



بررسی جوامع کرم‌های خاکی در مناطق طبیعی و دست کاشت جنگل‌های هیرکانی؛ رویکرد حفاظتی

ریحانه صابری پیروز*^۱، فراهم احمدزاده^۱

^۱* - گروه تنوع زیستی و مدیریت اکوسیستم‌ها، پژوهشکده علوم محیطی، دانشگاه شهیدبهشتی، تهران، ایران

نوع مقاله:	چکیده
پژوهشی	<p>مقدمه: جنگل‌های هیرکانی، زیستگاهی با رویش باستانی از درختان پهن‌برگ هستند که در امتداد دامنه‌های شمالی رشته‌کوه البرز و نزدیک مرزهای جنوبی دریای خزر گسترش یافته‌اند. امروزه، فعالیت‌های انسانی تأثیر بسزایی در کاهش پوشش جنگلی داشته است. علاوه بر این شناسایی تنوع گونه‌ای، ساختار جنگل و دستکاری‌های انسانی در جنگل‌های هیرکانی کم‌تر مورد توجه قرار گرفته است. بی‌مهرگان بزرگ جزء اصلی تنوع زیستی خاک در جنگل‌ها هستند. کرم‌های خاکی یکی از اجزای اصلی تنوع زیستی خاک جنگل‌ها بوده و یکی از با ارزش‌ترین شاخص‌های سلامت خاک و جزء حیاتی فون خاک هستند. با این حال، مطالعه آن‌ها بر اساس ویژگی‌های ریختی چالش‌های زیادی را به همراه دارد. بارکدینگ DNA یک روش مفید است که به طور گسترده برای مطالعه تنوع زیستی استفاده شده است. بنابراین، هدف از این مطالعه استفاده از رویکردهای مولکولی برای شناسایی کرم‌های خاکی و تنوع آن‌ها و مقایسه جوامع این جانوران بین جنگل‌های طبیعی و دست کاشت در منطقه هیرکانی است.</p> <p>مواد و روش‌ها: این مطالعه در بخش مرکزی جنگل هیرکانی و در سه منطقه، انجام شده است. به طور کلی، در هر منطقه، دو ناحیه دست کاشت و دو ناحیه طبیعی انتخاب شده است. در هر ناحیه، شش کودرات به صورت تصادفی در محیط قرار گرفته‌اند. به منظور، مطالعات ژنتیکی و نگهداری طولانی مدت، نمونه‌ها در اتانول ۹۶ درصد نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی، طبقه‌بندی شدند. در مجموع در این مطالعه، ۲۵۱ نمونه جمع‌آوری شده و ۲۲ فرد برای مطالعات ژنتیکی انتخاب شده است. مطالعات مولکولی، با استفاده از ژن سیتوکروم c اکسیداز زیر واحد یک (COI) انجام شد. سپس آنالیزهای آماری تک متغییره و چند متغییره برای بررسی تنوع کرم‌های خاکی و مقایسه جوامع آن‌ها، بین ناحیه دست کاشت و طبیعی انجام شدند.</p> <p>نتایج: براساس مطالعات ژنتیکی، ۱۵ واحد تاکسونومیک در این بررسی شناسایی شده‌اند. یافته‌های این پژوهش بیانگر این است که تعداد و تنوع OTUها در نواحی طبیعی و دست کاشت تقریباً یکسان است. نتایج آنالیزهای آماری تک متغییره و آنالیز چندمتغییره، تفاوت معنی‌داری را برای کرم‌های خاکی بین دو ناحیه طبیعی و دست کاشت نشان نداد.</p> <p>بحث: این مطالعه نشان می‌دهد که استفاده از بارکدینگ DNA نتایج دقیق‌تری را ارائه می‌دهد، اما برای طبقه‌بندی دقیق‌تر نیاز به یک کتابخانه جامع مرجع DNA وجود دارد. با توجه به عدم معناداری تفاوت</p>
تاریخچه مقاله:	
دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۲۴	
پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۲۲	
کلمات کلیدی:	
کرم‌های خاکی	
جنگل‌های هیرکانی	
بارکدینگ	
واحد تاکسونومیک	

کرم‌های خاکی، بین جنگل‌های طبیعی و دست‌کاشت و معناداری این تفاوت بین سه منطقه مورد مطالعه، این‌طور نتیجه‌گیری می‌شود که وابستگی کرم‌های خاکی به جنگل‌های دست‌کاشت بسته به ویژگی‌های خاص جنگل‌های دست‌کاشت، شرایط خاک و شیوه‌های مدیریتی می‌تواند متفاوت باشد. علاوه بر این، این نتیجه می‌تواند نشان‌دهنده آن باشد که کرم‌های خاکی توانایی بالایی در سازگاری با طیف وسیعی از محیط‌ها دارند. به‌طور کلی پیش‌بینی می‌شود که در جنگل‌های ثانویه که بیش از ۲۰ سال کاشته شده‌اند، جنگل زمان کافی برای ترمیم جمعیت‌های خود، به‌ویژه کرم‌های خاکی، داشته باشد. به‌طور کلی، مطالعه‌ی فعالیت‌ها و تعاملات بین کرم‌های خاکی و جنگل‌های دست‌کاشت می‌تواند دانش ما را درباره سلامت خاک، چرخه مواد مغذی و عملکرد اکوسیستم در این مناطق افزایش دهد و زمینه را برای مدیریت صحیح اکوسیستم‌های جنگلی، به‌ویژه جنگل‌های هیرکانی که از قدمت و اهمیت بالایی برخوردار هستند، فراهم آورد.

مقدمه

جنگل‌ها در سرتاسر جهان در ده‌های اخیر به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافته‌اند. بسیاری از جنگل‌های طبیعی به دلیل تغییر کاربری و وجود گونه‌های مهاجم یا غیربومی به شدت تغییر کرده‌اند (Da Silva *et al.*, 2019). جنگل زدایی و بدنبال آن کاشت مجدد درختان، اکولوژی خاک را تغییر داده و تعادل گروه‌های عملکردی جانوران خاک‌زی و جوامع مهندسی را بر هم می‌زند (Lavelle *et al.*, 1667). و منجر به از دست دادن تنوع‌زیستی می‌شود (Wilson *et al.*, 1998). بزرگ‌بی‌مهرگان بخش مهمی از فون خاک را در اکوسیستم‌های جنگلی تشکیل می‌دهند و ۲۵ درصد از گونه‌های توصیف شده را در بر می‌گیرند (Desaens *et al.*, 2006; Coleman & Wall, 2015). حتی عدم وجود یک گونه می‌تواند بر توانایی عملکردی خاک تأثیر بگذارد و باعث ایجاد اثرات آبشاری در اکوسیستم خاک شود. از میان بی‌مهرگان خاک، کرم‌های خاکی، نقش مهمی در عملکرد خاک دارند (Edwards, 2004). و بر مکانیسم، ساختار، بافت خاک و تخلخل آن تأثیر گذارند (Brown *et al.*, 2004; Blouin *et al.*, 2013). آن‌ها یکی از ارزش‌ترین شاخص‌های سلامت خاک و جزء حیاتی فون خاک هستند (Decaens & Jimenez, 2002). علاوه بر این، این گروه تأثیر مستقیمی بر تنظیم سیل، آب و هوا و تصفیه آب و عملکردهای اکولوژیک خاک دارند (Manuel Blouin *et al.*, 2013). همچنین آن‌ها به پویایی مواد مغذی خاک و چرخه آن کمک می‌کنند (Brussaard *et al.*, 2007). با این وجود، مطالعه و شناسایی آن‌ها با استفاده از روش‌های سنتی

