زیست‌محیطی خود یعنی وابستگی به رطوبت و دمای معتدل شب‌فعال می‌باشند و همچنین معمولاً در فصل‌های سرد و گرم سال در صدف خود پنهان شده و به خواب می‌روند و با مساعد شدن شرایط مجدداً فعالیت خود را از سر گیرند لذا فصل بهار زمان مناسب‌تری جهت نمونه‌برداری از این گونه‌ها بمنظور بررسی تنوع زیستی آن‌ها می‌باشد (۳۰) با توجه به این موارد نمونه‌برداری از حلزون‌ها در بهار سال ۱۴۰۰ و در روزهای ابری صورت پذیرفت. نمونه‌ها از روی سطح خاک، تنه درختان، تنه‌های در حال پوسیدن درختان و سنگ‌ها از سه ایستگاه مختلف در محدوده حفاظت شده جنگل خشکه‌داران واقع در عرض‌های جغرافیایی با دست جمع‌آوری شدند. بجهت انتقال ۱۳۵ نمونه جمع‌آوری شده به آزمایشگاه ابتدا آن‌ها بمدت یک روز در آب قرار گرفتند و پس از آن به ظرف حاوی الکل اتانول ۹۶٪ منتقل شدند.

سازی توالی‌های ویرایش شده با استفاده از نسخه تحت وب MAFFT صورت پذیرفت (۲۳). مدل TIM1+I+G به-عنوان بهترین مدل تکاملی با به‌کارگیری نرم‌افزار MrModeltest V.2.3 با استفاده از معیار آکایکه (Akaike) انتخاب شد (Nylander, 2004). در گام بعدی درخت تبار-شناختی با به‌کارگیری آنالیز بیزین (BI) با استفاده از نرم-افزار MrBayes نسخه ۲.۰.۳ (۳۵) ترسیم شد (گونه *Enchytraeidae* sp به‌عنوان ریشه درخت انتخاب شد). فاصله ژنتیکی اصلاح نشده (P-distance) میان افراد نیز با استفاده از نرم‌افزار MEGA V.1.1 محاسبه شد.

بمنظور مشخص نمودن تعداد واحدهای عملیاتی طبقه‌بندی (OTU= Operational taxonomic unit) موجود در مجموعه داده‌ها روش‌های آماری (ABGD (automatic barcode gap) و (Bayesian implementation of the) bPTP (۳۰) و (Poisson tree processes) (۳۹) به‌کار برده شد. تجزیه و تحلیل ABGD یک روش خوشه‌بندی بر اساس فاصله زوجی بین توالی‌ها جهت تعیین مرز گونه‌ها (Species delimitation) است و بر روی وب سرور (۴۰) با استفاده از فاصله کیمورا (K80) با نسبت $Ts/Tv = 0.2$ (پیش‌فرض) و شرایط زیر انجام شد: محدوده واگرایی درون گونه‌ای پیشین از ۰.۱ (Pmin) تا ۰.۱ (Pmax) با ۲۰ مرحله میانی، X (وسعت گپ نسبی): ۰.۰۵ و $Nbin = 10$ (۲۵). bPTP یک روش مبتنی بر درخت است که به درخت فیلوژنتیک غیر اولترا متریک بعنوان ورودی نیاز دارد (۲۴). تجزیه و تحلیل بر روی وب سرور bPTP (۴۱) و شرایط پیش فرض آن انجام شد.

نتایج

شناسایی حلزون‌ها: نمونه‌های حلزون‌های جمع‌آوری شده ابتدا بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی از جمله تعداد پیچ‌های صدف، چپ‌گرد یا راست‌گرد بودن صدف، وجود یا عدم وجود دریچه صدف و شکل صدف با کمک کلید-های شناسایی موجود (۱۳، ۱۴، ۲۶) در سطح خانواده

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: نمونه‌های جمع‌آوری شده بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر (۱۴، ۱۵، ۲۶) در سطح خانواده شناسایی شدند و از هر خانواده ۲ تا ۳ فرد برای مطالعات بارکدینگ انتخاب شد. در مرحله بعد استخراج DNA با استفاده از روش استاندارد نمکی انجام شد (۳۱) و جهت بررسی کیفیت DNA استخراج شده، از روش اسپکتروفوتومتری (نانودراپ) استفاده شد. پس از آن تکثیر ژن سیتوکروم اکسیداز زیرواحد I (Cytochrome oxidase I (COI)) با استفاده از فرآیند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction (PCR)) صورت پذیرفت. آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه شامل (۱۵) LCO ۱۴۹۰/HCO ۲۱۹۸ بودند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر DNA، ۰.۵ میکرولیتر آغازگر پیشرو (Primer forward)، ۰.۵ میکرولیتر آغازگر پسرو (Primer reverse)، ۱۲.۵ میکرولیتر Mastermix Red و ۱۰.۵ میکرولیتر آب مقطر انجام گرفت.

شرایط انجام چرخه این واکنش بدین شرح می‌باشد: واسرشت‌سازی اولیه در درمای C ۹۴° بمدت ۵ دقیقه، واسرشت در درمای C ۹۴° بمدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در درمای C ۷۲° بمدت ۳۰ ثانیه (چرخه)، طویل‌سازی در درمای C ۴۹° بمدت ۱ دقیقه، طویل‌سازی نهایی در درمای C ۷۲° بمدت ۵ دقیقه و خنک شدن درمای C ۲۵° بمدت ۵ دقیقه. در نهایت کیفیت محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۱٪ بررسی شد و آمپلیکون‌های با کیفیت مناسب برای توالی‌یابی به شرکت پیشگام (تهران، ایران) ارسال شد. در نهایت تمامی توالی‌های به‌دست آمده در پایگاه بانک ژن (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ثبت شدند (جدول ۱).

