



# Relationship Between Land Snails and Soil Physicochemical Properties in the Hyrcanian Forests in Northern Iran; A Conservational Approach in Biodiversity

Mohammadi<sup>1</sup> , S., Ahmadzadeh<sup>1\*</sup> , F.,

1. Department of Biodiversity and Ecosystem Management, Environmental Sciences Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

- Canonical correlation analysis (CCA)
- Biodiversity
- Saturation moisture content
- Calcium
- Magnesium

Original Article

#### Article history:

Received: 22/12/2023

Accepted: 29/01/2024

### ABSTRACT

Forests serve as habitats for a diverse group of animals, with one of the significant animal groups being land snails. One of the influential factors in the distribution of snails are the physicochemical properties of soil. The aim of this study is to explore the relationship within the geographic expanse of the Hyrcanian forests located in northern Iran. This study examined six soil parameters, including pH, Ca, Mg, Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, and soil saturation moisture content in the Hyrcanian forests of northern Iran. Identification of snails was conducted using DNA barcoding, and Canonical correlation analysis (CCA), was employed for analyzing the relationship between land snails' community and soil physicochemical factors. The analysis, determining the level of correlation between parameters, presents "eigenvalues" to illustrate how these variables are associated with the distribution of species in different locations. The samples belong to 10 OTUs. The PCA results suggest that three factors, namely Ca, Mg, and soil saturation moisture content, influence the snail fauna in the study area. CCA with eigenvalues of 0.374 and 0.202 for the first and second axes, respectively, also indicate a high correlation between these three parameters and most identified OTUs. These studies provide fundamental information to develop a biological indicator based on land snails in the Hyrcanian Forest. such indicators can be practical for developing management strategies for the conservation of snail fauna.



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY). license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

#### Citation:

Mohammadi, S. and Ahmadzadeh, F., (2024). Relationship between land snails and soil physicochemical properties in the Hyrcanian forests in northern Iran; A conservational approach in biodiversity, *Sustainable Development of Geographical Environment*: Vol. 5, No. 9, (201-214).  
DOI: 10.48308/SDGE.2024.234211.1178

\* Corresponding author E-mail address: (F\_ahmadzade@sbu.ac.ir)

## Extended abstract

### Background and purpose

Biodiversity within ecosystems is intricately linked to a various factor, with soil physicochemical characteristics standing out as pivotal contributors. The soil, particularly in forests, functions as a dynamic habitat supporting a diverse array of organisms, including land snails, which play a significant role in forest ecosystems. This study focuses on unraveling the intricate correlation between the presence of land snails and six key soil parameters: pH, total calcium (Ca), total magnesium (Mg), exchangeable calcium (Ca<sup>++</sup>), exchangeable magnesium (Mg<sup>++</sup>), and soil Saturation Moisture percent. These factors are investigated as crucial elements influencing the distribution patterns of land snails.

### Methodology

The research was conducted in the Hyrcanian forests of Iran, specifically targeting three distinct forest regions situated in Kordkoy, Amol, and Tonekabon. These areas were designated as sampling sites during field surveys. To ensure a comprehensive and representative approach, sampling was conducted at three distinct locations within each forest, resulting in a total of 27 sample plots, each measuring 3 m × 3 m for detailed ecological assessment. The identification of snails and the evaluation of biodiversity were enhanced by employing DNA barcoding techniques. Snail abundance and species diversity were measured at each forest site, offering valuable insights into the ecological dynamics of these ecosystems. This quantification process provided a comprehensive understanding of the population density of snails and the variety of species present in each forest location. The analysis of soil factors involved laboratory methods, and Principal Component Analysis (PCA) was utilized to simplify the multidimensional data. It identified important variables for subsequent Canonical Correspondence Analysis (CCA), a sophisticated

statistical technique. This comprehensive approach played a pivotal role in unraveling intricate relationships between soil physicochemical factors and the presence of snails. The analysis not only clarified the correlations between environmental variables and species distribution within the forests but also offered profound insights into the nuanced interplay shaping the ecological dynamics of these ecosystems.

### Findings and discussion

A total of 679 snails were collected from the sampling stations, and phylogenetic tree analysis along with species delimitation revealed 37 sequences belonging to 10 Operational Taxonomic Units (OTUs). ANOVA results indicated significant variations in snail abundance among the forests. Following PCA, key factors for CCA were identified, and CCA, utilizing total calcium, total magnesium, and soil saturation moisture percentage as factors, demonstrated a positive correlation with most OTUs and snail abundance. These factors are vital in shaping the distribution and biodiversity of land snails. Land snails need Ca and Mg to restore the shell. Also, areas with moist soil are more favorable habitats for Snails provide.

### Conclusion

In conclusion, this research establishes a foundational understanding of the intricate relationship between soil properties and snail communities in sections of the Hyrcanian forests. The insights gained from such studies contribute fundamental information essential for developing a native biodiversity index based on land snails. This index, in turn, holds promise for informing the formulation of effective management strategies aimed at conserving the diverse fauna of land snails within these ecologically vital forest ecosystems.

**Keywords:** Canonical correlation analysis (CCA), Biodiversity, Saturation Moisture Content, Calcium, Magnesium.





## بررسی رابطه میان حلزون‌های خشکی‌زی و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک در جنگل‌های هیرکانی شمال ایران؛ رویکرد حفاظتی در تنوع زیستی

سیما محمدی<sup>۱</sup> ID، فراهم احمدزاده<sup>۱\*</sup> ID

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

### چکیده

### اطلاعات مقاله

جنگل‌ها زیستگاه گروه متنوعی از جانداران بوده و یکی از مهم‌ترین گروه‌های جانوری این اکوسیستم‌ها حلزون‌های خشکی‌زی هستند. یکی از عوامل مهم و تاثیرگذار بر توزیع زیستی حلزون‌ها، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک است و هدف این پژوهش نیز بررسی دقیق این ارتباط در محدوده جغرافیایی جنگل‌های هیرکانی شمال ایران است. در این مطالعه ارتباط میان شش پارامتر خاک شامل اسیدیته (pH)، کلسیم کل (Ca)، منیزیم کل (Mg)، کلسیم تبادل (Ca<sup>++</sup>)، منیزیم تبادل (Mg<sup>++</sup>) و درصد رطوبت اشباع با حضور حلزون‌های خشکی‌زی مورد بررسی قرار گرفت. شناسایی حلزون‌ها با بارکدینگ DNA صورت پذیرفت و برای تعیین رابطه میان فاکتورهای فیزیکوشیمیایی خاک و حضور حلزون‌ها آنالیز همبستگی کانونی (CCA) مورد استفاده قرار گرفت. این آنالیز با مشخص نمودن میزان همبستگی بین پارامترها با عنوان "مقادیر ویژه" نشان می‌دهد که چگونه متغیرهای محیطی با توزیع گونه‌ها در مکان‌های مختلف مرتبط هستند. نمونه‌های مورد بررسی متعلق به ۱۰ واحد طبقه‌بندی عملیاتی (OTU) بودند. آنالیز تعیین مولفه اصلی بیانگر این موضوع بود که سه فاکتور Ca، Mg و درصد رطوبت اشباع تاثیر بیشتری بر روی فون حلزون‌های خشکی‌زی ناحیه مورد بررسی دارند. نتایج CCA با مقادیر ویژه ۰/۳۷۴ و ۰/۲۰۲ به ترتیب برای محورهای یک و دو نیز نشان داد که میان این سه پارامتر و بیشتر OTU های شناسایی شده همبستگی بالایی وجود دارد. چنین مطالعاتی اطلاعاتی پایه‌ای را تولید می‌کنند که به توسعه یک شاخص زیستی بومی‌سازی شده بر پایه حلزون‌های خشکی‌زی ناحیه هیرکانی کمک می‌کند. استفاده از یک شاخص بومی در توسعه استراتژی‌های مدیریتی برای حفظ فون حلزون‌ها کاربردی است.

