



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA
- REDE BIONORTE

**RELAÇÕES ENTRE A FILOGENÉTICA VIA *DNA BARCODE* E TRAÇOS
FUNCIONAIS DE MINHOCAS NA AMAZÔNIA ORIENTAL**

ANDRÉ LUIZ RAPOSO BARROS

SÃO LUÍS - MA

2023



ANDRÉ LUIZ RAPOSO BARROS

**RELAÇÕES ENTRE A FILOGENÉTICA VIA *DNA BARCODE* E TRAÇOS
FUNCIONAIS DE MINHOCAS NA AMAZÔNIA ORIENTAL**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biodiversidade e Conservação

Orientador(a): Prof. Dr. Guillaume Xavier Rousseau

SÃO LUÍS - MA

Outubro 2023

Barros, André Luiz Raposo.

Relações entre a filogenética via *DNA Barcode* e traços funcionais de minhocas na Amazonia Oriental. / André Luiz Raposo Barros – São Luís (MA), 2023.

98p.

Tese (Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE) Universidade Estadual do Maranhão - UEMA, 2023.

Orientador: Prof. Dr. Guillaume Xavier Rousseau.

1. Traços Funcionais. 2.Variabilidade dos Ecossistemas. 3. Fatores Ambientais do Solo. 4. Minhocas da Amazônia. I.Título.

CDU:595.142(811)

ANDRÉ LUIZ RAPOSO BARROS

RELAÇÕES ENTRE A FILOGENÉTICA VIA *DNA BARCODE* E TRAÇOS FUNCIONAIS DE MINHOCAS NA AMAZÔNIA ORIENTAL

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do título em Biodiversidade e Conservação.

Aprovada em 31/ 10 / 2023

Banca examinadora

Documento assinado digitalmente
gov.br GUILLAUME XAVIER ROUSSEAU
Data: 01/11/2023 14:22:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Guillaume Xavier Rousseau (Orientador)
Universidade Estadual do Maranhão

Documento assinado digitalmente
gov.br LUIS MANUEL HERNANDEZ GARCIA
Data: 01/11/2023 15:59:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Luis Manuel Hernández-García (Titular)
Universidade Estadual do Maranhão

Documento assinado digitalmente
gov.br MARCIO FERNANDES ALVES LEITE
Data: 02/11/2023 05:00:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Márcio Fernandes Alves Leite (Titular)
University of Amsterdam



Prof. Dr. Patrick Lavelle (Titular)
Université Pierre et Marie Curie

Documento assinado digitalmente
gov.br GIOVANNY ANGIOLILLO RODRIGUEZ
Data: 02/11/2023 08:29:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Giovanni Angiolillo Rodriguez (Titular)
Universidade Estadual do Maranhão



TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO

Eu, André Luiz Raposo Barros, autorizo a publicação da versão final aprovada de minha Tese de Doutorado intitulada “RELAÇÕES ENTRE A FILOGENÉTICA VIA *DNA BARCODE* E TRAÇOS FUNCIONAIS DE MINHOCAS NA AMAZÔNIA ORIENTAL no Portal do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia — Rede BIONORTE (PPG-BIONORTE), bem como no repositório de Teses da CAPES ou junto à biblioteca da Instituição Certificadora.

São Luís (MA), 05 de junho de 2024.



Documento assinado digitalmente

ANDRE LUIZ RAPOSO BARROS

Data: 05/06/2024 10:59:53-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

ANDRÉ LUIZ RAPOSO BARROS



*Em memória de meu Pai pelos grandes ensinamentos
e de minha querida Mãe pelo amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Desejo exprimir os meus agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, permitiram que esta tese se concretizasse. Em primeiro lugar quero agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Guillaume Xavier Rousseau, por ter me dado suporte e ter deixado eu fazer parte do seu grupo de trabalho e, ter acreditado em mim e nas minhas capacidades. Agradeço ainda o trato simples, correto e científico, com que sempre abordou as nossas reuniões de trabalho, sem nunca ter permitido que o desalento ou circunstâncias adversas se instalassem. Saliento também o apoio incondicional prestado, a forma interessada, extraordinária e pertinente como acompanhou a realização deste trabalho. As suas críticas construtivas, as discussões e reflexões foram fundamentais ao longo de todo o percurso. Obrigado pela grandiosa humildade em ensinar e ser esse profissional admirável na educação superior Maranhense.