آنالیزهای ژنتیکی: توالی‌های خام DNA (کاروماتوگراف) به‌دست آمده از ۱۰ فرد با استفاده از (www.geneious.com) Geneious Prime v. 2022.1.1 ویرایش شدند. هم‌ردیف-

خانواده Orculidae (Pilsbry, 1918) : اعضای خانواده Orculidae (Pilsbry, 1918) بدلیل شکل خاص صدفشان متمایز تر از سایر حلزون‌های خشکی‌زی می‌باشند. صدف آن‌ها مخروطی کشیده و مورب است. طول صدف آن‌ها بیشتر از عرض آن می‌باشد. اندازه طول صدف کوچک و حداکثر ۵ mm است. دریچه صدف ساده و بدون حاشیه و یا برگشتی است و همچنین این دریچه بدون درپوش می‌باشد. محدوده‌ی پراکنش آن‌ها اروپا، آمریکا، هند، ترکیه و بخش‌هایی از شمال ایران می‌باشد.

خانواده Cyclophoridae : صدف خانواده Cyclophoridae (Gray, 1847) راستگرد، تقریباً مخروطی کوتاه و در بعضی موارد با برآمدگی کم و بشکل دیسکی می‌باشد. عرض صدف بیشتر از طول آن است. اندازه صدف آن‌ها معمولاً کوچک (۱۰ mm) و متوسط (۱۰ mm تا ۳۰ mm) و بندرت بزرگ (۳۰ mm تا ۵۰ mm) می‌باشد. بدنه صدف معمولاً خطوط یا برجستگی‌هایی دارد و دارای ناف است. دریچه صدف با درپوش دایره‌ای بسته می‌شود. این درپوش غالباً شاخی و گاهی اوقات نیز آهکی است. لبه‌ی دریچه صدف بزرگ و برگشته است، گونه‌های متعددی از این خانواده در مناطق گرمسیری آفریقا، آسیا، استرالیا و جزایر مجاور پراکنده شده‌اند. همچنین یک گونه از آن در شرق قفقاز و شمال ایران زندگی می‌کند.

از میان ۱۲ فرد انتخاب شده بمنظور مطالعات بارکدینگ نتایج توالی‌یابی مربوط به ۱۰ نمونه، دارای کیفیت مناسب جهت انجام آنالیزهای ژنتیکی بودند. بلاست ۱۰ سکانس مورد بررسی در سایت NCBI مشخص نمود که نه فرد از آن‌ها متعلق به چهار جنس مختلف به نام‌های *Schileykula* و *Caucasotachea*, *Pyrenaearia* *Theba* می‌باشند. با توجه به گسترده نبودن داده‌های توالی‌یابی شده مربوط به حلزون‌های خشکی‌زی در پایگاه بانک ژن، برای یکی از نمونه‌ها با کد شناسایی ES3388 توالی مشابهی در بانک ژن وجود نداشت. در نتیجه شناسایی این نمونه با

شناسایی شدند. شناسایی اولیه‌ی نمونه‌های جمع‌آوری شده بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی مشخص نمود حلزون‌های مورد مطالعه متعلق به چهار خانواده‌ی Orculidae, Cyclophoridae و Helicidae, Hygromiidae می‌باشند، ویژگی‌های ریخت‌شناسی آن‌ها به شرح زیر می‌باشد:

خانواده Hygromiidae (Tryon, 1866) : خانواده Hygromiidae (Tryon, 1866) دارای صدف دیسکی است و اندازه صدف آن کوچک تا متوسط می‌باشد و در بین جنس‌های مختلف آن از ۷ mm تا ۲۵ mm متغیر است. طول صدف کوچک‌تر از عرض آن و رنگ صدف قهوه‌ای روشن و گاهی مایل به زرد است. پوسته صدف دارای خطوط و شیارهایی می‌باشد که آن‌ها را از سایر گروه‌های با صدف گرد متمایز می‌کند. دهانه صدف معمولاً گرد و یا بیضی شکل است و لبه صدف اندکی برگشته و زاویه دار است. دارای ناف باریکی است که در بعضی جنس‌ها توسط لبه برگشته صدف پوشانده می‌شود. نقطه اتصال دو قسمت ابتدایی و انتهایی دهانه صدف ضعیف است و بوسیله کالوس به هم متصل شده‌اند، در برخی جنس‌ها این دو قسمت بهم متصل نشده‌اند. این خانواده از حلزون‌ها در سراسر اروپا، بخش‌هایی از آمریکای شمالی و بخش‌هایی از آسیا از جمله ایران و ترکیه پراکنده شده‌اند.

خانواده Helicidae : حلزون‌های خانواده Helicidae (Ferussac, 1822) دارای صدف گرد و مسطح می‌باشند. اندازه صدف کوچک تا متوسط و با تعداد پیچ‌های کم است و اندازه آن‌ها از ۱۰ mm تجاوز نمی‌کند. سطح صدف صاف و بدون برآمدگی و خطوط برجسته می‌باشد. دریچه صدف بشکل دایره‌ای، نیم‌دایره‌ای و یا نیمه بیضی می‌باشد و با درپوشی شاخی و یا آهکی بسته می‌شود. ناف صدف با کالوس پوشیده شده است. بسیاری از گونه‌ها ی این خانواده در مناطق گرمسیری (بجز آفریقا) پراکنده‌اند و تعداد کمی از آن‌ها نیز در مناطق معتدل زندگی می‌کنند.

بیزین شش دودمان در محدوده مورد مطالعه وجود دارد همچنین بوت استرپ میان دودمان‌ها بالای ۹۵٪ بوده است (شکل ۲).