### واژه‌های کلیدی:

- آنالیز همبستگی کانونی (CCA)
- تنوع زیستی
- درصد رطوبت اشباع
- کلسیم
- منیزیم

مقاله: پژوهشی

تاریخچه مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۰۹



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### استناد:

محمدی، س. و احمدزاده، ف. (۱۴۰۲). بررسی رابطه میان حلزون‌های خشکی‌زی و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک در جنگل‌های هیرکانی شمال ایران؛ رویکرد حفاظتی در تنوع زیستی، توسعه پایدار محیط جغرافیایی: سال ۵، شماره ۹، (۲۰۱-۲۱۴).  
DOI: 10.48308/SDGE.2024.234211.1178

## مقدمه

عوامل مختلفی تنوع زیستی یک اکوسیستم را تحت تاثیر قرار می‌دهند و یکی از مهم‌ترین این عوامل ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک است. شناسایی عوامل محیطی موثر بر تنوع زیستی می‌تواند کمک کند تا الگوهای توزیع گونه‌ها را درک و اقدامات لازم برای حفاظت از آن‌ها انجام شود (Kessler, 2000; Jafari et al, 2004). در اکوسیستم‌های خشکی به ویژه جنگل‌ها، بستر خاک، زیستگاه گونه‌های متنوعی از بی‌مهرگان نظیر کرم‌ها، هزارپاها، جورپایان و نرم‌تنان است که از اعضای مهم شبکه‌های غذایی هستند. حلزون‌های زمینی به عنوان یکی از مهم‌ترین گروه‌های بی‌مهرگان خشکی در اکوسیستم‌های جنگلی به شمار می‌روند (Rull et al, 2019; Dempsey et al, 2020). این گروه از موجودات به عنوان مصرف‌کنندگان گیاهان در حال فساد در نظر گرفته می‌شوند (Corssmann, 1990). تحقیقات نشان داده حدود یک درصد از لاشبرگ‌های جنگل‌های راش اروپا توسط حلزون‌ها مصرف می‌شوند (Martin and Sommer, 2004). در واقع علاوه بر اینکه حضور حلزون‌ها وابسته به برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک است، خود این موجودات نیز بر روی بهبود کیفیت خاک تاثیرات بسزایی دارند. همچنین شاخص‌های مناسبی جهت بررسی وضعیت سلامت اکوسیستم‌ها و ساختار خاک هستند (Millar and Waite, 2002). غلظت مواد مغذی در سطح فوقانی خاک نشان‌دهنده‌ی مواد مغذی در دسترس برای حلزون‌هاست زیرا حلزون‌ها علاوه بر گیاهان و لاشه موجودات با خوردن سنگ‌ریزه‌ها به ذرات کوچک، از آن‌ها و همچنین از ذرات کوچک خاک تغذیه می‌کنند. حلزون‌ها به منظور رشد و بازسازی پوسته صدف خود به کلسیم نیاز اساسی دارند (Nunes and Santos, 2012). بنابراین محتوی کلسیم خاک و همچنین میزان pH خاک، به عنوان معیاری برای تامین کلسیم، از مهم‌ترین فاکتورهای تاثیرگذار بر روی غنای گونه‌ای و همچنین تراکم حلزون‌ها شناخته شده‌اند (Jafarian et al, 2010). رابطه مستقیم میان فراوانی حلزون‌ها و محتوی کلسیم خاک در مطالعات مختلفی به اثبات رسیده است (Ondina et al, 1998; Nekola and Smith, 1999; Millar and Waite, 2002). علاوه بر این به دلیل نقش حلزون‌ها در چرخه کلسیم و انتقال آن به سطوح بالاتر زنجیره غذایی تغییرات در تنوع و فراوانی فون حلزون‌های یک اکوسیستم منجر به بروز اثر موجی<sup>۱</sup> در اکوسیستم‌ها می‌شود (Hotopp, 2002). اهمیت این موضوع در مطالعاتی که عواقب محیط زیستی اسیدی شدن خاک را در اثر فعالیت‌های صنعتی بررسی می‌کردند مشخص شده است. در قسمت‌های مختلف اروپا تراکم کل حلزون‌ها در جنگل‌ها در دهه‌های گذشته به دلیل بارش اسیدی کاهش یافته و چنین تغییراتی بر روی سایر گونه‌های جنگلی نیز تاثیرگذار بوده است. به عنوان مثال جمعیت پرندگانی که جهت تامین کلسیم مورد نیاز برای ساختن پوسته تخم از حلزون‌ها تغذیه می‌کردند نیز کاهش یافت. زیرا با کاهش تراکم حلزون‌ها به دلیل اسیدی شدن خاک، در اثر کمبود کلسیم جوجه‌های کمتری در نتیجه ضعیف بودن پوسته از تخم خارج شدند (Ramsay and Houston, 1999; Mand et al, 2000). از سویی، در مطالعاتی که توسط مورکرافت و همکاران (۲۰۰۲)، سیلوان و همکاران (۲۰۰۰) و فلاگ و ولترس (۲۰۰۱) صورت پذیرفته ارتباط معنی‌داری میان محتوی کلسیم خاک و حلزون‌ها خشکی یافت نشد و حضور آن‌ها تحت تاثیر رطوبت خاک بوده است. رطوبت خاک به ویژه در محیط‌های خشک، که رطوبت به عنوان عامل محدود کننده برای بسیاری از موجودات عمل می‌کند، از عوامل مهم کنترل کننده غنای گونه‌ای حلزون‌ها است. رطوبت خاک معمولا به عنوان مسئول اصلی تفاوت در غنای گونه‌ای و تراکم حلزون‌ها میان سایت‌های مختلف شناخته می‌شود (Silvan et al, 2000; Pflug and Wolters, 2001; Morecroft et al, 2002). با این وجود بدلیل پیچیده بودن اندازه‌گیری رطوبت خاک، این معیار در مطالعات اندکی مورد بررسی قرار گرفته است (Martin and Sommer, 2004). در برخی مطالعات به منیژیم نیز به عنوان عامل تاثیرگذار در توزیع حلزون‌ها اشاره شده است. تغییر در سطح منیژیم خاک میزان در دسترس بودن کلسیم، میزان pH و همچنین سطح رطوبت خاک را تحت تاثیر قرار می‌دهد و در نتیجه می‌تواند بر روی تنوع و غنای زیستی حلزون‌ها تاثیرگذار باشد (Hotopp, 2002). در این راستا، در مطالعاتی که بر روی حلزون‌ها صورت پذیرفته به فاکتورهای کلسیم خاک، pH خاک، رطوبت خاک و منیژیم خاک به عنوان مهم‌ترین فاکتورهای تاثیرگذار بر تنوع زیستی این موجودات توجه ویژه‌ای شده است.