ریخت‌شناسی با چالش‌هایی روبرو است. شناسایی کرم‌های خاکی به وسیله‌ی ریخت‌شناسی زمان بر می‌باشد و علاوه بر این، این روش‌ها بیشتر برای شناسایی کرم‌های بالغ کاربرد دارد و کرم‌ها در باقی مراحل زندگی ناشناخته باقی می‌مانند (Huang *et al.*, 2007; Nouri-Aiin *et al.*, 2021). همچنین از آن‌جا که سیستم‌های طبقه‌بندی بر اساس صفات ظاهری بسیار متفاوت هستند، پژوهشگران برای انتخاب سیستم مورد نظر جهت شناسایی کرم‌های خاکی اتفاق نظر ندارند. بنابراین شناسایی آن‌ها را در اکثر مراحل زندگی دشوار است (Pop *et al.*, 2007). بارکدینگ DNA یک روش مفید است که به‌طور گسترده برای مطالعه تنوع‌زیستی استفاده شده است (Hebert *et al.*, 2003; Hajibabaei *et al.*, 2006; Barrett & Hebert, 2005). این روش ابزار قدرتمندی برای شناسایی دقیق کرم‌های خاکی با استفاده از پروتکل‌های مولکولی استاندارد است (Hussain *et al.*, 2022; Ganesan *et al.*, 2023). این فناوری یک روش جدید برای حل مشکلات طبقه‌بندی و شناسایی کرم‌های خاکی و تشخیص تنوع رموز آن‌ها است (Rougerie *et al.*, 2009; Maggia *et al.*, 2021). همچنین به‌وسیله‌ی آن می‌توان کرم‌های خاکی را در هر یک از مراحل زندگی، با دقت بالا شناسایی کرد. با این وجود، به دلیل پوشش کم توالی در پایگاه‌های داده‌های ژنتیکی در مورد برخی از گروه‌های جانوری و مناطق جغرافیایی (Meiklejohn *et al.*, 2019; Kennedy *et al.*, 2020). هنوز شناسایی نمونه‌های کرم‌های خاکی چالش برانگیز است (Andjelic Dmitrovic *et al.*, 2022).

ممرز اروپایی، افرای مخملی، افرا کاپادوکیا، توسکا و بلوط قفقازی است. از سال ۱۹۵۰، سطح جنگل‌های هیرکانی به طور قابل توجهی کاهش یافته است که حدود ۳۲/۷ درصد یا یک سوم مساحت جنگل را تشکیل می‌دهد. بدیهی است که فعالیت‌های انسانی تأثیر بسزایی در کاهش پوشش جنگلی داشته است (Tohidifar *et al.*, 2016; Saberi-Pirooz *et al.*, 2024). علاوه بر این، شناسایی تنوع‌زیستی، ساختار جنگل و دستکاری‌های انسانی در جنگل‌های هیرکانی کم‌تر مورد توجه قرار گرفته است. به‌طور کلی، با توجه به افزایش نرخ بریدن درخت‌ها و بهره‌برداری بیش از حد از جنگل‌های هیرکانی، مطالعه اجزای جنگل و روابط آن‌ها در کنار بررسی اثرات دستکاری‌های انسانی یک نیاز اساسی برای مدیریت کارآمد و حفاظت از این اکوسیستم منحصر به فرد است (Jafari *et al.*, 2013). براین اساس، داشتن فهرستی جامع از گونه‌های آن به عنوان ابزاری کاربردی برای ارزیابی تنوع‌زیستی ضروری است. تاکنون بیشتر مطالعاتی که روی کرم‌های خاکی در ایران انجام شده، تنها به شناسایی آن‌ها از طریق ریخت‌شناسی متمرکز شده است (Latif *et al.*, 2016; Farhadi *et al.*, 2013; Bozorgi *et al.*, 2019).

هدف از این مطالعه استفاده از رویکردهای مولکولی برای شناسایی کرم‌های خاکی است. سپس، بررسی تنوع آن‌ها و مقایسه جوامع این جانوران بین جنگل‌های طبیعی و دست‌کاشت در ناحیه هیرکانی، برای بررسی تأثیرات پوشش گیاهی روی این جوامع است.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه

این مطالعه روی سه جنگل (جنگل واتاشان (36.486667, 52.028333)، تیلانکار (36.6947, 51.1955) و پورده‌سر (36.82004, 50.880048)، در استان مازندران که در بخش مرکزی جنگل هیرکانی واقع شده انجام شده است (شکل ۱). این مناطق به شدت تحت تأثیر جنگل زدایی و کاشت مجدد درختان مختلف در طول یک دوره طولانی (بیش از ۲۰ سال) قرار گرفته‌اند. هر سه منطقه شامل جنگل‌های طبیعی و دست‌کاشت هستند. از

از سال ۱۳۸۷ در مناطق مختلف ایران سلسله مطالعاتی بر روی کرم‌های خاکی انجام شده که اکثراً بر شناسایی آن‌ها به‌وسیله مطالعات ریخت‌شناسی تأکید دارد. براساس این مطالعات تاکنون، ۱۳ جنس و ۲۸ گونه متعلق به خانواده‌های Megascolecidea, Lumbricidae و Acanthodrilidae در ایران ثبت شده است (Farhadi *et al.*, 2013; Latif *et al.*, 2016; Bozorgi *et al.*, 2019; Karimifard *et al.*, 2023). Tavakoli و همکاران (۲۰۱۸) نیز مطالعاتی در نواحی شمالی ایران انجام دادند، براساس این پژوهش پنج گونه کرم خاکی از منطقه نوشهر گزارش کردند که همگی این گونه‌ها به خانواده Lumbricidae و چهار جنس *Lumbricus*, *Dendrobaena*, *Aporrectodea* و *Octolasion* تعلق داشتند که در سه گروه اکولوژیک Epigeic, Anecic و Endogeic قرار گرفت (Tavakoli *et al.*, 2018). Latif و همکاران (۲۰۲۱) براساس مطالعات ریخت‌شناسی خود توانستند، ۱۳ گونه از کرم‌های خاکی متعلق به دو خانواده Lumbricidae و Megascolecidea را از شمال ایران گزارش کنند که از این میان تنها هفت گونه مربوط به ناحیه جنگلی بوده و مابقی گونه‌ها از علفزار و زمین‌های زیرکشت گزارش شده است (Latif *et al.*, 2021).

جنگل‌های هیرکانی، رویشگاه باستانی درختان پهن‌برگ معتدل منحصر به فرد هستند که در امتداد دامنه‌های شمالی رشته کوه البرز، نزدیک مرزهای جنوبی دریای خزر گسترش یافته‌اند. این جنگل‌ها از تالش (منطقه جنوب شرقی جمهوری آذربایجان) تا گلستان (شمال شرقی ایران) را در بر می‌گیرد و عمدتاً شامل سه استان گیلان، مازندران و گلستان در ایران است (Hosseini, 2006; Naqinezhad *et al.*, 2008; Siadati *et al.*, 2010). این نقاط داغ تنوع‌زیستی بقایای جنگل‌های پهن برگ هستند که بیشتر مناطق معتدل شمالی را در ۲۵ تا ۵۰ میلیون سال پیش، در اوایل عصر سنوزوئیک، تحت پوشش قرار می‌دادند. این منطقه منبع قابل توجهی از تنوع‌زیستی، تنوع ژنتیکی و خدمات مختلف محیط‌زیستی است (Haghdooost *et al.*, 2011; Tohidifar *et al.*, 2016). این جنگل‌ها حدود ۱۵ درصد از جنگل‌های ایران را تشکیل می‌دهند (Salehi & Maleki, 2012; Talebi *et al.*, 2013) و رویشگاه درختان ارزشمندی مانند راش شرقی،

چرخه تکثیر شامل ۳۴ چرخه تکرار شونده با دمای دناتوراسیون ثانویه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای اتصال پرایمر ۴۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و دمای سنتز نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه انجام شد. تمدید نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. برای آگاهی از کیفیت محصولات PCR، هر یک از آن‌ها روی ژل آگارز ۱٪ شارژ شدند. نمونه‌هایی که از کیفیت مناسب برخوردار بودند برای تعیین توالی به شرکت نیازن نور (تهران، ایران) ارسال شد.