Agradeço, ao amigo Dr. Márcio Fernandes Alves Leite, da Utrecht University na Holanda, pelas conversas incentivadora e amigas, por ter sido um Irmão sempre sincero, que muitas das vezes puxou minha orelha, e de uma forma ou de outra, que sempre contribuiu de forma significativa para a clareza científica das minhas decisões.

Agradeço ao amigo Dr. Luis Hernandez da Universidade Estadual do Maranhão, quero de uma forma imensa, expressar o meu muito obrigada...por Tudo. Pela forma amiga e generosa com que sempre me incentivou e ajudou, e pelo espírito tranquilo que ensina a todos dentro do grupo de pesquisa. Obrigado por instigar o pensamento crítico de ideias para construção desta tese.

Ao amigo Biólogo Sandriel Costa, que me ajudou muito no laboratório, principalmente pelas conversas 'desastrosas' que me renderam bons momentos.

Agradeço ao Prof. Dr. José de Ribamar Silva Barros, pelo carisma e suporte em disponibilizar os equipamentos do laboratório de genética – LABWICK-UEMA.

A todos do time Laboratório de Artrópodes e Microbiologia do Solo que contribuíram de forma direta e indireta com essa Tese. Agradeço de coração.

Aos meus pais, Bruno Antônio (*in memoriam*) e Gislaine de Andrade, quero agradecer o apoio incondicional, paciência e amor, que sempre e em qualquer momento da minha vida foi oferecido. Amo vocês!

À Fundação de Amparo à Ciência e a Tecnologia do Maranhão (FAPEMA) pelo financiamento deste projeto, com a referência UNIVERSAL-00840/2019.

BARROS, André Luiz Raposo. **Relações entre a filogenética via *DNA barcode* e traços funcionais de minhocas na Amazônia oriental.** 2023. 93 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2023.

RESUMO

Na ecologia das minhocas, uma questão importante é saber quais são as principais causas de variabilidade nos traços funcionais. A alteração das condições microclimáticas, a degradação do solo e o estresse ambiental alteram a disponibilidade de recursos e, conseqüentemente, as pressões de seleção que atuam sobre os indivíduos. Este estudo procurou determinar a importância relativa dos fatores ambientais e da taxonomia das espécies de minhocas sob a variabilidade dos traços funcionais das espécies além de contribuir para uma melhor compreensão do desenvolvimento dos traços funcionais (biomassa, comprimento do corpo, diâmetro do corpo, moela, espessura da moela, espessura do septo, tiflosol, e matéria orgânica intestinal). Coletamos amostras de minhocas de 11 espécies em diferentes regiões da Amazônia Oriental (São Luís, Alcântara, Rosário, Centro Novo, Itinga, Tomé Açú e São José do Ribamar). Para isso, objetivou determinar as respostas das características das diferentes espécies quando expostas aos diferentes ecossistemas e condições do solo. Os nossos resultados sugerem que os traços funcionais das minhocas são influenciados de formas distintas pelas condições ambientais, sendo um conjunto de traços mais constante e independente da variabilidade ambiental (biomassa, comprimento do corpo, diâmetro do corpo) e outro conjunto mais sensível (diâmetro da moela, comprimento da moela, espessura do músculo da moela, espessura do septo, tiflósole, e matéria orgânica intestinal). Investigamos também quais seriam os fatores ambientais mais importantes para a variabilidade dos traços funcionais. No geral, o mais afetada por diferentes variáveis ambientais foi a espessura do septo. Para o desenvolvimento da moela e da espessura do corpo, recomendamos que a abordagem funcional seja descrita por características morfométricas, com o menor número possível de grupos ou categorias utilizadas. Em geral, os nossos resultados sugerem que a classificação taxonômica por si só é um bom guia para compreender os principais traços funcionais das minhocas da Amazônia Oriental. No segundo capítulo desta tese abordamos o uso da ferramenta molecular como Códigos de Barra de DNA (*DNA barcode*) permitem delimitar grupos de espécies cuja a taxonomia é desconhecido. O produto dos códigos de barra de DNA gera UOTM's (Unidade Operacional