تعیین مرزهای گونه‌ای: نتایج مربوط به تعیین مرزهای گونه‌ای با استفاده از آنالیز ABGD و bPTP مشابه بودند و هر دو آنالیز تعداد شش OTU را در مجموعه داده‌ها مشخص نمود (شکل ۲). فاصله ژنتیکی بین OTU های مختلف بر اساس نتایج حاصل از آنالیز P-distance بین ۱۰٪ تا ۳۲٪ تخمین زده شد. بیشترین فاصله ژنتیکی بین OTU 1 و OTU 6 و همچنین OTU 1 و OTU 3 مشاهده شد و کمترین فاصله ژنتیکی بین OTU 3 و OTU 4 گزارش شد (جدول ۲). علاوه بر این، توپولوژی درخت بیزین با نتایج حاصل از ABGD و bPTP همخوانی داشت.

ترکیب جامعه حلزون‌ها: بررسی فراوانی هر یک از OTU های یافت شده در منطقه مورد بررسی نشان داد که OTU 3 و OTU 6 که بترتیب متعلق به جنس‌های *Pyrenaearia* و *Schileykula* می‌باشند غالبیت افراد جامعه را تشکیل می‌دهند. در مقابل OTU 1 که مربوط به گونه *Caspicyclotus sieversi* می‌باشد کم‌جمعیت‌ترین گروه در جامعه مورد بررسی می‌باشند (شکل ۳).

کمک ویژگی‌های ظاهری آن انجام شد و بر اساس کلیدهای شناسایی موجود، مشخص شد این نمونه به جنس و گونه *Caspicyclotus sieversi* تعلق دارد که ویژگی‌های ریخت‌شناسی این جنس به شرح زیر می‌باشد:

Caspicyclotus sieversi

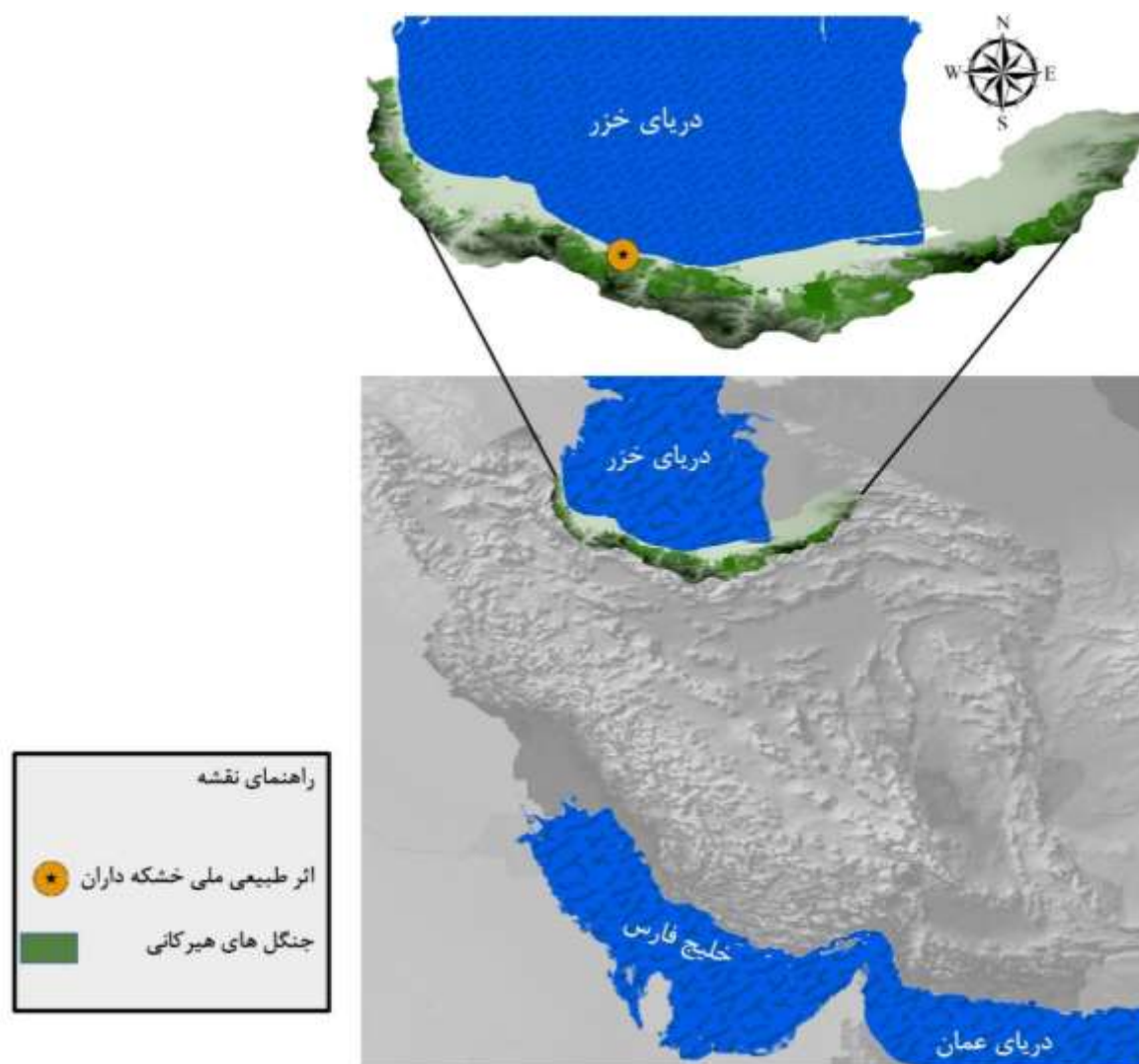
صدف حلزون *Caspicyclotus sieversi* (Forcart, 1935) راستگرد و تقریباً گرد است اما راس آن برآمدگی کوچکی دارد و طول آن کوچک‌تر از عرض آن می‌باشد. اندازه صدف متوسط و قطر آن بین ۶/۵ mm تا ۷/۵ mm و ارتفاع آن بین ۵ mm تا ۶/۵ mm است. رنگ صدف زرد مایل به خاکستری و یا خاکستری است و تعداد پیچ‌های صدف ۴-۴/۵ دور می‌باشد همچنین آخرین پیچ صدف پهنای بیشتری از سایر پیچ‌ها دارد. دیواره صدف تقریباً ضخیم بوده و خطوطی مورب بر روی آن قابل مشاهده است. دارای درپوش دایره‌ای شکل ضخیم و آهکی است و دریچه صاف و بدون برگشتگی است علاوه بر این، صدف این جنس دارای ناف بزرگ می‌باشد. حضور این حلزون در شرق گرجستان، قفقاز و شمال ایران گزارش شده است. لازم بذکر است تنها یک گروه از حلزون‌ها بنام *Caucasotachea luaranea* به‌وسیله بلاست تا سطح گونه شناسایی شدند (جدول ۱). طبق نتایج حاصل از درخت