## مبانی نظری و پیشینه

هدف این پژوهش بررسی رابطه میان ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک و تنوع زیستی حلزون‌ها در محدوده جغرافیایی جنگل‌های هیرکانی است. جنگل‌های هیرکانی یکی از سه ناحیه مهم رویشی ایران هستند که از سطح دریا تا ارتفاعات ۲۸۰۰ متر امتداد دارند و موقعیت جغرافیایی خاص این جنگل‌ها یعنی واقع شدن میان رشته‌کوه‌های البرز و دریای خزر سبب شده تا خصوصیات اقلیمی این منطقه بسیار متمایز از سایر بخش‌های ایران باشد. اقلیم منحصربه‌فرد این منطقه پوشش گیاهی و جانوری یگانه‌ای را برای این منطقه به ارمغان آورده و جوامع جنگلی مختلفی را به واسطه وجود ۸۰ گونه‌ی درخت و درختچه شامل می‌شود. این جنگل‌ها از مهم‌ترین بازمانده‌های جنگل‌های سنوزوئیک و پناهگاه گونه‌های باستانی متنوعی در آخرین دوره یخبندان بوده‌اند (Tarkhishvili et al, 2012; Dufresnes et al, 2016). جنگل‌های هیرکانی به عنوان یکی از مهم‌ترین زیستگاه‌های ایران به دلیل تنوع زیستی بالا و منحصر به فرد خود دارای اهمیت جهانی است به گونه‌ای که به عنوان میراث جهانی در سازمان در تاریخ ۱۴ تیرماه ۱۳۹۸ در سازمان یونسکو به ثبت رسیده است. تاکنون مطالعات اندکی بر روی تنوع زیستی حلزون‌های این منطقه صورت گرفته است و اطلاعاتی در زمینه ارتباط میان ویژگی‌های جوامع حلزون‌ها و فاکتورهای خاک این ناحیه وجود ندارد. به منظور بررسی این رابطه شش فاکتور pH خاک، کلسیم کل و کلسیم تبادل‌ی خاک و همچنین منیزیم کل و منیزیم تبادل‌ی و در نهایت رطوبت خاک به عنوان فاکتورهای اصلی تعیین کننده توزیع حلزون‌های خشکی‌زی با به کارگیری آنالیز مورد CCA بررسی قرار گرفتند. فرضیات این تحقیق عبارتند از: (۱) میان پارامترهای فیزیکوشیمیایی خاک و حضور حلزون‌ها ارتباط وجود دارد، (۲) با توجه به نیازهای زیستی حلزون رطوبت اشباع و کلسیم از تاثیرگذارترین پارامترها می‌باشند. بررسی ارتباط میان حضور گونه‌های مختلف یک زیستگاه و ویژگی‌های خاک آن منطقه می‌تواند به عنوان راهنمایی در بهبود وضعیت اکوسیستم‌های جنگلی عمل کند (Tavili and Jafari, 2009).

## روش‌شناسی

برای انجام این مطالعه در مجموع ۲۷ پلات نمونه‌برداری با ابعاد ۳ متر × ۳ متر در نه سایت مشخص شده به کار برده شد، به این ترتیب که در هر سایت سه پلات به صورت تصادفی در نواحی مختلف قرار داده شد. نمونه‌برداری از حلزون‌ها به صورت هپه‌زد<sup>۲</sup> صورت پذیرفت که یک روش نمونه‌گیری تصادفی است و نمونه‌بردار بدون هیچ جهت‌گیری و کاملاً تصادفی به جمع‌آوری نمونه‌ها می‌پردازد. نمونه‌های حلزون با استفاده از دست جمع‌آوری و حلزون‌ها پس از جمع‌آوری ابتدا به ظرف آب و پس از یک روز به ظرف حاوی الکل ۹۶٪ منتقل شدند. نمونه‌های خاک نیز با استفاده از بیلچه جمع‌آوری گردید به این ترتیب که خاک سطحی از مرکز هر پلات تا عمق ۱۰ سانتی‌متر جمع‌آوری شد و در کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌برداری در بهار سال ۱۴۰۰ و در سایت‌هایی با مساحت تقریبی ۱۰۰ متر مربع صورت پذیرفت. با توجه بالا بودن تعداد نمونه‌ها، به منظور جلوگیری از خطا در مراحل بعدی، کد مربوط به هر منطقه بلافاصله پس از نمونه‌برداری و در محل، بر روی ظرف‌های حاوی نمونه‌های حلزون و خاک نوشته شد.

### شناسایی حلزون‌ها و بررسی ویژگی جوامع آن‌ها

شناسایی حلزون‌ها با استفاده از روش بارکدینگ DNA صورت پذیرفت. بدین منظور ابتدا حلزون‌های جمع‌آوری شده براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و با کمک کلیدهای شناسایی معتبر موجود (Eliazian et al, 1979; Dourson and Dourson, 2006) به گروه‌های ریختی<sup>۳</sup> تقسیم و از هر گروه حداقل دو فرد به منظور مطالعات بارکدینگ انتخاب شدند. به منظور استخراج DNA نمونه‌های منتخب، از روش استاندارد نمکی (Sambrook et al, 1989) استفاده شد. پس از آن تکثیر ژن سیتوکروم اکسیداز زیر واحد I<sup>۴</sup> با استفاده از فرآیند واکنش زنجیره‌ای پلیمرز<sup>۵</sup> صورت پذیرفت. آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش شامل LCO 1490 و HCO 2198 (Folmer et al, 1994) و همچنین HCO 2198-JJ و LCO 1490-JJ (Astrin and Stuben, 2008) بوده‌اند. توالی‌های DNA به دست آمده از نمونه‌ها (کاروماتوگراف)<sup>۶</sup> با استفاده از

Geneious Prime v. 2022.1.1 (www.geneious.com) ویرایش شدند. هم‌ردیف‌سازی توالی‌های ویرایش شده با استفاده از نسخه تحت وب MAFFT صورت پذیرفت (Kato et al, 2002). فاصله ژنتیکی اصلاح نشده ( $p$ -distances) بین افراد با استفاده از نرم‌افزار MEGA11 محاسبه گردید (Tamura et al, 2021). در گام بعدی درخت تبارشناختی با استفاده از روش حداکثر احتمال (ML) با به کارگیری نرم‌افزار RAxML V. 8.2 با ۱۰۰۰ تکرار ترسیم شد. جهت مشخص نمودن تعداد واحدهای طبقه‌بندی عملیاتی (OTU) در مجموعه داده‌ها روش آماری bPTP<sup>۹</sup> مورد استفاده قرار گرفته است. تجزیه و تحلیل bPTP یک روش مبتنی بر درخت است که به یک درخت فیلوژنتیک غیر اولترامتریک است به عنوان ورودی نیاز دارد. این تجزیه و تحلیل با استفاده از وب سرور Species delimitation server (h-its.org) انجام و از درخت RAxML به عنوان ورودی درخت و شرایط پیش‌فرض وب سرور برای انجام این تجزیه و تحلیل استفاده شد. به منظور توصیف آماری جوامع مورد بررسی، مقادیر مربوط به فراوانی افراد (تعداد کل حلزون‌ها) و همچنین تنوع گونه‌ای (تعداد OTU) به تفکیک جنگل‌ها برای هر سایت مشخص و نمودارهای مربوط به هر ویژگی با استفاده از نرم‌افزار اکسل رسم شد. برای مقایسه فراوانی کل حلزون‌ها بین سه جنگل مورد بررسی، آنالیز ANOVA یک طرفه با استفاده از نرم‌افزار R و به کارگیری تابع "aov()" انجام شد.