Taxônomica Molecular) que podem ser usados como morfoespécies para descrever a diversidade e a estrutura das comunidades além de ser possível explorar as interações entre atributos do solo e os processos ecológicos. Portanto, este estudo objetivou-se investigar o potencial da diversidade filogenética através dos códigos de barra de DNA (DNA *barcode*) com gene COI de espécies novas de anelídeos e a sua relação com identificação mediante taxonomia clássica. Foram processadas a extração do DNA de 1.014 amostras de minhocas. No entanto, somente 56 amostras foram sequenciadas. Nossos resultados demonstram que apesar dos problemas técnicos laboratoriais. Houve formação de agrupamento entre espécie de minhocas e alguns grupos de minhocas a nível de gênero que já tiveram sido identificados pela taxonomia clássica corroboram com análise filogenética (*Pontoscolex* e *Andiorhinus*) mediante a alta similaridade com as bases de dados existentes. Concluímos que os dados apresentados neste capítulo necessitam ser refeitos a partir do processo de amplificação e sequenciamento das amostras

Palavras-chave: Traços Funcionais; Variabilidade dos Ecossistemas; Fatores Ambientais do Solo, Minhocas da Amazônia;

BARROS, André Luiz Raposo. **Relationships between phylogenetics via DNA barcode and functional traits of earthworms in eastern Amazônia.** 2023. 93 f. Thesis (Ph.D. in Biodiversity and Biotechnology) – Federal University of Maranhão, São Luis, MA Brazil, 2023.

ABSTRACT

Understanding the causes of variability in functional traits is an important question in earthworm ecology. While interspecific variation in anatomical dimensions for the same trait is well accepted, the role of environmental filters, soil degradation, and environmental stress in affecting the variability of functional traits is not well understood. In this study, we sought to determine the relative importance of environmental factors and earthworm species taxonomy on the variability in functional traits within species (intraspecific variability). We focused on eight functional traits including body mass, body length, body diameter, gizzard, gizzard thickness, septum thickness, typhlosole, and gut organic matter. We sampled earthworms of 11 different species in various regions of the eastern Amazon to determine the general responses of different species' characteristics when exposed to various ecosystem and soil conditions. Our results suggest that the functional traits of earthworms are influenced in different ways by environmental conditions. One set of traits, including body mass, body length, and body diameter, was more constant and independent of environmental variability, while another set, including gizzard diameter and length, gizzard muscle thickness, septum thickness, typhlosole, and intestinal organic matter, was more sensitive. The most affected by different environmental variables was septum thickness. We also examined which environmental factors are most important for trait variability. Our study highlights the importance of considering both environmental factors and taxonomic classification when studying the variability of functional traits within earthworm species. Overall, our results suggest that taxonomic classification alone is a good guide for estimating the major functional traits of earthworms in the Brazilian Amazon, but local conditions can their variability is which is essential for informing conservation efforts and maintaining ecosystem function. In the second chapter of this thesis, we focused on the utilization of the molecular tool known as DNA Barcodes, which enables the identification of species groups with unknown taxonomy. The utilization of DNA Barcodes produces UOTMs (Molecular Taxonomic Operational Units), which can serve as morphospecies to characterize the diversity and structure of communities, as well as to investigate the relationships between soil attributes and ecological processes. Thus, the

objective of this study was to explore the potential of DNA Barcodes in assessing phylogenetic diversity. Specifically, we utilized the COI gene region to analyze new species of annelids and compare their identification with classical taxonomy. We extracted DNA from a total of 1,014 earthworm samples; however, only 56 samples were successfully sequenced. Despite encountering technical challenges during the sample amplification and sequencing process, our results revealed the formation of clusters among earthworm species and certain genus-level groups, which had already been identified through classical taxonomy and were further supported by phylogenetic analysis (e.g., *Pontoscolex* and *Andiorhinus*) due to their significant similarity to existing databases. In conclusion, the data presented in this chapter necessitate revisiting and repeating the amplification and sequencing procedures to ensure accuracy and reliability.