جدول ۱ - فهرست گونه‌های شناسایی شده به‌مراه کد شناسایی

Code ID	OTU	Accession Number	Family	Genus	Species
ES3388	OTU 1	OR189159	Cyclophoridae	<i>Caspicyclotus</i>	<i>Caspicyclotus sieversi</i>
ES3364	OTU 2	OR189161	Helicidae	<i>Caucasotachea</i>	<i>Caucasotachea Luaranea</i>
ES3371	OTU 2	OR189162	Helicidae	<i>Caucasotachea</i>	<i>Caucasotachea Luaranea</i>
ES3379	OTU 2	OR189168	Helicidae	<i>Caucasotachea</i>	<i>Caucasotachea Luaranea</i>
ES3375	OTU 3	OR189165	Hygromiidae	<i>Pyrenaearia</i>	-
ES3376	OTU 3	OR189166	Hygromiidae	<i>Pyrenaearia</i>	-
ES3387	OTU 3	OR189169	Hygromiidae	<i>Pyrenaearia</i>	-
ES3377	OTU 4	OR189167	Hygromiidae	<i>Pyrenaearia</i>	-
ES3373	OTU 5	OR189164	Helicidae	<i>Theba</i>	-
ES3360	OTU 6	OR189160	Orculidae	<i>Schileykula</i>	-

جدول ۲ - برآورد فاصله ژنتیکی اصلاح نشده (P-distance) بین گونه‌های مختلف حلزون‌های خشکی‌زی در جنگل خشک‌داران

	OTU 1	OTU 2	OTU 3	OTU 4	OTU 5	OTU 6
OTU 1	0					
OTU 2	0.31					
OTU 3	0.32	0.21				
OTU 4	0.31	0.20	0.10			
OTU 5	0.31	0.21	0.12	0.11		
OTU 6	0.32	0.26	0.26	0.24	0.26	0