#### محاسبه ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک

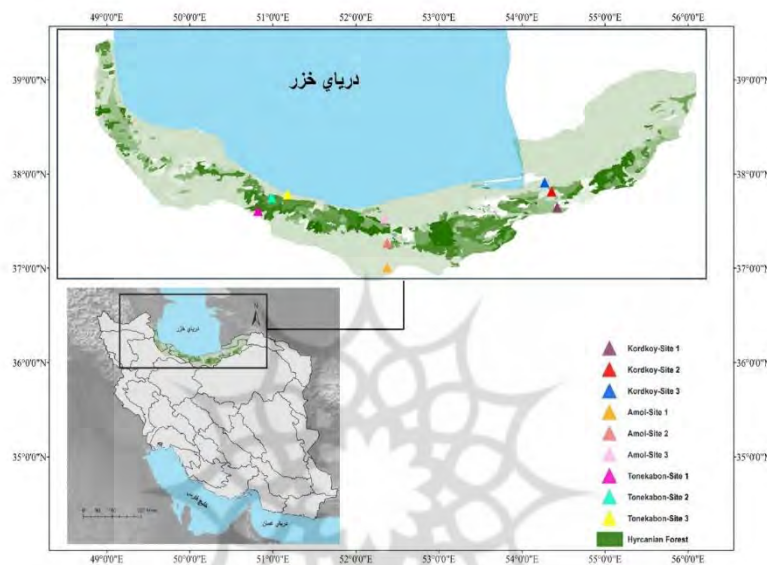
نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از سه پلات واقع در هر سایت با یکدیگر ترکیب<sup>۸</sup> شدند. یعنی برای هر سایت واقع در هر جنگل یک نمونه خاک تهیه شد (در مجموع نه نمونه خاک). جهت آماده‌سازی نمونه‌های خاک به منظور انجام آنالیزهای بعدی ابتدا تمامی آن‌ها در محیط آزمایشگاه (در دمای اتاق) قرار گرفتند تا خشک شوند. پس از ۲۴ ساعت خاک‌های خشک شده به صورت جداگانه کوبیده و از الک خاک شناسی با مش ۱۰ (۲ mm) عبور داده شدند. پس از آن هر کدام از نمونه‌ها در ظرف‌هایی که کد نمونه‌ها بر روی آن‌ها مشخص شده بود به موسسه جنگل‌ها و مراتع (تهران، ایران) ارسال و آنالیزهای مربوط به اندازه‌گیری pH، منیزیم، کلسیم، درصد منیزیم تبادلی، درصد کلسیم تبادلی و درصد رطوبت اشباع با استفاده از روش‌های استاندارد آزمایشگاهی صورت پذیرفت.

#### آنالیز خاک

ارزیابی تاثیر متغیرهای محیط زیست بر روی توزیع گونه‌ها بستگی به نوع متغیرهای اندازه‌گیری شده و نحوه آنالیز آن‌ها بستگی دارد (Potts et al, 2002). روش‌های مختلفی جهت آنالیز و مدل‌سازی تنوع زیستی در راستای متغیرهای محیطی وجود دارد. یکی از روش‌های مورد توجه در این زمینه آنالیز همبستگی کانونی (CCA)<sup>۹</sup> است. در این مطالعه جهت بررسی رابطه میان حلزون‌های خشکی‌زی و متغیرهای محیطی تجزیه و تحلیل CCA به عنوان یک رویکرد آماری چند متغیره به کار برده شد. قبل از انجام این آنالیز غربالگری اولیه داده‌های محیطی با استفاده از تجزیه و تحلیل مولفه اصلی (PCA)<sup>۱۰</sup> انجام شد. PCA با تبدیل داده‌ها به مجموعه‌ای از متغیرهای اصلی (PCs) ابعاد داده را کاهش می‌دهد. جهت انجام PCA از داده‌های مربوط به OTU های هر جنگل و شش متغیر خاک شامل pH، Ca، Mg، Ca<sup>++</sup>، Mg<sup>++</sup> و درصد رطوبت اشباع به عنوان داده‌های ورودی استفاده شد. کل تغییرات در داده‌های محیطی با شش مولفه اصلی (PCs) توضیح داده شد. متغیرهایی که بیشترین تاثیر را بر روی جوامع زیستی مورد بررسی داشتند با در نظر گرفتن بالاترین مقدار بار مطلق در هر PC شناسایی شدند. در نهایت پس از غربالگری، فاکتورهای اصلی برای آنالیز CCA انتخاب شدند. نتایج این آنالیز معمولاً به صورت نمودارهایی نمایش داده می‌شوند. این نمودارها نشان می‌دهند که چگونه متغیرهای محیطی مختلف با توزیع گونه‌ها در مکان‌های مختلف مرتبط هستند همچنین میزان همبستگی بین مجموعه متغیرها با "مقادیر ویژه"<sup>۱۱</sup> بیان می‌شود هر چه این مقادیر بالاتر باشد نشان‌دهنده همبستگی زیاد میان متغیرها می‌باش و بالعکس. این آنالیزها با استفاده از نرم‌افزار R V. 4.0.3 و به کارگیری بسته factoextra در این نرم‌افزار صورت پذیرفت.

### محدوده مورد مطالعه

محدوده جغرافیایی مورد مطالعه این پژوهش، واقع در جنگل‌های هیرکانی است. این جنگل‌ها از تالش در جنوب شرقی جمهوری آذربایجان تا نزدیکی گرگان در شمال شرقی ایران ادامه دارد و با دربرگرفتن سه استان مازندران، گیلان و گلستان و با مساحت تقریبی ۱/۸۵۰ میلیون هکتار، ۱۵٪ کل جنگل‌های ایران و ۱/۱٪ از مساحت کل کشور را شامل می‌شود (Sagheb Talebi et al, 2014). با بررسی‌های میدانی انجام شده سه ناحیه جنگلی مختلف در شهرهای کردکوی، آمل و تنکابن به عنوان نواحی نمونه‌برداری انتخاب شدند. نمونه‌برداری در هر جنگل در سه سایت مختلف در محدوده تقریبی ۱۷۰ متری تا ۱۶۰۰ متری از سطح دریا صورت پذیرفت. نه سایت نمونه‌برداری در شکل ۱ مشخص شده است.



شکل ۱: موقعیت جغرافیایی منطقه نمونه‌برداری

### یافته‌ها

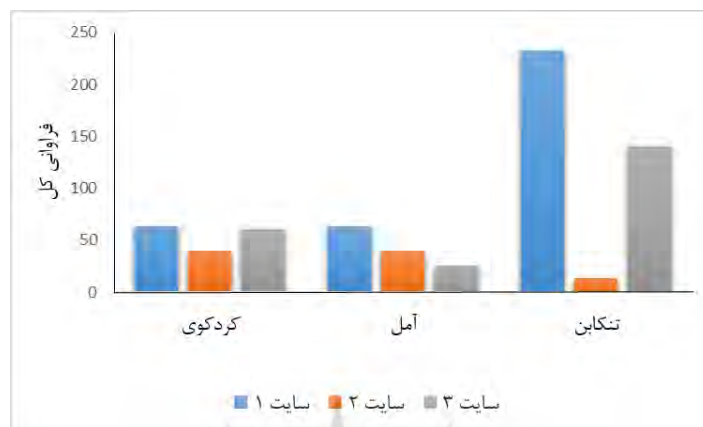
در مجموع تعداد ۶۷۹ عدد حلزون از ۲۷ پلات به کار برده شده در ایستگاه‌های نمونه‌برداری جمع‌آوری شد. در شناسایی اولیه‌ی نمونه‌ها براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی، حلزون‌های مورد مطالعه در ۱۶ گروه قرار گرفتند. نتایج درخت تبارشناختی و همچنین تعیین حدود گونه‌ای نشان داد که ۳۷ سکانس به دست آمده از مجموعه داده‌ها متعلق به ۱۰ واحد طبقه‌بندی عملیاتی (OTU) می‌باشند (جدول ۱). علاوه بر این نتایج مربوط به محاسبه فراوانی و همچنین تنوع زیستی هر سایت به صورت نمودار در شکل ۲ و ۳ نشان داده شده‌اند. نتایج آنالیز ANOVA بیانگر این بود که تفاوت مقادیر فراوانی کل حلزون‌ها میان جنگل‌ها معنی دار بوده است ( $F_{2,18} = 5/434, p = 0.0099$ ).