Keywords: Earthworm Ecology; Trait Variability; Morphometric Analysis; Hierarchical Modelling; Intra-specific Variability;

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: Variability of earthworm’s functional traits in eastern Amazon is more species-dependent than environment-pendent.

Figura 1. Sampling locations of total oligochaetes from the Soil Invertebrates Collection in the Soil Biology Laboratory from Maranhão State University in the Eastern Amazon. Source: IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2021) and ANA-Agência Nacional de Água (2021)..... **41**

Figura 2. Differences in functional traits among oligochaete species. Simple linear model with adjustment for heterogeneity of variance (gamma distribution). Equal letters do not differ statistically according to Tukey's test. The linear model was adjusted for heterogeneity of variances at the 5% probability level. Legend: Anel - *Arraia nelmae*; Abar - *Andiorrhinus (Turedrilus) barrosoi*; Amir - *Andiorrhinus (Turedrilus) miricuri*; Bpun - *Brasilisia punki*; Ocn - *Ocnodrilidae* gen.n; Dbol - *Dichogaster bolau*; Hala - *Holoscolex alatus*; Hdos - *Holoscolex dossantosi*; Hfer - *Holoscolex Fernandoi*; Pcor - *Pontoscolex corethrurus*; Rgur - *Righiodrilus gurupi*..... **53**

Figura 3. Ranges of soil attributes where earthworm species were sampled. Legend: AN - *Arraia nelmae*; ATB - *Andiorrhinus Turedrilus barrosoi*; ATM - *Andiorrhinus Turedrilus miricuri*; BP - *Brasilisia punki*; DA - *Dichogaster afinis*; DB - *Dichogaster bolau*; HA - *Holoscolex alatus*; HD - *Holoscolex dossantosi*; HF - *Holoscolex Fernandoi*; PC - *Pontoscolex corethrurus*; RG - *Righiodrilus gurupi*. **54**

Figura 4. Variation partitioning of the null model where the variability in earthworm traits is explained only by the species differences. **55**

Figura 5. Variation partitioning of model A with land use and soil factors as the predictors of the variance in earthworm traits (species considered a random effect). **56**

Figura 6. Partition of Variance. Effect of taxonomic differences and altitude, land use, soil physicochemical properties, and geographical distance on the variability of earthworm functional traits. Application of Hierarchical Modeling of Species Communities (HMS), model B..... **57**

Figura 7. Effect of environmental factors (land use, soil physicochemical properties, and geographic distance) on the functional traits of oligochaetes as suggested by model B (gamma distribution). Red and blue colors represent the positive and negative values for the regression coefficient if the bounds of the 90% credible interval do not overlap the zero. Stars indicate the regression coefficients in which the 95% credible interval do not overlap zero. **58**

CAPÍTULO 2: Diversidade filogenética de minhocas na Amazônia Oriental via códigos de barras de DNA

Figura 8. Amostra do controle de sequências DNA em gel de eletroforese.....	75
Figura 9. Leitura da concentração de DNA no <i>picodrop</i>	75
Figura 10. Eletroferograma de sequenciamento da fita <i>forward</i> entre as sequencia 180-215 pb.	76
Figura 11. Todas as sequencias foram alinhadas usando <i>muscle</i> algoritmo no software MEGA.	76
Figura 12. Ilustração de exemplares de espécies novas usadas no estudo de filogenético. Fonte: Hernandez-Garcia et., 2021.....	78
Figura 13. Árvore filogenética de máximo verossimilhança do gene COI exibindo todas as amostras de minhocas.	79
Figura 14. Árvore filogenética de máximo verossimilhança do gene COI das amostras de <i>Pontoscolex corethrurus</i> exibindo formação de dois grupos.....	80
Figura 15. Árvore filogenética de máximo verossimilhança do gene COI das amostras de <i>Andiorrhinus</i> e todos os isolados do <i>Boldysystem</i> dos gêneros <i>Rhinodrilus</i> e <i>Andiorrhinus</i> ...	81
Figura 16. Árvore filogenética de máximo verossimilhança do gene COI das amostras de <i>Holoscolex</i> e todos os isolados do <i>Boldysystem</i> dos gêneros <i>Glossodrilus</i> e <i>Righiodrilus</i>	82



LISTA DE TABELA

CAPÍTULO 1: Variability of earthworm's functional traits in eastern Amazon is more species-dependent than environment-pendent.