آنالیزهای ژنتیکی: به منظور انجام مطالعات بارکد ژنتیکی توالی‌ها پس از ویرایش با استفاده از نرم افزار v. 9 Genious (Biomatters, 2021)، در سایت NCBI بلاست شدند (NCBI, 2021). این ابزار این امکان را فراهم می‌کند تا توالی ناشناخته با توالی مشابه موجود در پایگاه داده‌های توالی‌ها تطبیق یافته (Blast, 2015) و گونه‌ها مورد نظر را تا حد امکان شناسایی کرده و با طبقه‌بندی ریخت شناسی مطابقت داده شود. توالی‌ها با استفاده از الگوریتم MAFFT v.6 (Katoh et al., 2017)، MAFFT (2021) هم‌ردیف شدند. سپس بهترین مدل تکاملی با استفاده از نرم افزار (Posada & Crandall, 1998) v.2.3 Mrmodeltest تعیین شد. برای ترسیم درخت پیشینه احتمال از نرم‌افزار (Nguyen et al., 2015) IQ-Tree v.1.6.12 استفاده شد این درخت با بوت استرپ^۴ ۱۰۰۰ ترسیم شد.

به منظور تعیین دودمان‌های ژنتیکی بین افراد موجود در هر شاخه فاصله‌ی ژنتیکی با استفاده از نرم افزار MEGA X (Kumar et al., 2018) محاسبه شد.

مهم‌ترین درختان این مناطق می‌توان به گونه‌هایی از جنس‌های *Acer*, *Quercus*, *Alnus*, *Fraxinus* و *Sequoiadendron* اشاره کرد.

نمونه‌برداری گرم‌های خاکی: به طور کلی در هر منطقه دو ناحیه دست کاشت و طبیعی انتخاب شد. در هر ناحیه، دو سایت انتخاب شد و درون هر سایت شش کودرات m 0.5 X 0.5 m به صورت تصادفی^۱ در محیط قرار گرفت. نمونه‌برداری در این منطقه در فصل تابستان ۱۳۹۸ انجام پذیرفت بدین صورت که در ابتدا پس از جمع‌آوری هوموس از سطح خاک یک پیت 30 Cm X 30 Cm به ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر از مرکز کودرات برداشته شد. نمونه‌های گرم خاکی از مرکز هر کودرات بدست آمد. نمونه‌های بدست آمده با استفاده از استریومیکروسکوپ، بر اساس کلیدهای ریخت شناسی موجود شناسایی شدند (Reynolds & Mysyrlyodhlu, 2018; Szederjesi, 2017). شمای کلی از جزئیات مهم بدن گرم خاکی در شکل ۲ نشان داده شده است. برای مطالعات ژنتیکی و نگهداری طولانی مدت، نمونه‌ها در اتانول ۹۶ درصد قرار گرفتند و در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

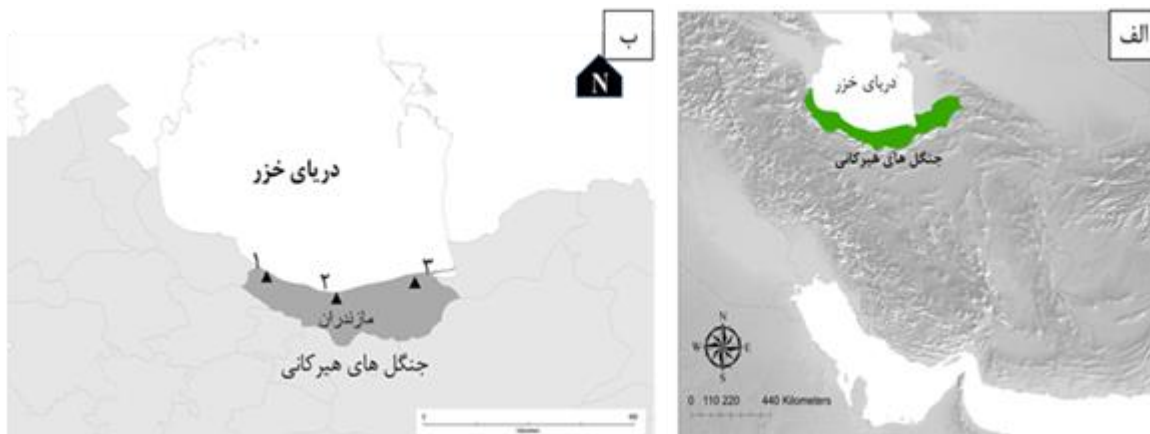
مطالعات آزمایشگاهی: استخراج DNA نمونه‌ها با استفاده از روش استاندارد نمکی انجام شد (Sambrook et al., 1989). بدین منظور DNA ژنومی از ۵ تا ۱۰ میلی گرم بافت هر کدام از گرم‌های خاکی استخراج شد. از آن جایی که هدف از این مطالعه ارزیابی تنوع‌زیستی موجود الیگوکت‌های^۲ خاک بود، از ژن سیتوکروم c اکسیداز زیر واحد ۱ (COI) میتوکندری برای آزمایش‌های مولکولی استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر LCO1490 و HCO2198 بودند (Folmer et al., 1994). فرآیند واکنش زنجیره‌ای پلیمرز^۳ (PCR) برای حجم کل ۲۵ میکرولیتر (۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس امپلیکون دانمارک (شامل dNTPها، dATP، dGTP، dTTP و dCTP)، آنزیم taq پلیمرز، بافر MgCl₂، استابیلایزرها)، یک میکرولیتر از هر پرایمر، یک میکرولیتر DNA و ۹/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر دیونیزه شده) انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه آغاز شد.

¹ Haphazardly

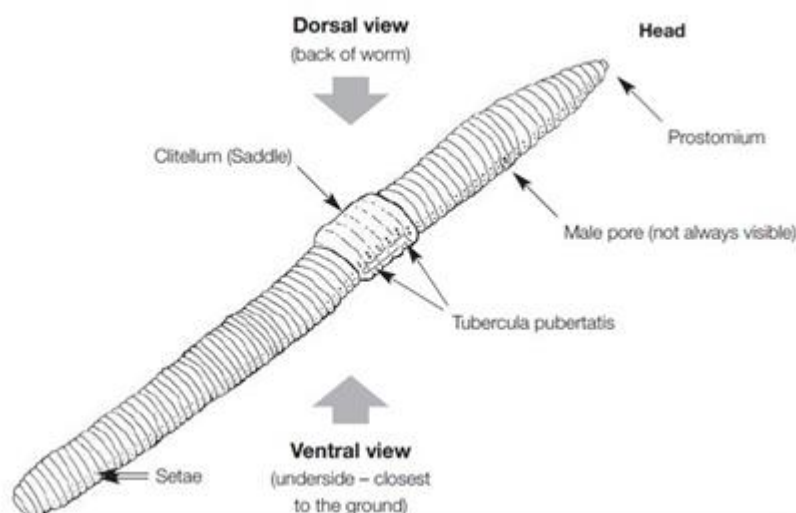
² Oligochaeta

³ Polymerase chain reactions (PCRs)

⁴ Bootstrap



شکل ۱- منطقه مورد مطالعه الف) موقعیت جنگل های هیرکانی در ایران ب) موقعیت ۳ جنگل مورد مطالعه در استان مازندران، جنگل ۱ (واتاشان)، جنگل ۲ (تیلانکار) و جنگل ۳ (پرده سر)



شکل ۲- شمای کلی از جزییات مهم بدن کرم خاکی (سایت <https://www.earthwormsoc.org.uk/identification>)

test در بسته آماری (Fox *et al.*, 2007) 1.2-7 برای بررسی شدند. از تحلیل چند متغییره واریانسها^۷ برای تعیین تفاوتها میان ترکیب جوامع کرمهای خاکی نواحی دست کاشت و طبیعی در هر منطقه استفاده شد. این تحلیل با استفاده از فاصله‌ی متریک Jaccard و با بهره‌گیری از داده‌های حضور و عدم حضور با ۹۹۹ جایگزینی و با بسته آماری (Kindt, 2020) vegan v. 1.17-8 انجام شد. آنالیز SIMPER برای تعیین سهم هر OTU در ایجاد تفاوت بین جوامع بین نواحی دست کاشت و طبیعی استفاده شد.