جدول ۱: گونه‌های شناسایی شده در منطقه مورد مطالعه

واحد طبقه‌بندی عملیاتی	خانواده	جنس	گونه
OTU 1	Cyclophoridae	<i>Caspicyclotus</i>	<i>Caspicyclotus sieversi</i>
OTU 2	Pomatidae	<i>Pomatias</i>	<i>Pomatias Rivulare</i>
OTU 3	Helicidae	<i>Caucasotachea</i>	<i>Caucasotachea Leuaranea</i>
OTU 4	Hygromiidae	<i>Pyrenaearia</i>	-
OTU 5	Hygromiidae	<i>Pyrenaearia</i>	-
OTU 6	Helicidae	<i>Theba</i>	-

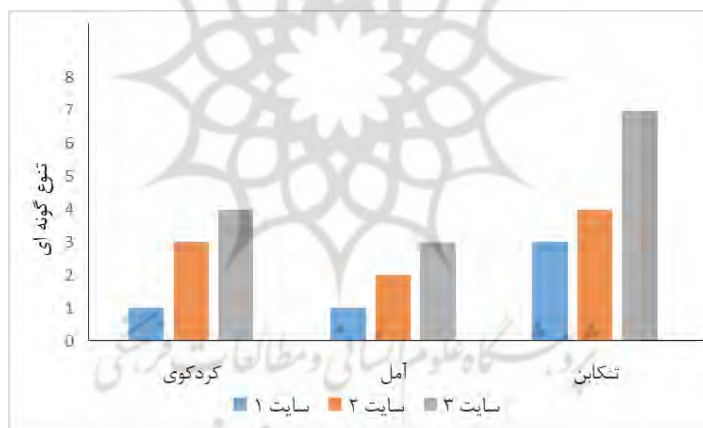
OTU 7	Hygromiidae	Dioscuria	-
OTU 8	Pupillidae	Pupilla	-
OTU 9	Orculidae	Schileykula	-
OTU 10	Oxychilidae	Oxychilus	Oxychilus filicum -

(ماخذ: یافته‌های پژوهش، ۱۴۰۱)



شکل ۲: نمودار فراوانی حلزون‌های خاکزی در مناطق نمونه‌برداری

(ماخذ: یافته‌های پژوهش، ۱۴۰۱)



شکل ۳: نمودار تنوع گونه‌های حلزون‌های خاکزی (تعداد OTU ها) در منطقه نمونه‌برداری

(ماخذ: یافته‌های پژوهش، ۱۴۰۱)

مقادیر مربوط به فاکتورهای فیزیکوشیمیایی خاک شامل pH،  $Mg^{++}$ ،  $Ca^{++}$ ، Mg، Ca و درصد رطوبت اشباع در جدول ۲ به تفکیک ایستگاه‌ها آمده است. طبق نتایج بدست آمده، محدوده مقادیر pH بین ۶/۱ در سایت یک جنگل کردکوی تا ۷/۷ در سایت یک جنگل تنکابن متغیر بوده است. بیشترین محتوی کلسیم خاک (۴۴ Mg / Lit) در سایت دو جنگل آمل و کمترین مقدار آن (۱۶ Mg / Lit) در سایت دو جنگل کردکوی ثبت شده است. مقدار کلسیم تبدلی نیز از ۶/۰۹ در سایت یک جنگل تنکابن تا ۰/۷۹ در سایت دو همین جنگل مشاهده شده است. سایت دو جنگل کردکوی بیشترین مقدار منیزیم (۴۴ Mg / Lit) را داشته و کمترین مقدار این فاکتور در سایت یک جنگل تنکابن و همچنین سایت یک جنگل آمل ثبت شده است که برابر با ۴ Mg / Lit بوده است. بالاترین مقدار منیزیم تبدلی نیز در سایت یک تنکابن (۲/۲۱) و کمترین مقدار آن (۰/۴۹) در سایت سه جنگل آمل مشاهده شده و در نهایت بالاترین مقدار درصد رطوبت



اشباع برابر با ۹۵ بوده است که در سایت سه جنگل تنکابن به ثبت رسیده و کمترین مقدار این فاکتور که برابر با ۵۱/۹ بوده نیز در سایت دو همین جنگل ثبت شده است.

جدول ۲: مقادیر مربوط به فاکتورهای فیزیکی شیمیایی خاک

درصد رطوبت اشباع	Mg <sup>++</sup>	Ca <sup>++</sup>	Mg (mg/lit)	Ca (mg/lit)	pH	ایستگاه
۶۸/۳	۰/۸۶	۱/۴۵	۱۴	۳۰	۶/۱	جنگل کردکوی - سایت ۱
۷۵/۹	۰/۸۷	۱/۳۵	۴۴	۱۶	۶/۳	جنگل کردکوی - سایت ۲
۸۶/۴	۰/۹۷	۲/۰۳	۳۸	۲۴	۶/۴	جنگل کردکوی - سایت ۳
۷۹/۱	۰/۹۴	۶/۷	۴	۴۲	۷/۵	جنگل آمل - سایت ۱
۹۰	۰/۷۸	۲/۱۴	۱۴	۴۴	۷/۱	جنگل آمل - سایت ۲
۵۷/۹	۰/۴۹	۱/۱۶	۲۰	۲۰	۶/۴	جنگل آمل - سایت ۳
۵۶/۱	۲/۲۱	۶/۰۹	۴	۳۴	۷/۷	جنگل تنکابن - سایت ۱
۵۱/۹	۰/۵۹	۰/۷۹	۲۰	۲۰	۷/۱	جنگل تنکابن - سایت ۲
۹۵	۰/۸۱	۲/۲۷	۲۲	۳۴	۶/۳	جنگل تنکابن - سایت ۳

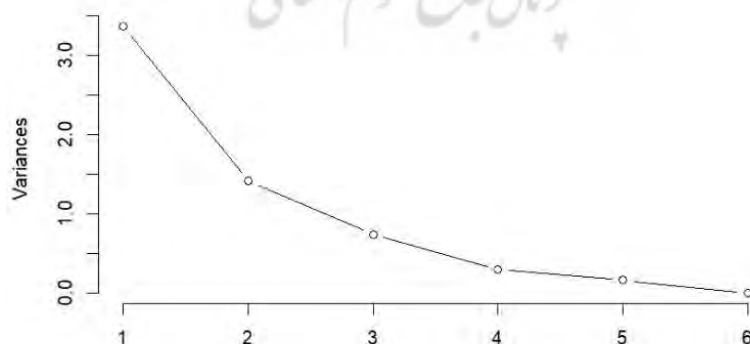
(ماخذ: یافته‌های پژوهش، ۱۴۰۱)

به منظور مشخص نمودن مهم‌ترین فاکتورهای فیزیکوشیمیایی مسئول در شکل‌دهی جوامع حلزون در نواحی مورد بررسی آنالیز PCA به کار برده شد. نتایج این آنالیز که در جدول ۳ نشان داده شده بیانگر این است که دو مولفه اول از شش مولفه اصلی ایجاد شده یعنی PC1 و PC2 با بیشترین واریانس مسئول حدود ۸۰ درصد از تغییرات بودند (شکل ۴). همچنین در مجموع سه فاکتور کلسیم کل، منیزیم کل و درصد رطوبت اشباع نقش مهمی بر روی فراوانی و تنوع جوامع حلزون‌های مورد مطالعه داشتند. نقش این سه فاکتور در واریانس مشاهده شده در مولفه اول و دوم در جدول ۴ نشان داده شده است.