Table 1. Functional traits proposed by the BETSI platform and modifications proposed in this work.	39
Table 2. Supplementary Table S2, Earthworms' bio-ecological aspects and occurrence in different land uses in the State of Pará and Maranhão, Brazil. Legend: * Land-use with adult earthworms used for functional traits ** total distribution area concerning all plot sampled. Numbers in parentheses mean number of sites of occurrence.	48
Table 3. Correlations between elevation and soil physical properties that are important for selecting traits related to burrowing activities.	54
Table 4. Predictive performance of the three different models (null model, model A, and model B) based on two-fold cross-validation. All models included species as random effect at the individual level. Predictive performance is measured by R^2 and the RMSE as a	59

CAPÍTULO 2: Diversidade filogenética de minhocas na Amazônia Oriental via códigos de barras de DNA

Tabela 5. Espécies de minhocas usadas no sequenciamento e respectivas legendas usadas nas árvores filogenética.	77
---	-----------

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. OBJETIVOS.....	18
1.1.1 Objetivo Geral.....	18
1.1.2 Objetivos Específicos	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 <i>Oligoquetas</i>	20
2.2 <i>Taxonomia Classica e Limitações</i>	21
2.3 <i>Traços funcionais ecológicos dos oligoquetas</i>	22
2.5 <i>DNA Barcoding</i>	28
CAPÍTULO 1: Variability of earthworm’s functional traits in eastern Amazon is more species-dependent than environment-pendent.....	32
CAPÍTULO 2: Diversidade filogenética de minhocas na Amazônia Oriental via códigos de barras de DNA.....	71
4. CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS.....	84

1. INTRODUÇÃO

Um quarto da biodiversidade global identificada pertence à fauna do solo (DECAËNS, 2010; LAVELLE et al., 2006), desempenhando um papel fundamental e essencial no funcionamento do solo e na prestação de serviços ecossistêmicos (DECAËNS et al., 2016). Dentre os organismos do solo, as minhocas desempenham funções edáficas importantes, como a decomposição da matéria orgânica e a ciclagem de nutrientes (HEINER et al., 2011; LIEBEKE et al., 2015). No entanto, surpreendentemente, as minhocas são um dos grupos menos estudados, especialmente no bioma amazônico, que representa o maior e mais desconhecido reservatório de oligoquetas terrestres do planeta (ORGIAZZI, A., BARDGETT, R.D., BARRIOS, E., BEHAN-PELLETIER, V., BRIONES, M.J.I., CHOTTE, J-L., DE DEYN, G.B., EGGLETON, P., FIERER, N., FRASER, T., HEDLUND, K., JEFFERY, S., JOHNSON, N.C., JONES, A., KANDELER, E., KANEKO, N., LAVELLE, P., LEMANCEAU, P., M., 2016). Estudos recentes têm contribuído para o conhecimento dessa biodiversidade, identificando novas espécies na Amazônia Maranhense (SANTOS et al., 2017; HERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2018a-c; SOUSA et al., 2020).

A situação do bioma amazônico é preocupante, com um ritmo elevado de desmatamento nos últimos 60 anos, apesar de algumas reduções pontuais entre 2004 e 2013. No entanto, entre 2018 e 2019, a taxa de desmatamento voltou a crescer, chegando a cerca de 60% (INPE, 2019). As mudanças no uso do solo resultantes do desmatamento têm causado uma drástica redução na diversidade dos engenheiros do solo (PEY et al., 2014a) e levado a uma degradação frequentemente irreversível de suas funções (BOYER; BLAKEMORE; WRATTEN, 2011a). Nos últimos anos (2021 e 2022), o desmatamento na Amazônia tem gerado a conversão de florestas maduras em pastagens (MONTEIRO, 2022). No entanto, buscar mecanismos para avaliar os impactos sobre os engenheiros do solo, como os oligoquetas, pode representar uma alternativa promissora nos esforços de proteção e conservação desses organismos (PÉRÈS et al., 2011).