برای دستیابی به تعداد گونه‌های کاندید فرضی^۵ درون داده‌های ژنتیکی از روش آماری (Zhang *et al.*, 2013). bPTP^۶ استفاده شد. این آنالیز به صورت آنلاین انجام شد (bPTP server, 2021).

تحلیل‌های آماری: تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از (R Core Team, 2021) R v. 4.0.3 انجام شد. برای بررسی تفاوت فراوانی کل کرم‌های خاکی میان جنگل دست کاشت و طبیعی در هر منطقه تحلیل واریانس دو طرفه انجام شد. پیش از انجام این تحلیل، هموژن بودن واریانس‌ها با استفاده از آزمون Levene's test و نرمال بودن باقی‌مانده‌ها با استفاده از تحلیل Shapiro-Wilk

⁷ Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA)

⁵ Species delimitation

⁶ Bayesian implementation of the Poisson tree

نتایج

شناسایی کرم‌های خاکی: از میان ۲۵۱ نمونه جمع‌آوری شده در این مطالعه، ۲۲ فرد برای مطالعات ژنتیکی انتخاب شدند (جدول ۱). به دلیل فقدان مجموعه داده‌ها در پایگاه داده ژنتیکی، امکان شناسایی تمام توالی‌ها در سطح گونه وجود نداشت، در جدول ۱، نتایج بلاست توالی‌ها ارائه شده است. نتایج درخت تبارشناسی، ۱۵ کلاد اصلی را در مجموع داده‌های این مطالعه نشان می‌دهد (شکل ۳). تعیین حدود گونه‌ها با bPTP منجر به شناخت ۱۵ گونه فرضی برای مجموعه داده بارکد شد. بسیاری از آن‌ها با ارزش بالا (>0.80) پشتیبانی شدند. فواصل ژنتیکی تصحیح نشده بین افراد در جدول ۲ نشان داده شده است. به طور کلی، با توجه به ترکیب یافته‌های حاصل از مطالعات ژنتیکی، در مجموع ۱۵ OTU از میان کرم‌های خاکی جمع‌آوری شده در این پژوهش شناسایی شدند.

بررسی جوامع کرم‌های خاکی: همانطور که شکل ۴ نشان می‌دهد، تعداد و تنوع OTUها در مناطق طبیعی و دست‌کاشت تقریباً یکسان هستند (شکل ۴). همچنین مقایسه سه جنگل نشان داد که جنگل ۳ در مقایسه با سه جنگل دیگر، با دارا بودن هشت OTU و ۱۱۱ قرد، بیشترین تنوع و فراوانی را به خود اختصاص داده است. جنگل ۱ از نظر فراوانی با جنگل ۲ برابر بوده، اما تعداد OTUهای شناخته شده از جنگل ۱ بیشتر از جنگل ۲ می‌باشد. نتایج مطالعات آماری تک متغیره نیز تفاوت معنی‌داری را از نظر فراوانی کلی بین دو ناحیه‌ی طبیعی و دست‌کاشت نشان نداد ($p > 0.05$) و تنها این تفاوت بین سه منطقه جنگلی معنی‌دار بود (جدول ۳).

نتایج آنالیز چند متغیره که برای بررسی جوامع کرم‌خاکی مورد استفاده قرار گرفت، نیز تفاوت معنی‌داری را بین ترکیب جوامع کرم‌های خاکی بین دو ناحیه‌ی طبیعی و دست‌کاشت نشان نداد ($p > 0.05$). اما نتایج این بررسی نشان دهنده‌ی معنی‌دار بودن تفاوت ترکیب جوامع بین سه جنگل است (جدول ۳).

آنالیز SIMPER نشان داد که از میان ۱۵ OTU در این مطالعه، OTU شماره ۱۵ که در هر دو منطقه مورد بررسی (۱ و ۲) مشاهده شده است، یکی از گروه‌های تأثیرگذار در ایجاد تفاوت در مشارکت تجمعی بین سه

منطقه می‌باشد. فهرست OTUهایی که بیشترین تأثیر را در تفاوت بین سه جنگل دارند در جدول ۴ آمده است.

بحث

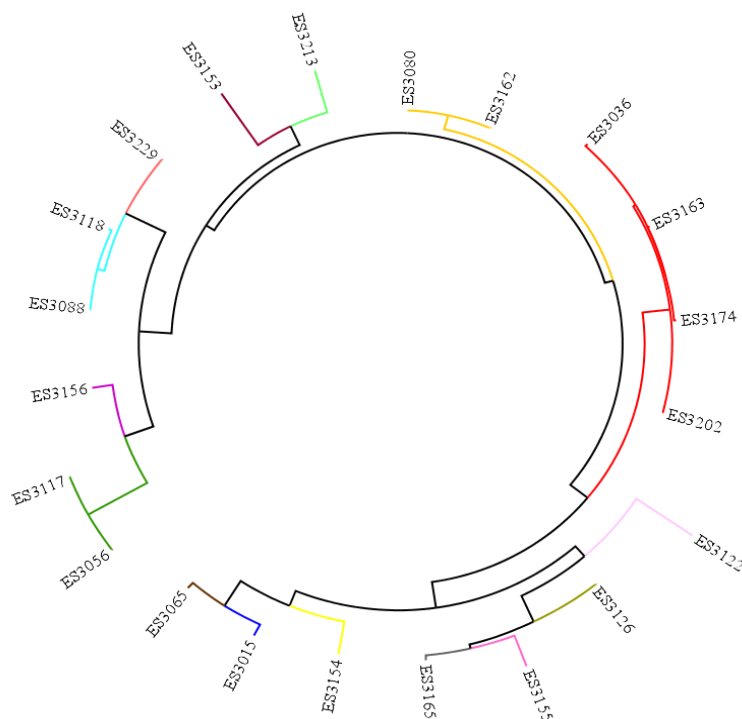
شناسایی کرم‌های خاکی: شناسایی انواع مختلف کرم‌های خاکی به دلیل وجود تنوع بالای ریختی در این گروه دارای مشکلات زیادی است. همچنین، ویژگی‌های تشخیصی برخی گونه‌ها در مراحل جوانی ممکن است مشخص نباشد و عدم دسترسی به متخصصان در این حوزه، فرآیند شناسایی کرم‌های خاکی را پیچیده‌تر می‌کند. تحقیقات مختلف نشان داده‌اند که استفاده از سیستم شناسایی بر اساس ژن COI می‌تواند ابزار قوی برای شناسایی کرم‌های خاکی با استناد به شواهد قابل اعتماد باشد (Jorge Decaens et al., 2016, 2013; Escudero et al., 2019). در این مطالعه، با توجه به نتایج درخت‌های تبارشناختی، فواصل ژنتیکی و محدوده‌ی گونه‌ها، ۱۵ OTU از طریق بارکدینگ شناسایی شدند. شناسایی این کرم‌های خاکی براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی چالش‌برانگیز بود. هرچند که استفاده از بارکدگذاری نتایج دقیق‌تری را ارائه می‌دهد، اما برای اکثر افراد، امکان تعیین و شناسایی تا سطح گونه وجود نداشت. این مطالعه به اولین گزارش گونه‌ی *Eisenia japonica* از ایران و دومین گزارش از جنس *Eisenia* از جنگل‌های هیرکانی اشاره دارد. تعیین دقیق طبقه‌بندی برای یک توالی نیاز به داشتن یک کتابخانه جامع مرجع DNA می‌باشد. کمبود توالی در پایگاه‌های اطلاعاتی چالشی برای شناسایی نمونه‌های کرم‌های خاکی در مطالعات ایجاد می‌کند. با این وجود، مقایسه نتایج ریخت‌شناسی و ژنتیکی ثابت کرده است که روش مولکولی در تخمین تنوع زیستی خاک کارآمد است و استراتژی بارکدینگ امکان شناسایی سریع و دقیق اکثر OTUها را فراهم می‌کند. برای مثال Song و همکاران (۲۰۱۸) تفاوت‌هایی را بین برآورد MOTUs و شناسایی‌های اولیه براساس رویکرد ریخت‌شناسی نشان دادند (Song et al., 2018). این چالش‌ها در شناخت گروه‌های خاص به دلیل تغییرات ریخت‌شناسی در مراحل لارو و جوانی (نابالغ) و تنوع پوشیده^۸ ایجاد می‌شوند (Hebert et al., 2003).