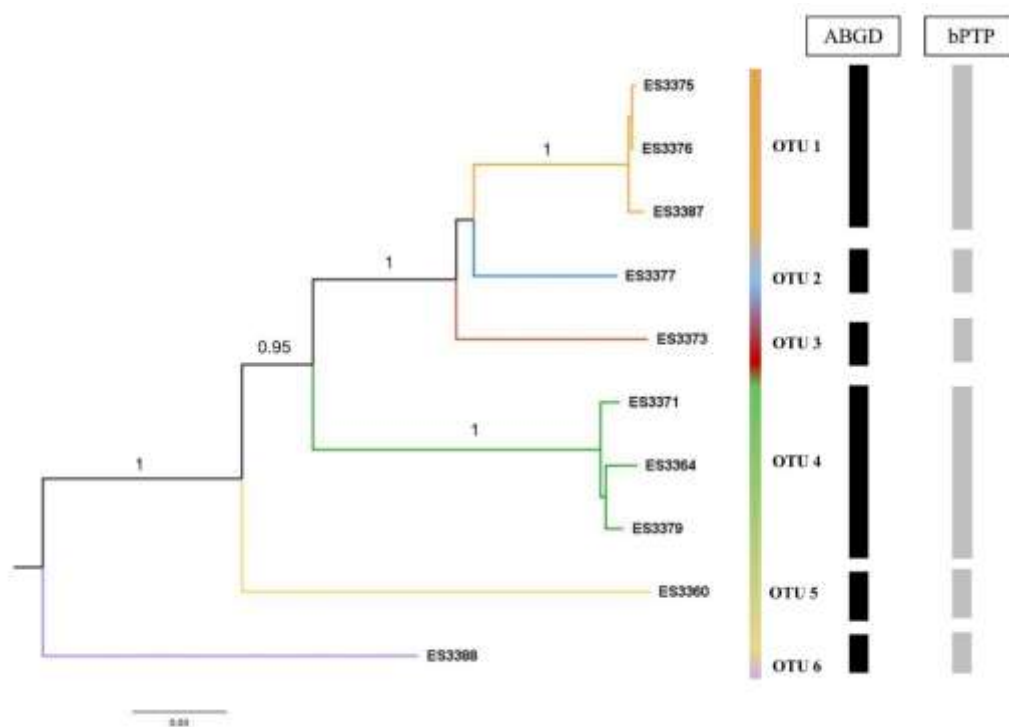


شکل ۱ - منطقه نمونه‌برداری

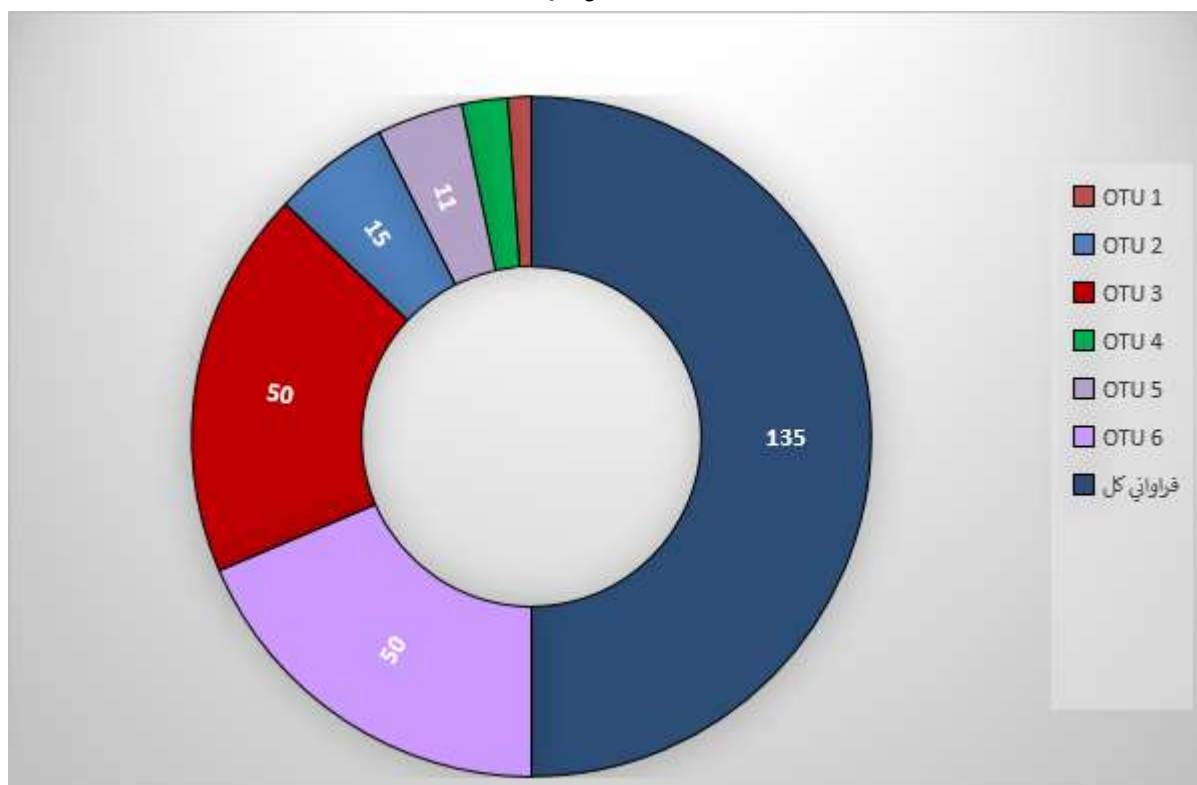
بحث و نتیجه‌گیری

اعتمادی برای بررسی تغییرات طولانی مدت محیط و همچنین ارزیابی تنوع زیستی در طیف وسیعی از زیستگاه‌ها هستند (۹).

حلزون‌های خشکی‌زی بدلیل داشتن ویژگی‌هایی از جمله نمونه‌برداری آسان و قدرت انتشار اندک شاخص قابل



شکل ۲ - درخت بیزین (BI) حاصل از ژن COI مربوط به حلزون‌های خشکی‌زی جنگل خشکه‌داران. مقادیر احتمالات پسین در بالای هر شاخه نشان داده شده است. نتایج مربوط به آنالیزهای ABGD و bPTP نیز در شکل آمده است که هر دو نتایج مشابهی داشتند و تعداد ۶ گونه فرضی را در میان داده‌ها مشخص نمودند.



شکل ۳ - فراوانی حلزون‌ها و تنوع گونه‌ای آن‌ها در جنگل خشکه‌داران

در این پژوهش تنوع زیستی حلزون‌های خشکی‌زی ساکن در جنگل خشکه‌داران به‌عنوان یکی از مهم‌ترین زیستگاه‌های باقیمانده از جنگل‌های سنوزوئیک در شمال ایران با استفاده از روش بارکدینگ DNA و همچنین بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد حلزون‌های جمع‌آوری شده متعلق به چهار خانواده، پنج جنس و شش OTU می‌باشند. از آنجاییکه بیشتر از ۵۰٪ جمعیت جامعه متعلق به دو جنس *Schileykula* و *Pyrenaearia* بوده است می‌توان اینگونه بیان کرد که تنوع زیستی منطقه پایین می‌باشد.

در میان گروه‌های شناسایی شده دو گونه *Caspicyclotus sieversi* و *Caucasotachea leuaranea* که بترتیب متعلق به OTU 1 و OTU 2 می‌باشند در مطالعات پیشین توسط *Eliazian et al.* (۱۴)، یاسینی (۶) و منصوریان (۵) در شمال ایران گزارش شده‌اند. سه جنس (*Pyrenaearia* (OTU5) و *Theba* (OTU 3, OTU 4) و *Schileykula* (OTU 6) برای اولین بار در این پژوهش در منطقه خشکه‌داران گزارش شده‌اند.

علاوه بر این مطالعات معدودی بر روی حلزون‌های خشکی‌زی در سایر نقاط ایران نیز صورت گرفته است. از جمله می‌توان به مطالعه شمسی و همکاران (۴) اشاره نمود که به شناسایی حلزون‌های خاکری شهرستان ارومیه پرداختند را برای آن و در مجموع ۹ گونه حلزون منطقه معرفی کردند که تشابهی با گونه‌های نام برده در مطالعه حاضر نداشتند. همچنین آن‌ها بیان داشتند تنوع حلزون‌ها در ارومیه در مقایسه با شمال ایران کمتر است و علت این امر را کمتر بودن میزان رطوبت ارومیه نسبت به شمال ایران دانستند.