Nessa perspectiva de proteção e conservação dos oligoquetas, os traços funcionais desses organismos têm se mostrado uma variável potencial para elucidar as interações ecológicas entre eles nos diferentes ambientes. Essa abordagem é especialmente útil quando há falta de conhecimento taxonômico e ecológico funcional local das espécies. Por meio dessas investigações, é possível descrever como os impactos das mudanças globais no solo afetam a variabilidade funcional dos invertebrados e, conseqüentemente, seus efeitos no funcionamento dos ecossistemas (MARICHAL et al., 2017; SCHIEDECK et al., 2010a).

Na ecologia de comunidades, os traços funcionais desempenham um papel fundamental

ao testar a importância relativa das interações biológicas, filtros ambientais e processos neutros na estruturação dos grupos de espécies (GOTELLI et al., 2002; DECAËNS et al., 2009; JIMÉNEZ et al., 2012). Na ecologia funcional, esses traços são empregados para explorar as relações entre a diversidade funcional dos invertebrados e os fatores ambientais no contexto das mudanças de uso do solo (COULIS et al., 2015; HEDDE et al., 2010; MARICHAL et al., 2017).

No entanto, os traços funcionais têm sido considerados uma abordagem operacional e preditiva para classificar taxas hiperdiversas (SILVA; BRANDÃO et al., 2010). Em situações em que a identificação no nível de espécie é limitada, essas métricas permitem o desenvolvimento de modelos quantitativos para entender as regras de montagem das comunidades (DIAS; CABIDO, 2001; PETCHEY; GASTON, 2002, 2006; MOUILLOT et al., 2005) e explicar, em parte, o funcionamento da comunidade e do ecossistema (PETCHEY; GASTON, 2002).

Os traços funcionais podem ser definidos como características morfológicas, fisiológicas ou fenológicas mensuráveis em nível individual (VIOLLE, 2007; MARICHAL et al., 2017). Uma vez que os traços funcionais são definidos e identificados em um número representativo de espécies bem conhecidas, é possível inferir, de maneira análoga, as propriedades ecológicas de espécies desconhecidas ou menos conhecidas. Essa abordagem oferece uma classificação ecológica dos indivíduos, permitindo relacionar características morfológicas e seus efeitos nos componentes dos serviços ecossistêmicos (BOUCHE, 1977).

As preferências ecológicas amplamente utilizadas, propostas na década de 70 com base nos estudos de Bouché (1971, 1972), representam os hábitos alimentares dos anelídeos. No entanto, é importante considerar que as características funcionais que visam as respostas dos organismos às condições e mudanças ambientais possuem funções ecológicas relativamente específicas em termos de características internas e externas dos organismos (LAVOREL e GARNIER, 2002). No geral, foram feitos esforços para criar novas subclasses de preferências ecológicas, como epi-anécicas, endo-anécicas, epi-endogéicas e intermediárias, para descrever o comportamento funcional das oligoquetas (BOTTINELLI et al., 2020). No entanto, a escolha dos traços está relacionada ao objetivo da investigação.

De modo geral, o tipo e a quantidade de traços utilizados dependem do objetivo a ser alcançado. Por exemplo, Guilherme et al. (2019) mostraram que seis traços são suficientes para analisar o comportamento de forrageio e as estratégias de predação, apresentando mínima colinearidade e redundância nas medições. Por outro lado, Pavone et al. (2014) demonstraram que traços funcionais relacionados às histórias de vida são mais importantes para explicar padrões de composição em metacomunidades de borboletas do que a própria filogenia. Além disso, mudanças intraespecíficas nos traços funcionais têm sido de grande relevância para considerar análises de

espécies amplamente distribuídas, sendo abordadas como biodiversidade funcional (B-diversidade funcional) (SPASOJEVIC et al., 2015).