⁸ Cryptic diversity

جدول ۱- مجموعه داده های کرم های خاکی مورد استفاده در این مطالعه شامل کد شناسه، شماره OTU، طبقه بندی تاکسونومیک و

شماره دسترسی

Code ID (کد نمونه)	Accession number (کد ژنتیکی)	OTU	Phylum (شاخه)	Class (رده)	Order (راسته)	Family (خانواده)	Genus (جنس)	Species (گونه)
ES۳۰۱۵	PP۱۰۰۵۴۴	۰۱	Annelida	Oligochaeta	Opisthopora	Megascolecidae		
ES۳۰۳۶	PP۱۰۰۵۶۲	۰۲	Annelida	Oligochaeta	Opisthopora	Lumbricidae		
ES۳۰۵۶	PP۱۰۰۵۷۸	۰۳	Annelida	Oligochaeta		Lumbricidae		
ES۳۰۶۵	PP۱۰۰۵۸۵	۰۴	Annelida	Oligochaeta				
ES۳۰۸۰	PP۱۰۰۵۹۸	۰۵	Annelida	Oligochaeta	Opisthopora	Lumbricidae	<i>Eisenia</i>	<i>E. japonica</i>
ES۳۰۸۸	PP۱۰۰۶۰۵	۰۶	Annelida	Oligochaeta				
ES۳۱۱۷	PP۱۰۰۶۲۴	۰۳	Annelida	Oligochaeta				
ES۳۱۱۸	PP۱۰۰۶۲۵	۰۶	Annelida	Oligochaeta				
ES۳۱۲۲	PP۱۰۰۶۲۸	۰۷	Annelida	Oligochaeta	Crassiclitellata	Megascolecidae	<i>Amyntas</i>	<i>A. corticis</i>
ES۳۱۲۶	PP۱۰۰۶۳۰	۰۸	Annelida	Oligochaeta				
ES۳۱۵۳	PP۱۰۰۶۵۰	۰۹	Annelida	Oligochaeta				
ES۳۱۵۴	PP۱۰۰۶۵۱	۱۰	Annelida	Clitellata	Haplotaxida	Hormogastridae	<i>Hormogaster</i>	<i>H. pretiosiformis</i>
ES۳۱۵۵	PP۱۰۰۶۵۲	۱۱	Annelida	Oligochaeta				
ES۳۱۵۶	PP۱۰۰۶۵۳	۱۲	Annelida	Oligochaeta				
ES۳۱۶۲	PP۱۰۰۶۵۶	۰۵	Annelida	Oligochaeta				
ES۳۱۶۳	PP۱۰۰۶۵۷	۰۲	Annelida	Oligochaeta				
ES۳۱۶۵	PP۱۰۰۶۵۹	۱۳	Annelida	Oligochaeta				
ES۳۱۷۴	PP۱۰۰۶۶۳	۰۲	Annelida	Oligochaeta	Opisthopora	Lumbricidae		
ES۳۲۰۲	PP۱۰۰۶۷۸	۰۲	Annelida	Oligochaeta	Crassiclitellata	Lumbricidae		
ES۳۲۱۳	PP۱۰۰۶۸۷	۱۴	Annelida	Oligochaeta	Crassiclitellata	Lumbricidae	<i>Aporrectodea</i>	<i>A. trapezoides</i>
ES۳۲۲۹	PP۱۰۰۶۹۷	۱۵	Annelida	Oligochaeta				



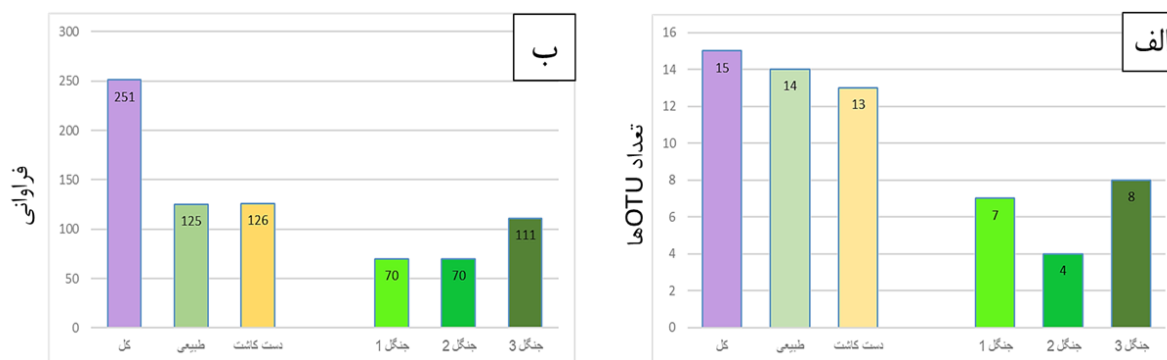
شکل ۳- درخت پیشینه احتمال رسم شده با استفاده از ژن میتوکندریایی سیتوکروم اکسیداز c زیر واحد یک (COI)، هر OTU با یک رنگ نمایش داده شده است.

جدول ۲- فواصل ژنتیکی اصلاح نشده بین افراد مورد بررسی در این پژوهش

ES۳۱۳	ES۳۲۰۲	ES۳۱۷۴	ES۳۱۶۵	ES۳۱۶۳	ES۳۱۶۲	ES۳۱۵۶	ES۳۱۵۵	ES۳۱۵۴	ES۳۱۵۳	ES۳۱۵۲	ES۳۱۴۶	ES۳۱۱۸	ES۳۱۱۷	ES۳۰۸۸	ES۳۰۸۰	ES۳۰۶۵	ES۳۰۳۶	ES۳۰۳۵	ES۳۰۱۵
ES۳۰۱۵																			
ES۳۰۳۶																	۰/۱۵۸		
ES۳۰۵۶																۰/۲۲۱	۰/۱۹۴		
ES۳۰۶۵																۰/۱۴۰	۰/۱۹۴		
ES۳۰۸۰																۰/۱۸۵	۰/۱۰۸	۰/۱۸۹	۰/۱۷۱
ES۳۰۸۸																۰/۲۲۵	۰/۲۱۲	۰/۲۰۷	۰/۲۱۶
ES۳۱۱۷																۰/۲۲۱	۰/۱۹۴	۰/۰۰	۰/۱۹۴
ES۳۱۱۸																۰/۲۳	۰/۲۱۶	۰/۲۱۲	۰/۲۲۱
ES۳۱۲۲																۰/۱۸۵	۰/۲۰۳	۰/۲۵۲	۰/۱۸۰
ES۳۱۲۶																۰/۱۴۹	۰/۱۴۴	۰/۲۱۶	۰/۱۴۹
ES۳۱۵۳																۰/۲۴۳	۰/۲۰۷	۰/۲۴۳	۰/۲۳۴
ES۳۱۵۴																۰/۱۲۶	۰/۱۵۳	۰/۱۹۴	۰/۱۲۲
ES۳۱۵۵																۰/۱۶۷	۰/۱۴۴	۰/۱۸۹	۰/۱۵۳
ES۳۱۵۶																۰/۱۸۹	۰/۱۸۰	۰/۱۵۳	۰/۱۷۶
ES۳۱۶۲																۰/۱۸۵	۰/۱۰۸	۰/۱۸۹	۰/۱۷۱
ES۳۱۶۳																۰/۱۵۸	۰/۰۰۹	۰/۱۸۹	۰/۱۴۰
ES۳۱۶۵																۰/۱۵۸	۰/۱۵۳	۰/۲۱۲	۰/۱۵۸
ES۳۱۷۴																۰/۱۵۸	۰/۰۰۹	۰/۱۹۴	۰/۱۴۹
ES۳۲۰۲																۰/۱۵۸	۰/۰۰۹	۰/۱۸۹	۰/۱۴۰
ES۳۲۱۳																۰/۱۸۹	۰/۱۸۰	۰/۱۹۸	۰/۱۸۵
ES۳۲۲۹																۰/۲۲۵	۰/۲۱۲	۰/۲۰۷	۰/۲۱۶