در زمینه شناسایی حلزون‌های خشکی‌زی تکیه انحصاری به روش‌های ریخت‌شناسی به دلایل متعددی از جمله تغییرات در پوسته صدف در اثر شرایط محیطی خاص زیستگاه بویژه در گونه‌های کوچک، وجود گونه‌های مرموز

(Cryptic) در میان حلزون‌ها و همچنین تعداد کم متخصصان با تجربه و دانش کافی جهت شناسایی دقیق گونه‌های حلزون، می‌تواند منجر به اشتباه در شناسایی گونه‌ها شود (۳۸). جهت غلبه بر مشکل‌هایی از این دست روش بارکدینگ DNA به‌عنوان روشی با دقت و اعتبار بالا جهت شناسایی موجودات در دهه‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است اما علیرغم تنوع میتوکندریایی قابل توجه حلزون‌های خشکی‌زی، مطالعات بارکدینگ گسترده‌ای بر روی آن‌ها صورت نگرفته و اکثر تحقیقات صورت گرفته بر روی شکم‌پایان دریایی متمرکز شده است (۹، ۲۲). در نتیجه، داده‌های ژنتیکی در بانک ژن برای مطالعات بارکدینگ محدود می‌باشد و در حال حاضر داده‌های ژن COI به تنهایی نمی‌تواند به‌عنوان یک روش عملی برای شناسایی گونه‌های حلزون زمینی عمل کند. در نتیجه می‌توان اینگونه بیان نمود در حال حاضر با توجه به محدود بودن توالی‌های مربوط به گونه‌های مختلف حلزون‌های خشکی‌زی در مخازن بانک ژن، ترکیبی از دو روش ریخت‌شناسی و مولکولی رویکرد مناسبی جهت شناسایی حلزون‌های خشکی‌زی می‌باشد. همانطور که در این پژوهش نیز سکانس مشابه با نمونه مربوط به OTU 6 در بانک ژن وجود نداشت و در نتیجه شناسایی این گونه با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناسی صدف آن صورت پذیرفت اما شناسایی سایر گونه‌ها با استفاده از بارکدینگ صورت پذیرفت. با توجه به اینکه در سال‌های اخیر پژوهش‌های مولکولی بیشتری بر روی این موجودات صورت پذیرفته (۱۷، ۲۲، ۲۳، ۲۵، ۲۶، ۳۳) و توجه جامعه علمی به انجام مطالعات ژنتیکی بر روی این موجودات بیشتر شده است، انتظار می‌رود در آینده نزدیک بواسطه انجام مطالعات گسترده‌تر در این زمینه و افزودن توالی‌های مربوط به گونه‌های مختلف حلزون به پایگاه داده بانک ژن این محدودیت برطرف شده و رویکرد مولکولی به تنهایی

بعنوان روشی قابل اعتماد و البته با دقت بیشتر جهت شناسایی این موجودات مورد استفاده قرار گیرد.

لازم به ذکر است در زمینه مطالعات اکولوژیکی، زمانیکه محاسبه تعداد گونه‌های موجود در منطقه به منظور بررسی تنوع زیستی و ویژگی‌های جوامع زیستی و ارزیابی سلامت اکوسیستم مد نظر است رویکرد مولکولی و تعیین مرزهای گونه‌ای به تنهایی می‌تواند منجر به دست‌یابی به نتایج دقیق و قابل اعتمادی شوند. زیرا در این نوع مطالعات تنها تعداد گونه‌های موجود در منطقه مورد بررسی قرار می‌گیرد و نیازی به شناسایی حلزون‌ها و دانستن نام جنس و یا گونه آن‌ها نیست در نتیجه با محاسبه تعداد OTU های موجود در محدوده مورد بررسی می‌توان به داده‌های قابل قبول و معتبری برای ارزیابی تنوع زیستی یک اکوسیستم دست یافت (۱۱، ۲۹).

بررسی جوامع حلزون‌های خشکی‌زی، به‌عنوان گونه‌ای با اهمیت که دارای نقش‌های اکولوژیک فراوان در طبیعت

منابع

می‌باشند، حفظ آن‌ها بعنوان گونه‌های بومی و یا کنترل آن‌ها بعنوان گونه‌های آفت در گرو شناخت کامل گونه‌های موجود در منطقه و بررسی پراکنش آن‌ها است. پیشنهاد می‌شود با انجام مطالعات مولکولی گسترده‌تر در این منطقه هیرکانی به‌مراه بررسی آماری جوامع حلزون در بخش‌های مختلف جنگل‌های هیرکانی به شناسایی تنوع زیستی کشف نشده در این ذخیره‌گاه زیست‌کره پرداخت و گونه‌های بومی این منطقه را پیش از حذف از طبیعت شناسایی نمود. همچنین در نهایت این داده‌ها می‌توانند به توسعه یک شاخص زیستی مناسب برای ارزیابی کیفیت زیستگاه در این جنگل‌ها و زیستگاه‌های مشابه به منظور بررسی کمک کنند.

سپاسگزاری

بدینوسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از تمامی اساتید و عزیزانی که در مراحل مختلف این تحقیق با ما همکاری داشته‌اند ابراز می‌داریم.

۴. شمس‌ی، ل.، توسلی، م.، نائم، ث.، احمدی، ا.، محمودیان، ع.، ۱۳۹۸. شناسایی حلزون‌های خاکری شهرستان ارومیه، مجله پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران) (علمی)، شماره ۳۲، سال ۱، صفحات ۲۹-۳۷.