جدول ۳: نتایج آنالیز مولفه‌های اصلی

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
واریانس	1.83	0.92	0.86	0.54	0.4	0.08
نسبت واریانس	0.56	0.23	0.12	0.04	0.02	0.001
واریانس تجمعی	0.56	0.79	0.92	0.97	0.99	1

(ماخذ: یافته‌های پژوهش، ۱۴۰۱)



شکل ۴: نمودار مربوط به نتایج آنالیز مولفه اصلی

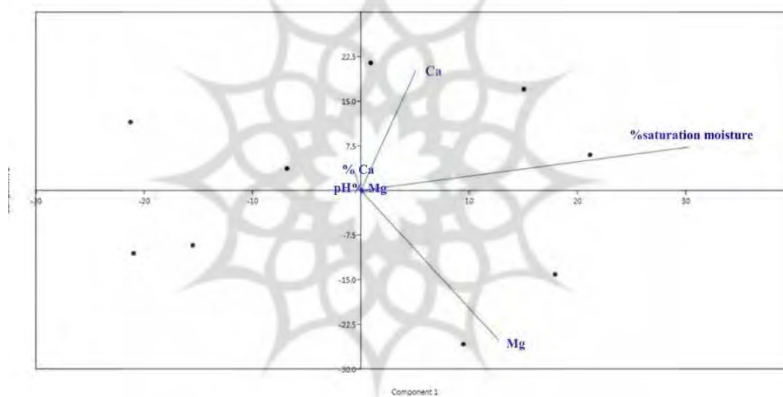
(ماخذ: یافته‌های پژوهش، ۱۴۰۱)

جدول ۴: مهم ترین متغیرها در توجیه واریانس مولفه های اصلی اول و دوم

متغیر (ویژگی خاک)	وزن (PC1)	وزن (PC2)
کلسیم	0.49	0.05
منیزیم	0.38	-0.22
درصد رطوبت اشباع	-0.05	0.80

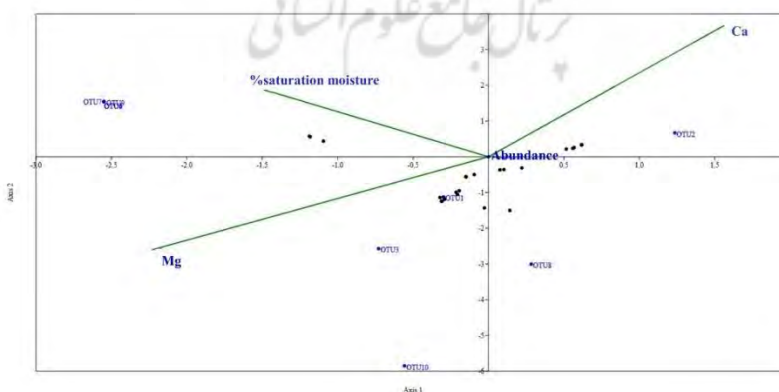
(ماخذ: یافته های پژوهش، ۱۴۰۱)

جهت بیان دقیق تر ارتباط موجود میان حلزون های خشکی زی و فاکتورهای خاک با به کارگیری مولفه های اصلی نمودار همبستگی آماده شد (شکل ۵) این نمودار نشان دهنده مقادیر ویژه مرتبط با هر یک از اجزا اصلی است که محور افقی آن نشان دهنده وزن اجزا اصلی و محور عمودی نشان دهنده اهمیت میزان واریانس داده در هر جز اصلی است. در این نمودار متغیرهایی که از مرکز نمودار دور تر می باشند تاثیر و اهمیت بیشتری دارند. همان طور که در این نمودار مشخص است سه فاکتور میزان کلسیم کل، میزان منیزیم کل و درصد رطوبت اشباع فاصله بیشتری از مرکز نمودار دارند و سه فاکتور دیگر بسیار نزدیک به مرکز نمودار می باشند. آنالیز CCA با استفاده از سه پارامتر ذکر شده انجام شد و همانطور که در شکل ۶ نشان داده شده سه فاکتور کلسیم کل، منیزیم کل و درصد رطوبت اشباع رابطه مثبتی را با اکثر OTU ها و همچنین فراوانی حلزون ها داشتند. در این نمودار طول هر بردار نشان دهنده اهمیت آن و زاویه میان آن ها نشان دهنده همبستگی میان آن ها است. مقادیر ویژه برای محورهای یک و دو به ترتیب ۰/۳۷۴ و ۰/۲۰۲ بوده است.



شکل ۵: نمودار همبستگی میان متغیرهای خاک

(ماخذ: یافته های پژوهش، ۱۴۰۱)



شکل ۶: نتایج آنالیز CCA ارتباط میان متغیرهای خاک و ساختار جوامع حلزون های خشکی زی

(ماخذ: یافته های پژوهش، ۱۴۰۱)

## بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش به بررسی رابطه میان تنوع زیستی حلزون‌های خشکی‌زی و برخی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک در جنگل‌های هیرکانی واقع در شمال ایران پرداخته شده است. شناسایی گونه‌ها به منظور ارزیابی تنوع زیستی با تکیه بر روش بارکدینگ DNA صورت پذیرفته است. پارامترهای فیزیکوشیمیایی خاک مورد بررسی شامل کلسیم، منیزیم، کلسیم تبادل، منیزیم تبادل، درصد رطوبت اشباع و pH خاک بودند که در تحقیقات پیشین انجام شده در این زمینه به عنوان فاکتورهای مهم تاثیرگذار در تنوع و فراوانی حلزون‌ها شناخته شده‌اند. آنالیزهای به کار گرفته شده جهت بررسی این ارتباط آنالیزهای CCA و PCA بوده‌اند. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل مولفه اصلی (PCA) نشان داد که از میان شش فاکتور مورد بررسی میان فراوانی و تنوع زیستی حلزون‌ها و سه فاکتور کلسیم، منیزیم و درصد رطوبت اشباع ارتباط زیادی وجود داشت. همچنین نتایج CCA بیانگر ارتباط مثبت میان این فاکتورها و فراوانی و همچنین حضور اکثر گونه‌های شناسایی شده در این پژوهش بوده است. این نتیجه هم‌راستا با فرضیات این تحقیق بوده است زیرا این فاکتورهای محیط زیست نقشی حیاتی را در شکل‌دهی توزیع و تنوع زیستی حلزون‌های خشکی‌زی ایفا می‌کنند. نیاز این موجودات به کلسیم و منیزیم جهت بازسازی پوسته‌نیازی اساسی است. تحقیقات نشان داده محتوی آلی سطح خاک به عنوان فاکتوری مهم در تنوع زیستی و فراوانی گونه‌های جنگلی عمل می‌کند. مارتین و سومر (Martin and Sommer 2004) در مطالعه‌ای که در جنوب غربی آلمان انجام دادند بیان کردند که رابطه مثبتی میان محتوی کلسیم خاک و تراکم و غنای گونه‌ای حلزون‌ها وجود داشته است. هاتپاپ (Hotopp, 2002) در مطالعه‌ای که در مرلند آمریکا انجام داد بیان داشت ارتباط معنی‌داری میان کلسیم کل و کلسیم تبادل در افق سطحی خاک و حضور حلزون‌ها وجود دارد. نتایج مطالعه سبکا و هامرلیک (Cejka and Hamerlik, 2010) که در جنوب غربی اسلواکی انجام شده نیز بیانگر رابطه مثبت میان حضور حلزون‌ها و کلسیم خاک بوده است. رطوبت خاک عامل مهم دیگری است که در تنوع زیستی منطقه‌ای فون حلزون‌ها نقش اساسی دارد. یکی از عوامل مهم تاثیرگذار در تفاوت مشاهده شده در غنا و تراکم حلزون‌ها در ایستگاه‌های مختلف رطوبت خاک است و مناطق با خاک مرطوب‌تر زیستگاه‌های مطلوب‌تری را برای حلزون‌ها فراهم می‌کنند. مطالعات دیگری نیز رابطه مثبت میان غنای گونه‌ای و فراوانی حلزون‌ها و رطوبت خاک را بیان داشته‌اند (Horsak, 2006; Martin and Sommer 2004). اگرچه مطالعاتی فاکتور pH را از عوامل مهم تاثیرگذار در توزیع حلزون‌ها معرفی کرده‌اند (تاجیک و همکاران، ۱۳۹۶؛ Martin and Sommer, 2004) اما در این پژوهش ارتباط معنی‌داری میان این فاکتور و حضور حلزون‌ها مشاهده نشده است. یکی از دلایل این امر می‌تواند این نکته باشد که مقادیر pH در محدوده مورد مطالعه بسیار بازی یا بسیار اسیدی گزارش نشده است و در محدوده تقریبی ۶ تا ۸ متغیر بوده است که این مقدار به محدوده pH خنثی نزدیک‌تر است. در واقع می‌توان اینگونه بیان کرد که تغییرات اندک در pH خاک تفاوت معنی‌داری در فراوانی و تنوع حلزون‌ها ایجاد نمی‌کند. دو فاکتور کلسیم تبادل و منیزیم تبادل در مطالعاتی به عنوان عوامل تاثیرگذار بر روی حضور حلزون‌ها در یک زیستگاه بیان شده‌اند (Gomot et al, 1989; Ondina et al, 1998; Hotpop, 2002). در نتیجه در این مطالعه برای بررسی این موضوع که آیا این دو فاکتور نیز به اندازه کلسیم و منیزیم کل بر توزیع حلزون‌ها تاثیرگذارند مورد محاسبه و تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. اما نتایج، ارتباطی را میان این فاکتورها و OTU ها نشان نداد. یکی از دلایل هم‌راستا نبودن نتایج این پژوهش با مطالعات پیشین می‌تواند تفاوت در ترکیب جمعیتی حلزون‌ها و تنوع گونه‌ای آن‌ها میان مناطق مختلف باشد. زیرا برخی گونه‌ها به‌طور خاص به برخی فاکتورهای فیزیکوشیمیایی خاک وابستگی بیشتری دارند. همانطور که در نتایج مربوط به آنالیز CCA در این پژوهش نیز نشان داده شده است گونه‌های مختلف روابط یکسانی با پارامترهای خاک ندارند. به عنوان مثال حضور 2 OTU بیشتر تحت تاثیر کلسیم کل است در صورتی که 3 OTU 1 بیشتر تحت تاثیر محتوی منیزیم خاک بودند. علاوه بر این خصوصیات جغرافیایی و اقلیمی منطقه مورد پژوهش یکی دیگر از دلایلی است که می‌تواند تاثیرات قابل توجهی بر روی نتایج به دست آمده داشته باشد. مناطق مورد مطالعه در هیچ کدام از مطالعات ذکر شده در بالا نواحی جنگلی نبوده‌اند. جنگل‌ها و مناطق غیر جنگلی دارای تفاوت‌های

بارز در شرایط نور، رطوبت، دما و سایر عوامل محیطی هستند که ممکن است بر زندگی حلزون‌ها و ویژگی‌های خاک تأثیر بگذارد. ارتباط میان تنوع و فراوانی حلزون‌های خشکی‌زی و فاکتورهای فیزیکوشیمیایی خاک در مطالعات مختلفی در قسمت‌های مختلف دنیا مورد بررسی قرار گرفته است (Ondina et al, 1998; Martin and Sommer, 2004; Horskak, 2006). اما اطلاعاتی در این زمینه در مورد جنگل‌های هیرکانی ایران وجود نداشته است. در این پژوهش با در نظر گرفتن چند فاکتور کلیدی رابطه میان ویژگی‌های خاک و جامعه حلزون‌ها در بخش‌هایی از جنگل‌های هیرکانی مورد بررسی قرار گرفت و به ارائه یک ارزیابی پایه در مورد این ارتباط منتج شد. پیشنهاد می‌شود با بررسی فاکتورهای بیشتری نظیر بافت خاک و همچنین در نظر گرفتن اثر ترکیبی فاکتورهای فیزیکوشیمیایی خاک و سایر متغیرهای محیطی نظیر ارتفاع و توپوگرافی اطلاعات جامع‌تری در این زمینه جمع‌آوری گردد. همچنین از آنجایی که هرگونه ممکن است واکنش متفاوتی نسبت به متغیرهای مختلف محیط زیست داشته باشد می‌توان رابطه میان این متغیرها را به تفکیک، با گونه‌هایی منتخب، که پراکنش بیشتری در این ناحیه دارند مورد بررسی قرار داد. اطلاعاتی از این دست علاوه بر اینکه در زمینه مدیریت این جنگل منحصربه‌فرد از نظر تنوع زیستی و حفظ این اکوسیستم راهگشا است می‌تواند منجر به دست‌یابی به اطلاعات مفیدی شود که به توسعه یک شاخص زیستی بومی سازی شده بر پایه حلزون‌های خشکی‌زی ناحیه هیرکانی کمک کند.

## سپاسگزاری

بدین وسیله از خانم مریم عظیمی و تمامی استادان و عزیزانی که در مراحل مختلف این تحقیق همکاری داشته‌اند، تشکر می‌شود.

## پی نوشت

- 1- Ripple effect
- 2- Haphazard
- 3- Morphospecies
- 4- Cytochrome oxidase I (COI)
- 5- Polymerase chain reaction (PCR)
- 6- Chromatograph
- 7- Bayesian poisson tree processes model
- 8- Pool
- 9- Canonical correlation analysis
- 10- Principal component analysis
- 11- Eigenvalues

## حامی مالی

بنا به اظهار نویسنده مسئول، این مقاله حامی مالی نداشته است.