جدول ۳- خلاصه‌ای از نتایج آنالیزهای آماری انجام شده در این مطالعه شامل آنالیز تک متغییره (ANOVA) و آنالیز چند متغییره (PERMANOVA)

PERMANOVA	ANOVA	
$F = 5/1766, p = 0/001$	$F = 4/440, p = 0/0155$	همه مناطق (۳ جنگل)
$F = 0/5328, p = 0/908$	$F = 0/003, p = 0/9557$	ناحیه (طبیعی یا دست کاشت)
$F = 1/0106, p = 0/445$	$F = 0/859, p = 0/4281$	منطقه * ناحیه



شکل ۴- نمودار (الف) مقایسه تعداد OTUها و نمودار (ب) فراوانی کرم‌های خاکی به تفکیک سه جنگل و نواحی طبیعی و دست کاشت

جدول ۴- نتایج تحلیل SIMPER از تفاوت در ترکیب OTUها بین مناطق مورد مطالعه (منطقه ۱، منطقه ۲ و منطقه ۳) در جنگل‌های هیرکانی

منطقه ۱ - منطقه ۲	منطقه ۱ - منطقه ۳	منطقه ۲ - منطقه ۳
OTU ۰۲ (۰/۲۳۹), OTU ۱۱ (۰/۳۳۹), OTU ۰۷ (۰/۵۱۵), OTU ۱۳ (۰/۶۱۶), OTU ۱۵ (۰/۷۰۹)	OTU ۰۵ (۰/۱۸۷), OTU ۰۳ (۰/۳۳۵), OTU ۰۸ (۰/۴۶۴), OTU ۱۳ (۰/۵۶۳), OTU ۱۰ (۰/۶۵۵), OTU ۱۵ (۰/۷۲۹)	OTU ۰۲ (۰/۲۱۱), OTU ۱۱ (۰/۳۵۱), OTU ۰۳ (۰/۴۸۵), OTU ۰۵ (۰/۶۱۹), OTU ۰۸ (۰/۷۲۰)

است (Sohrabi et al., 2022). همچنین Saberi-Pirooz و همکاران (۲۰۲۴) به این نکته اشاره کردند که بزرگ بی مهرگان خاک‌زی در مناطقی از جنگل‌های هیرکانی که بیش از ۲۰ سال درختکاری صورت گرفته است، توانایی احیای خود را داشتند.

تفاوت میان سه جنگل در محدوده مورد مطالعه می‌تواند اشاره به تفاوت پوشش گیاهی میان سه منطقه داشته باشد. از این‌رو دلیل تنوع و فراوانی بیشتر در جنگل ۳ (پرده‌سر) را می‌توان به دلیل پوشش گیاهی متنوع از گیاهان بومی در این منطقه و تنوع کم‌تر OTUها را در جنگل ۲ (تیلاکنار) را نتیجه‌ی وجود گونه‌ی غیربومی سکویا در این منطقه دانست. به‌طور کلی، براساس مطالعات انجام شده، کاشت گونه‌های بومی و غیربومی گیاهی علاوه بر اثرات محیط‌زیستی و اقتصادی، تأثیر بسزایی بر روی

براساس شکل ۴ تعداد OTUها و فراوانی کرم‌های خاکی بین ناحیه دست‌کاشت و طبیعی یکسان است. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که رابطه‌ی معنی‌داری بین این دو ناحیه وجود ندارد و ترکیب جوامع کرم‌خاکی نیز تغییرات معنی‌داری را نشان نمی‌دهد. فقدان این تفاوت معنی‌دار می‌تواند نشان دهنده‌ی آن باشد که کرم‌های خاکی توانایی بالایی در سازگاری با طیف وسیعی از محیط‌ها دارند (Singh et al., 2019). علاوه بر این، Sohrabi و همکاران (۲۰۲۲) نیز، در مطالعات خود نشان دادند که در جنگل‌های ثانویه که بیش از ۲۰ سال کاشته شده بودند، فعالیت کرم‌های خاکی و نماتدها بیشترین بهبود را در تیمارهای خود نشان دادند. این‌طور پیش‌بینی می‌شود که در این مدت جنگل زمان کافی برای ترمیم جمعیت‌های درون خود به‌ویژه کرم‌های خاکی را داشته

منابع

1. **Andjelić Dmitrović, B., Jelić, M., Rota, E. and Šerić Jelaska, L., 2022.** DNA barcoding of invertebrates inhabiting olive orchards and vineyards accelerates understudied Mediterranean biodiversity assessment. *Diversity* 14, 182.
2. **Barrett, R.D.H. and Hebert, P.D.N., 2005.** Identifying spiders through DNA barcodes. *Can. J. Zool.* 83, 481–491.
3. **Blast, N., 2015.** Basic local alignment search tool. *Natl. Libr. Med. Natl. Cent. Biotechnol. Inf.*
4. **Blouin, M., Hodson, M.E., Delgado, E.A., Baker, G., Brussaard, L., Butt, K.R., Dai, J., Dendooven, L., Peres, G., Tondoh, J.E., Cluzeau, D. and Brun, J.J., 2013.** A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *Eur. J. Soil Sci.* 64, 161–182. <https://doi.org/10.1111/ejss.12025>
5. **Blouin, M., Hodson, M.E., Delgado, E.A., Baker, G., Brussaard, L., Butt, K.R., Dai, J., Dendooven, L., Pérès, G., Tondoh, J.E. and others, 2013.** A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *Eur. J. Soil Sci.* 64, 161–182.
6. **Bozorgi, F., Seiedy, M., Malek, M., Aira, M., Perez-Losada, M. and Dominguez, J., 2019.** Multigene phylogeny reveals a new Iranian earthworm genus (Lumbricidae: Philomontanus) with three new species. *PLoS One* 14, e0208904.
7. **Brown, J.H., Gillooly, J.F., Allen, A.P., Savage, V.M. and West, G.B., 2004.** Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology* 85, 1771–1789.
8. **Brussaard, L., De Ruiter, P.C. and Brown, G.G., 2007.** Soil biodiversity for agricultural sustainability. *Agric. Ecosyst. Environ.* 121, 233–244.
9. **bPTP, 2021.** Available online at: <http://species.h-its.org/ptp>.
10. **Coleman, D.C. and Wall, D.H., 2015.** Soil fauna: Occurrence, biodiversity, and roles in ecosystem function. *Soil Microbiol. Ecol. Biochem.* 4, 111–149.
11. **da Silva, L.P., Heleno, R.H., Costa, J.M., Valente, M., Mata, V.A., Gonçalves, S.C., da Silva, A.A., Alves, J. and Ramos, J.A., 2019.** Natural woodlands hold more diverse, abundant, and unique biota than novel anthropogenic forests: a multi-group assessment. *Eur. J. For. Res.* 138, 461–472.
12. **Decaëns, T. and Jiménez, J.J., 2002.** Earthworm communities under an agricultural intensification gradient in Colombia. *Plant Soil* 240, 133–143.
13. **Decaëns, T., Jiménez, J.J., Gioia, C., Measey, G.J. and Lavelle, P., 2006.** The values of soil animals for conservation biology. *Eur. J. Soil Biol.* 42, S23–S38.
14. **Decaens, T., Porco, D., James, S.W., Brown, G.G., Chassany, V., Dubs, F., Dupont, L.,**

گونه‌های جانوری و گیاهی کف جنگل و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک جنگل دارد و متعاقباً می‌تواند اثرات نامطلوبی از جمله از بین رفتن تنوع‌زیستی، افزایش اسیدیته خاک و کاهش موجودات خرد و کلان خاک به ویژه کرم خاکی در اقلیم معتدل داشته باشد (Razavi, 2010). Kamau و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعات خود بر نقش حیاتی پوشش درختان متنوع در حفظ جوامع ماکروفون خاک و عملکردهای اکولوژیک آن‌ها در خاک تأکید کردند. توجه به این نکته ضروری است که وابستگی کرم‌های خاکی به جنگل‌های دست‌کاشت بسته به ویژگی‌های خاص جنگل‌های دست‌کاشت، شرایط خاک و شیوه‌های مدیریتی می‌تواند متفاوت باشد (Kamau *et al.*, 2017).