۵. منصوریان، ا.، ۱۳۸۴. شناسایی نرم‌تنان خاکری استان‌های گلستان و مازندران، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. سال ۶، شماره ۱، صفحات ۳۱-۳۶.

۶. یاسینی، ا.، ۱۳۵۵. بررسی پاره‌ای از شکم‌پایان هوازی کثیرالانتشار استان‌های مازندران، گیلان، آذربایجان شرقی و غربی. محیط‌شناسی. مرکز هماهنگی مطالعات زیستی دانشگاه تهران. شماره ۶، صفحات ۱۳۰-۱۶۵.

7. Bishara, S. I., Hassan, M. S. and Kalliny, A. S., 1968. Studies on some land snails injurious to agriculture in U.A.R. *Revue de zoologie et de botanique africaines* Lxx, VII, 239-252.

8. Cameron, R., and Redfern, M., 2009. *British land snails: Mollusca, Gastropoda: keys and notes for the identification of the species*. Linnean Society of London by Academic Press, 64.

۱. اکبری، ر.، بلقیس‌زاده، ح.، یوسفی سیاه کلرودی، س.، ۱۳۹۶. بررسی فونستیک حلزون‌های خشکی‌زی (Gastropoda) در بخش مرکزی استان مازندران. فصلنامه محیط زیست جانوری، شماره ۱، سال ۹، صفحات ۱۵۹-۱۶۶.

۲. احمدی، ا.، ۱۳۹۱. شناسایی حلزون‌های باغات پرتقال تامسون در استان مازندران. مجله حشره‌شناسی گیاهان زراعی. سال ۱، شماره ۲، صفحات ۵۷-۶۴.

۳. پیام، ح.، ۱۳۷۸. شناسایی فلور و فون مهم اثر طبیعی ملی خشکه داران. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.

9. Campbell, D. C., Johnson, P. D., Williams, J. D., Rindsberg, A. K., Serb, J. M., Small, K. K., and Lydeard, C., 2008. Identification of *extinct freshwater mussel species using DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 8(4), 711-724.

10. Chavhan, A., Pawar, S. and Jadhao, R., 2015. *Study of Biodiversity of Terrestrial Snail in*

- Selected Locality of Amravati City, Central India. *Indian Journal of Applied Research*, 5(8), 713-714.
11. Davison, A., Blackie, R. L., and Scothern, G. P., 2009. DNA barcoding of stylommatophoran land snails: a test of existing sequences. *Molecular Ecology Resources*, 9(4), 1092-1101.
 12. Dempsey, Z. W., Goater, C. P., and Burg, T. M., 2020. Living on the edge: Comparative phylogeography and phylogenetics of *Oreohelix* land snails at their range edge in Western Canada. *BMC Evolutionary Biology*, 20(1), 1-13.
 13. Dourson, D. and Dourson, J., 2006. Land snails of the great Smoky Mountains (Eastern Region). Appalachian Highlands Science Learning Center, Purchase Knob, Great Smokey Mountains National Park.
 14. Eliazian, M., Tamiji, Y., Akbarzadeh, M., and Hagh-Nazari, J., 1979. Snails from the northern parts of Iran (Caspian Area). *Archives of Razi Institute*, 31(1), 29-36.
 15. Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., and Vrijenkoek, R., 1994. Molecular Marine Biology and Biotechnology. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates, 3, 294-299.
 16. Forcart, L., 1935. Die Mollusken der nordpersischen Provinz Masenderan und ihre tiergeographische Bedeutung. *Archiv für Naturgeschichte*, N.F., 4(3), 404-447.
 17. Galan, G. L., Mendez, N. P., and dela Cruz, R. Y., 2018. DNA barcoding of three selected gastropod species using cytochrome oxidase (COI) gene. *Annales of West University of Timisoara. Series of Biology*, 21(1), 93-102.
 18. Hames, R. S., Rosenberg, K. V., Lowe, J. D., Barker, S. E. and Dhondt, A. A., 2002. Adverse effects of acid rain on the distribution of the Wood Thrush *Hylocichla mustelina* in North America. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(17), 235-240.
 19. Hotopp, K. P., 2002. Land snails and soil calcium in central Appalachian Mountain forest. *Southeastern Naturalist*, 1(1), 27-44.
 20. Issel, A., 1866. Dei molluschi raccolti nella provincial de Pisa. *Memorie della Societa Italiana di Scienze Naturali*, 2(23), 411-426.
 21. Jurickova, L., Horsák, M., Cameron, R., Hylander, K., Míkovcová, A., Hlaváč, J. Č., and Rohovec, J., 2008. Land snail distribution patterns within a site: the role of different calcium sources. *European Journal of Soil Biology*, 44(2), 172-179.
 22. Kelly, R. P., Sarkar, I. N., Eernisse, D. J., Desalle, R., 2007. DNA barcoding using chitons (genus *Mopalia*). *Molecular Ecology Notes*, 7, 177-183.
 23. Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., and Miyata, T., 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignments based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30 (14), 3059-3066.
 24. Mason, K., Fehér, Z., Bamberger, S., Reier, S., Szekeres, M., Sattmann, H., ... and Haring, E., 2020. New insights into and limitations of the molecular phylogeny in the taxon-rich land snail genus *Montenegrina* (Mollusca: Gastropoda: Clausiliidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 58(3), 662-690.
 25. Mouahid, G., Clerissi, C., Allienne, J. F., Chaparro, C., Al Yafae, S., Mintsu Nguema, R., ... and Moné, H., 2018. The phylogeny of the genus *Indoplanorbis* (Gastropoda, Planorbidae) from Africa and the French West Indies. *Zoologica Scripta*, 47(5), 558-564.
 26. Nantarat, N., Sutcharit, C., Tongkerd, P., Wade, C. M., Naggs, F., and Panha, S., 2019. Phylogenetics and species delimitations of the operculated land snail *Cyclophorus volvulus* (Gastropoda: Cyclophoridae) reveal cryptic diversity and new species in Thailand. *Scientific Reports*, 9(1), 1-12.
 27. Nekola, J. C. and Coles, B. F., 2010. Pupillid land snails of eastern North America. *American Malacological Bulletin*, 28(2), 29-57.
 28. Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., and Achaz, G. J. M. E., 2012. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21(8), 1864-1877.
 29. Ranasinghe, U. G. S. L., Eberle, J., Thormann, J., Bohacz, C., Benjamin, S. P., and Ahrens, D., 2022. Multiple species delimitation approaches with COI barcodes poorly fit each other and morphospecies—An integrative taxonomy case of Sri Lankan Sericini chafers (Coleoptera: Scarabaeidae). *Ecology and Evolution*, 12(5), 8942.
 30. Sallam, A. and El-Wakeil, N., 2012. Biological and ecological studies on land snails and their control. *Integrated Pest Management and Pest Control-Current and Future Tactics*, 1.

31. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual (No. Ed. 2). Cold Spring Harbor Laboratory press. 2100 pp.
32. Shahawy, W. A., Hendawy, A. S., Abada, A. E. and Kassem, A. A., 2008. Land snails infesting rice plants and their accompanied parasitoids and predators at Kafr El-Sheikh governorate, Egypt. Egyptian Journal of Agricultural Research, 86, 971-980.
33. Shimizu, Y., and Ueshima, R., 2000. Historical biogeography and interspecific mtDNA introgression in *Euhadra peliomphala* (the Japanese land snail). Heredity, 85(1), 84-96.
34. Smith, U. E. and Hendricks, J. R., 2013. Geometric morphometric character suites as phylogenetic data: extracting phylogenetic signal from gastropod shells. Systematic Biology, 62(3), 366-385.
35. Stamatakis, A., 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics, 30(9), 1312-1313.
36. Starmühlner, F. and Edlauer, A., 1957. Ergebnisse der Österreichischen Iran-Expedition 1949/50. Beiträge zur Kenntnis der Molluskenfauna des Iran. Sitzungsberichte der Österreichischen Akademie der Wissenschaften, 166(9-10), 435-494.
37. Tohidifar, M., Moser, M., Zehzad, B. and Ghadirian, T., 2016. Biodiversity of the Hyrcanian forests. A Synthesis Report. 1, 10.
38. Zeng, X., Yiu, W. C., Cheung, K. H., Yip, H. Y., Nong, W., He, P., ... and Hui, J. H. L., 2017. Distribution and current infection status of *Biomphalaria straminea* in Hong Kong. Parasites and vectors, 10(1), 1-12.
39. Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., Stamatakis, A., 2013. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. Bioinformatics, 29, 2869-2876.
40. <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/abgdweb.html>
41. [Species delimitation server \(h-its.org\)](http://species.delimitation-server.org/)

Investigating the species diversity of land snails (Mollusca: Gastropoda) of the natural monument Khoshkedaran forest in Mazandaran province using DNA barcoding technique

Mohammadi S. and Ahmadzadeh F.

Dept. of Biodiversity and Ecosystem Management, Environmental Sciences Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Land snails, known for their exceptional diversity, play a vital role in maintaining ecosystem stability owing to their distinctive ecological traits. These snails inhabit various environments, including forests. The Hyrcanian forests in northern Iran are one of the most important habitats for this group of terrestrial mollusks. The main objective of this study was to identify land snails inhabiting the Khoshkedaran Forest, a significant habitat in the Hyrcanian area using both morphological taxonomy and DNA barcoding methods. 135 gathered samples were classified based on their morphological characteristics such as shell size, shell shape, shell color, presence of operculum, open or closed umbilicus, and aperture shape. This classification was done at the family level. Subsequently, a subset of 2-3 individuals from each family underwent genetic analysis. Following laboratory procedures, the obtained genetic sequences underwent thorough analysis, including the determination of an evolutionary model, calculation of genetic distances, and constructed phylogenetic tree. The outcomes revealed that the collected samples could be categorized into four families, five genera, and six species. Notably, no sequences in the Gene Bank matched the sequence attributed to *Caspicyclotus sieversi*. Therefore, the identification of this species was reliant on morphological techniques and established identification keys. Surprisingly, the overall biodiversity of the region was found to be relatively low, with the majority of the snail community belonging to the genera *Pyrenaearia* and *Schileykula*. Furthermore, this research presented a noteworthy finding as it documented, for the first time in this specific region, the presence of the genera *Theba*, in addition to the two previously mentioned genera. Surprisingly, the overall biodiversity of the region was found to be relatively low, with the majority of the snail community belonging to the genera *Pyrenaearia* and *Schileykula*. Furthermore, this research presented a noteworthy finding as it documented, for the first time in this specific region, the presence of the genera *Theba*, in addition to the two previously mentioned genera. Being the first DNA barcoding study on land snails in the Hyrcanian forests, this research has offered significant contributions to understanding the biodiversity of the region. By extending the scope of the study to encompass a broader area and employing more comprehensive statistical analyses of snail populations, we can obtain detailed information on the land snail diversity within the Hyrcanian forests. Such insights are instrumental in identifying native species before they become susceptible to the threat of extinction. This valuable information plays a pivotal role in the effective management and conservation of this exceptional ecosystem.

Keywords: land snails, DNA barcoding, Hyrcanian Forest, biodiversity, morphology.