## سهام نویسندگان در پژوهش

همه نویسندگان، در بخش‌های نگارش و تنظیم مقاله حاضر نقش و سهم برابر دارند.

## تضاد منافع

نویسنده (نویسندگان) اعلام می‌دارند که هیچ تضاد منافی در رابطه با نویسندگی و یا انتشار این مقاله ندارند.

## منابع

تاجیک، س.، ایوبی، ش.، درویشی، م. و خادمی، ح.، ۱۳۹۶. ارتباط بین فراوانی حلزون‌های خاکریز با ویژگی‌های خاک و توپوگرافی در خاک‌های جنگلی، پانزدهمین کنگره علوم خاک ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان، <https://civilica.com/doc/729937>

- Astrin, J.J. and Stuben, P.E., 2008. Phylogeny in cryptic weevils: molecules, morphology and new genera of western Palaearctic Cryptorhynchinae (Coleoptera: Curculionidae), *Invertebrate systematics*: 22(5), 503-522, DOI: 10.1071/IS07057
- Cejka, T. and Hamerlik, L., 2009. Land snails as indicators of soil humidity in Danubian woodland (SW Slovakia). *Polish Journal of Ecology*: 57(4), 741-747, Online ISSN: 2450-1395.
- Corsmann, M., 1990. Die Schneckengemeinschaft (Gastropoda) eines Laubwaldes: Populations dynamik, Verteilungsmustern und Nahrungsbiologie. *Berichte des Forschungszentrums Waldokosysteme Press, Reihe A*, 208 p.
- 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, <https://doi.org/10.1186/s12862-019-1566-1>.
- 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. Goatslug Publications, 344 p.
- Dufresnes, C., Litvinchuk, S.N., Leuenberger, J., Ghali, K., Zinenko, O., Stock, M. and Perrin, N., 2016. Evolutionary melting pots: a biodiversity hotspot shaped by ring diversifications around the Black Sea in the Eastern tree frog (*Hyla orientalis*), *Molecular Ecology*: 25(17), 4285-4300, <https://doi.org/10.1111/mec.13706>.
- 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.
- 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.
- Gomot, A., Gomot, L., Boukraa, S. and Bruckert, S., 1989. Influence of soil on the growth of the land snail *Helix aspersa*. An experimental study of the absorption route for the stimulating factors, *Journal of Molluscan Studies*: 55(1), 1-7, <https://doi.org/10.1093/mollus/55.1.1>.
- Harms, K.E., Condit, R., Hubbell, S.P. and Foster, R.B., 2001. Habitat associations of trees and shrubs in a 50- ha neotropical forest plot. *Journal of Ecology*: 89(6), 947-959, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2001.00615.x>.
- Horsak, M., 2006. Mollusk community patterns and species response curves along a mineral richness gradient: a case study in fens, *Journal of Biogeography*: 33(1), 98-107, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2005.01359.x>.
- Hotopp, K.P., 2002. Land snails and soil calcium in central Appalachian Mountain forest, Southeastern Naturalist: 1(1), 27-44. [https://doi.org/10.1656/1528-7092\(2002\)001\[0027:LSASCI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1656/1528-7092(2002)001[0027:LSASCI]2.0.CO;2).
- Jafari, M., Chahouki, M.Z., Tavili, A., Azarnivand, H. and Amiri, G.Z., 2004. Effective environmental factors in the distribution of vegetation types in Poshtkouh rangelands of Yazd Province (Iran), *Journal of Arid Environments*: 56(4), 627-641, [https://doi.org/10.1016/S0140-1963\(03\)00077-6](https://doi.org/10.1016/S0140-1963(03)00077-6).
- Jafarian Jeloudar, Z., Jafari, M., Arzani, H., Kaviani, A., Zahedi, G. and Azarivand, H., 2010. Vegetation community in relation to the soil characteristics of Rineh rangeland, Iran, *Caspian journal of environmental sciences*: 8(2), 141-150.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K.I. and Miyata, T., 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic acids research*: 30(14), 3059-3066.
- Kessler, M., 2000. Elevational gradients in species richness and endemism of selected plant groups in the central Bolivian Andes, *Plant ecology*: 149(2), 181-193., <https://doi.org/10.1023/A:1026500710274>.
- Mand, R., Tilgar, V. and Leivits, A., 2000. Calcium, snails, and birds: a case study, *Web Ecology*, 1(1), 63-69. <https://doi.org/10.5194/we-1-63-2000>.
- Martin, K. and Sommer, M., 2004. Relationships between land snail assemblage patterns and soil properties in temperate- humid forest ecosystems, *Journal of Biogeography*: 31(4), 531-545, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2003.01005.x>.
- Millar, A.J. and Waite, S., 2002. The relationship between snails, soil factors and calcitic earthworm granules in a coppice woodland in Sussex, *Journal of Conchology*: 37(5), 483-504.
- Nekola, J.C. and Smith, T.M., 2000. Terrestrial gastropod richness patterns in Wisconsin carbonate cliff communities, *MALACOLOGIA-PHILADELPHIA*: 41(1), 253-270.
- Nunes, G.K.M. and Santos, S.D., 2012. Environmental factors affecting the distribution of land snails in the Atlantic Rain Forest of Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*: 72, 79-86.

- Ondina, P., Mato, S., Hermida, J. and Outeiro, A., 1998. Importance of soil exchangeable cations and aluminium content on land snail distribution. *Applied Soil Ecology*: 9(1-3), 229-232, [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(98\)00080-8](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(98)00080-8).
- Potts, M.D., Ashton, P.S., Kaufman, L.S. and Plotkin, J.B., 2002. Habitat patterns in tropical rain forests: a comparison of 105 plots in northwest Borneo, *Ecology*: 83(10), 2782-2797. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2002\)083\[2782:HPITRF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2002)083[2782:HPITRF]2.0.CO;2).
- Ramsay, S.L. and Houston, D.C., 1999. Do acid rain and calcium supply limit eggshell formation for blue tits (*Parus caeruleus*) in the UK, *Journal of Zoology*: 247(1), 121-125, <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1999.tb00199.x>.
- Rull, V., Vegas-Villarubia, T., Huber, O. and Senaris, C., 2019. Biodiversity of Pantepui: The Pristine "Lost World" of the Neotropical Guiana Highlands, Academic Press.
- Sagheb Talebi, K., Sajedi, T. and Pourhashemi, M., 2014. Forests of Iran: A Treasure from the Past, a Hope for the Future, Springer Netherlands Press, <https://doi.org/10.1007/978-94-007-7371-4>
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual (No. Ed. 2). Cold Spring Harbor Laboratory press: 2100 p.
- Tamura, K., Stecher, G. and Kumar, S., 2021. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11, *Molecular biology and evolution*: 38(7), 3022-3027.
- Tarkhishvili, D., Gavashelishvili, A. and Mumladze, L., 2012. Palaeoclimatic models help to understand current distribution of Caucasian forest species. *Biological Journal of the Linnean Society*: 105(1), 231-248, <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2011.01788.x>.
- Tavili, A. and Jafari, M., 2009. Interrelations between plants and environmental variables, *Int. J. Environ. Res*: 3(2), 239-246, 10.22059/IJER.2009.51.
- Toledo, M., Pena Claros, M., Bongers, F., Alarcon, A., Balcazar, J., Chuvina, J. and Poorter, L., 2012. Distribution patterns of tropical woody species in response to climatic and edaphic gradients, *Journal of Ecology*: 100(1), 253-263., <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2011.01890.x>