با توجه به کاهش قابل توجه جنگل‌های هیرکانی در دهه‌های اخیر، اطلاعات جامع در مورد تأثیر آشکار اختلالات انسانی بر کرم‌های خاکی برای پرداختن به مسائل حفاظتی ضروری است. کرم‌های خاکی در جنگل‌های دست‌کاشت نقش مهمی در حفظ سلامت خاک، بهبود تراکم و پایداری خاک، کنترل آفات، بهبود تغذیه گیاهان و حفظ تنوع‌زیستی دارند. بدون حضور کرم‌های خاکی، خاک ممکن است بهبود نیافته و مشکلاتی مانند فرسایش خاک، کاهش تراکم و پایداری خاک، کاهش تغذیه گیاهان و افزایش آفات به وجود بیاید. بنابراین، حفظ و حمایت از جمعیت کرم‌های خاکی در جنگل‌های دست‌کاشت بسیار مهم است. به طور کلی، شناخت صحیح تنوع کرم‌های خاکی در کنار مطالعه‌ی فعالیت‌ها و تعاملات بین آن‌ها در جنگل‌های دست‌کاشت می‌تواند دانش ما را درباره سلامت خاک، چرخه مواد مغذی و عملکرد اکوسیستم در این مناطق افزایش دهد و زمینه را برای مدیریت صحیح اکوسیستم‌های جنگلی فراهم آورد (Ross *et al.*, 2021).

تشکر و قدردانی

این مطالعه به عنوان بخشی از رساله دکتری ریحانه صابری پیروز در پژوهشکده علوم محیطی، دانشگاه شهید بهشتی، با حمایت بنیاد ملی علوم ایران (شماره گرنت: ۹۸۰۱۷۷۵۶) انجام شده است.

2013. Woody species diversity and forest structure from lowland to montane forest in Hyrcanian forest ecoregion. *J. Mt. Sci.* 10, 609–620.
28. **James, S.W., 1991.** Soil, nitrogen, phosphorus, and organic matter processing by earthworms in tallgrass prairie. *Ecology*. 72, 2101–2109.
29. **Jorge Escudero, G., Lagerlöf, J., Martinez Debat, C. and Pérez, C.A., 2019.** Identification of earthworm species in Uruguay based on morphological and molecular methods. *Agrociencia (Uruguay)* 23, 37–46.
30. **Kamau, S., Barrios, E., Karanja, N.K., Ayuke, F.O. and Lehmann, J., 2017.** Soil macrofauna abundance under dominant tree species increases along a soil degradation gradient. *Soil Biol. Biochem.* 112, 35–46.
31. **Katoh, K., Rozewicki, J. and Yamada, K.D., 2017.** MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinform.* 20, 1160–1166.
32. **Kennedy, S.R., Prost, S., Overcast, I., Rominger, A.J., Gillespie, R.G. and Krehenwinkel, H., 2020.** High-throughput sequencing for community analysis: the promise of DNA barcoding to uncover diversity, relatedness, abundances and interactions in spider communities. *Dev. Genes Evol.* 230, 185–201.
33. **Kindt, R., 2020.** Vegan: community ecology package. R package version 1.17-8. World 11.
34. **Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nknyaz, C., Tamura, K., 2018.** MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549.
35. **Latif, R., Malek, M. and Csuzdi, C., 2016.** New earthworm records from the Central Zagros Mountain, Iran with. *North. West. J. Zool.* 13, 326–336.
36. **Latif, R., Rejali, F., Roohi, A. and Esmaelzad, A., 2021.** Earthworm biodiversity from Hyrcanian forests: natural vs. agricultural, in: *Keep Soil Alive, Protect Soil Biodiversity: Global Symposium on Soil Biodiversity 19--22 April 2021. Proceedings.* p. 210.
37. **Lavelle, P., Bignell, D., Lepage, M., Wolters, V., Roger, P., Ineson, P., Heal, O.W. and Dhillon, S., 1997.** Soil function in a changing world: the role of invertebrate ecosystem engineers. *Eur. J. Soil Biol.*
38. **MAFFT, 2021.** Available online at: <https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>
39. **Maggia, M.E., Decaens, T., Lapied, E., Dupont, L., Roy, V., Schimann, H., Orivel, J., Murienne, J., Baraloto, C., Cottenie, K. and others, 2021.** At each site its diversity: DNA barcoding reveals remarkable earthworm diversity in neotropical rainforests of French Guiana. *Appl. Soil Ecol.* 164, 103932.
40. **Meiklejohn, K.A., Damaso, N. and Robertson, Lapied, E., Rougerie, R., Rossi, J.P. and others, 2016.** DNA barcoding reveals diversity patterns of earthworm communities in remote tropical forests of French Guiana. *Soil Biol. Biochem.* 92, 171–183.
15. **Decaens, T., Porco, D., Rougerie, R., Brown, G.G. and James, S.W., 2013.** Potential of DNA barcoding for earthworm research in taxonomy and ecology. *Appl. Soil Ecol.* 65, 35–42.
16. **Edwards, C.A., 2004.** Earthworm ecology in cultivated soils. *Earthworm Ecol.* 161–170. https://doi.org/10.1007/978-94-009-5965-1_13
17. **Farhadi, Z., Malek, M. and Elahi, E., 2013.** Review of the earthworm fauna of Iran with emphasis on Kohgiluyeh & Boyer-Ahmad Province. *Zootaxa* 3670, 440–448.
18. **Fox, J., Friendly, G.G., Graves, S., Heiberger, R., Monette, G., Nilsson, H., Ripley, B., Weisberg, S., Fox, M.J. and Suggests, M., 2007.** The car package. *R Found. Stat. Comput.*
19. **Folmer, F., Hoeh, W.R., Black, M.B. and Vrijenhoek, R.C., 1994.** Conserved primers for PCR amplification of mitochondrial DNA from different invertebrate phyla. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3, 294–299.
20. **Ganesan, M., Christyraj, J.R.S.S., Yesudhasan, B.V., Mohan, M. and Christyraj, J.D.S., 2023.** Live foldscope imaging of two environmentally beneficial earthworm species and their early developmental stages. *Environ. Qual. Manag.*
21. **Haghdoust, N., Akbarinia, M., Hosseini, S.M., Kooch, Y. and others, 2011.** Conversion of Hyrcanian degraded forests to plantations: Effects on soil C and N stocks. *Ann. Biol. Res* 2, 385–399.
22. **Hajibabaei, M., Janzen, D.H., Burns, J.M., Hallwachs, W. and Hebert, P.D.N., 2006.** DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 968–971.
23. **Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and DeWaard, J.R., 2003.** Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* 270, 313–321.
24. **Hosseini, S.M., 2006.** Death of Elm trees in the Hyrcanian forests of Iran, in: *UFRO Working Party 7.03. 10 Proceedings of the Workshop.* pp. 183–186.
25. **Huang, J., Xu, Q., Sun, Z.J., Tang, G.L. and Su, Z.Y., 2007.** Identifying earthworms through DNA barcodes. *Pedobiologia.* 51(4), 301–309.
26. **Hussain, M., Liaqat, I., Mubin, M., Nisar, B., Shahzad, K., Durrani, A.I., Zafar, U., Afzaal, M., Ehsan, A. and Rubab, S., 2022.** DNA barcoding: Molecular identification and Phylogenetic analysis of pheretimoid earthworm (*Metaphire* sp. and *Amyntas* sp.) based on mitochondrial partial COI gene from Sialkot, Pakistan. *J. Oleo Sci.* 71, 83–93.
27. **Jafari, S.M., Zarre, S. and Alavipanah, S.K.,**

- Ecol. 196, 105279.
51. **Salehi, A. and Maleki, M., 2012.** Evaluation of Soil Physical and Chemical Properties in Poplar Plantations in North of Iran. *Ecol. Balk.* 4.
 52. **Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989.** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory press.
 53. **Siadati, S., Moradi, H., Attar, F., Etemad, V., Hamzeh'ee, B. and Naqinezhad, A., 2010.** Botanical diversity of Hyrcanian forests; a case study of a transect in the Kheyroud protected lowland mountain forests in northern Iran. *Phytotaxa* 7, 1–18.
 54. **Singh, J., Schädler, M., Demetrio, W., Brown, G.G. and Eisenhauer, N., 2019.** Climate change effects on earthworms-a review. *Soil Org.* 91, 114.
 55. **Sohrabi, H., Jourgholami, M., Lo Monaco, A., Picchio, R., 2022.** Effects of Forest Harvesting Operations on the Recovery of Earthworms and Nematodes in the Hyrcanian Old-Growth Forest: Assessment, Mitigation, and Best Management Practice. *Land* 11, 746.
 56. **Song, C., Lin, X.L., Wang, Q. and Wang, X.H., 2018.** DNA barcodes successfully delimit morphospecies in a superdiverse insect genus. *Zool. Scr.* 47, 311–324.
 57. **Szederjesi, T., 2017.** The first combined checklist of earthworms of the Northeastern Mediterranean region (Clitellata: Megadrili). *Opusc. Zool.* 48, 77–116.
 58. **Talebi, K.S., Sajedi, T. and Pourhashemi, M., 2013.** Forests of Iran: A Treasure from the Past, a Hope for the Future. Springer Science & Business Media.
 59. **Tavakoli, M., Kooch, Y. and Akbarinia, M., 2018.** Frequency and diversity of worms in topsoil of degraded and reclaimed forest habitats of the Caspian region. *Iran. J. For.* 10, 293–306.
 60. **Tohidifar, M., Moser, M., Zehzad, B. and Ghadirian, T., 2016.** Biodiversity of the Hyrcanian Forests: A synthesis report.
 61. **Wilson, E.O., others, 1988.** The current state of biological diversity. *Biodiversity* 521, 3–18.
 62. **Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P. and Stamatakis, A., 2013.** A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics* 29, 2869–2876.
 - J.M., 2019.** Assessment of BOLD and GenBank-- Their accuracy and reliability for the identification of biological materials. *PLoS One* 14, e0217084.
 41. **Naqinezhad, A., Hamzeh'ee, B. and Attar, F., 2008.** Vegetation--environment relationships in the alderwood communities of Caspian lowlands, N. Iran (toward an ecological classification). *Flora-Morphology, Distrib. Funct. Ecol. Plants* 203, 567–577.
 42. **NCBI, 2021.** Available online at: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
 43. **Nouri-Aiin, M., Schall, J.J., Keough, C.A., Wen, Y. and Görres, J.H., 2021.** Identifying the unidentifiable: a PCR multiplex protocol for the diagnosis of invasive pheretimoid earthworm species, verified by morphological and barcode identification. *Appl. Soil Ecol.* 161, 103822.
 44. **Pop, A.A., Cech, G., Wink, M., Csuzdi, C. and Pop, V.V., 2007.** Application of 16S, 18S rDNA and COI sequences in the molecular systematics of the earthworm family Lumbricidae (Annelida, Oligochaeta). *Eur. J. Soil Biol.* 43, S43--S52.
 45. **Posada, D. and Crandall, K.A., 1998.** Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817–818.
 46. **Razavi, S.A., 2010.** Comparison of soil characteristics and biodiversity in plantations of bald cypress and Caucasian Alder (Case Study: Kludeh-Mazandaran Province). *Iran. J. Wood For. Sci. Technol.* 17, 41–56.
 47. **Reynolds, J.W., Mýšřlýřořlu, ř.M., 2018.** Preliminary Key To Turkish Megadriles (Annelida, Clitellata, Oligochaeta), Based On External Characters, Insofar As Possible. *Megadrilogica* 23.
 48. **Ross, D.S., Knowles, M.E., Juillerat, J.I., Görres, J.H., Cogbill, C.V., Wilmot, S. and D'Agati, K., 2021.** Interaction of land use history, earthworms, soil chemistry and tree species on soil carbon distribution in managed forests in Vermont, USA. *For. Ecol. Manage.* 489, 119049.
 49. **Rougerie, R., Decaęns, T., Deharveng, L., Porco, D., James, S.W., Chang, C.H., Richard, B., Potapov, M., Suhardjono, Y. and Hebert, P.D.N., 2009.** DNA barcodes for soil animal taxonomy. *Pesqui. Agropecuária Bras.* 44, 789–802.
 50. **Saberi-Pirooz, R., Ahmadzadeh, F. and Javidkar, M., 2024.** Nightmare of forests: Secondary forestation silently alters soil macroinvertebrate communities. *Appl. Soil*





Earthworm Communities in Natural and Reforestation Areas of the Hyrcanian Forest; A Conservation Approach

Reihaneh Saberi-Pirooz^{*1}, Faraham Ahmadzadeh¹

1*- Department of Biodiversity and Ecosystem Management, Environmental Sciences Research Institute, Shahid Beheshti University, G.C., Evin, Tehran, Iran

Original Article

Received:
2023.12.15

Accepted:
2024.02.11

Keywords:
Earthworms,
Hyrcanian forests,
DNA Barcoding,
Operational
Taxonomic Units

Abstract

Introduction: The Caspian Hyrcanian forests are a habitat with ancient growth of temperate broadleaf trees that spread along the Alborz Mountain range's northern slopes and near the southern borders of the Caspian Sea. However, human activities have significantly reduced forest cover, and identifying species diversity, forest structure, and human manipulations in Hyrcanian forests have received less attention. Macroinvertebrates are the main part of soil biodiversity in forests. Earthworms are one of the main components of soil biodiversity in forests and are one of the most valuable indicators of soil health and a vital component of soil fauna. Nevertheless, studying earthworms based on their morphological features poses various challenges. To overcome these challenges, DNA barcoding has emerged as a valuable tool extensively employed in biodiversity research. The study aims to use molecular approaches to identify earthworms and their diversity and compare the communities of these animals between natural and planted forests in the Hyrcanian region.

Materials and Methods: The study was conducted in the central part of the Caspian Hyrcanian forests. The research was done in three locations, with two planted and two natural areas in each location. Within each area, a total of six quadrats were randomly placed to collect samples. Subsequently, the samples were classified based on their morphological characteristics. A total of 251 earthworm samples were collected, and 22 individuals were then selected for genetic studies using the cytochrome c oxidase subunit one (COI) gene after doing morphological sorting. The samples were initially kept in 96% ethanol for genetic studies to long-term storage. Univariate and multivariate statistical analyses were then performed to investigate the diversity of earthworms and compare their communities between planted and natural areas and three locations.

Results: Based on genetic studies, 15 taxonomic units of earthworm were identified in the study area of the Hyrcanian forests. The research findings

indicate that the abundance and total number of Operational Taxonomic Units (OTUs) in natural and planted areas are almost the same. The results of univariate statistical analysis (ANOVA) and multivariate analysis (PERMANOVA) did not show any significant difference for earthworms between natural and planted habitats.

Discussion: The study demonstrates that the utilization of barcoding techniques yields more accurate results; however, the establishment of a comprehensive DNA reference library is necessary to enhance the precision of species classification. Despite finding no significant differences in earthworm communities between natural and planted forests, notable distinctions were detected among the three studied locations. This suggests that the dependence of earthworms on planted forests is contingent upon specific characteristics, soil conditions, and management practices. Moreover, the results show that earthworms are known for their ability to adapt to a wide range of environments. It is anticipated that secondary forests, which have been established for over two decades, will provide sufficient time for the restoration of earthworm populations, contributing to overall ecosystem recovery. The significance of this knowledge lies in its contribution to the sustainable preservation and effective administration of forests, particularly the Hyrcanian forests, which represent an ancient and invaluable ecosystem.