Em consequência da forte pressão antrópica enfrentada pelas florestas amazônicas e da grande possibilidade de perda de informação funcional das oligoquetas, este estudo considerou o uso de sete traços funcionais, tanto externos (biomassa, comprimento e diâmetro) quanto internos (moela, matéria orgânica intestinal, septos e tifosol), das oligoquetas em diferentes usos do solo. O objetivo foi investigar os efeitos das mudanças de uso do solo e dos fatores ambientais na variabilidade dos traços funcionais das oligoquetas. Além disso, esta tese busca realizar ajustes e padronizações por meio de modelagem das variáveis dos traços funcionais, evitando discrepâncias nas análises de dados.

Avaliamos como os atributos de uso do solo afetam a variabilidade dos traços funcionais nas diferentes espécies de minhoca. A hipótese investigada foi se as diferentes espécies de minhocas apresentam respostas semelhantes em suas características funcionais em relação às mudanças nos fatores ambientais (variáveis do ecossistema e do solo). Nossos resultados sugerem que os traços funcionais das minhocas são influenciados de formas distintas pelas condições ambientais. Existe um conjunto de traços mais constante e independente da variabilidade ambiental (biomassa, comprimento do corpo, diâmetro do corpo), enquanto outro conjunto de traços é mais sensível (diâmetro da moela, comprimento da moela, espessura muscular da moela, espessura dos septos, tifosol e matéria orgânica intestinal). Também exploramos quais fatores ambientais são mais relevantes na variabilidade dos traços funcionais. Em geral, nossos resultados sugerem que a classificação taxonômica pode ser considerada um bom indicador para compreender os principais traços funcionais das minhocas na Amazônia.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

- Investigar os efeitos das mudanças de uso do solo e dos fatores ambientais na variabilidade dos traços funcionais de oligoquetas.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito das espécies na variabilidade dos traços funcionais;
- Averiguar o efeito das espécies na mudança de uso do solo;

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Oligoquetas*

As minhocas são organismos invertebrados pertencentes ao grupo dos anelídeos (Filo Annelida, do latim "annellus": anel pequeno) e estão amplamente distribuídas em solos úmidos ao redor do mundo, embora haja poucos registros fósseis relacionados à sua origem. Alguns registros fósseis de câmaras de estivação construídas por minhocas foram datados de uma era próxima ao Paleozoico Inferior, entre 570 e 635 milhões de anos atrás (VERDE et al., 2007), quando inicialmente estavam mais adaptadas ao ambiente aquático (BROWN; JAMES, 2007).

Os parentes mais próximos das minhocas pertencem à classe Polychaeta (poli = "muitas", chaeta = "cerdas"), que ocorrem em ambientes aquáticos, principalmente marinhos (HICKMAN, JR.; ROBERTS, L; LARSON, 2014). Análises moleculares evidenciam que as primeiras minhocas evoluíram em ambientes aquáticos e posteriormente migraram para ambientes terrestres. As famílias de minhocas terrestres estão relacionadas às famílias mais primitivas que ocorrem em ambientes aquáticos (JAMES; DAVIDSON, 2012).

A classe Oligochaeta (oligo = "poucas", chaeta = "cerdas") difere dos Polychaeta por possuir poucas cerdas por segmento e pelo engrossamento epitelial anterior chamado clitelo quando adultos (HICKMAN, JR.; ROBERTS, L; LARSON, 2014). O corpo desses indivíduos é cilíndrico, metamerizado (composto por segmentos corporais ou anéis) e alongado, com a boca e o ânus localizados em extremidades opostas (MADIGAN et al., 2010; RUPPERT; FOX; BARNES, 2005).

Embora algumas espécies de minhocas frequentemente ocupem diferentes micro-habitats epígeos (DECAËNS et al., 2016), a maioria dos indivíduos vive no subsolo e constrói galerias e canais constantemente em busca de abrigo e alimento. Os detritos resultantes da construção desses canais desempenham um papel importante na bioestruturação do solo. Devido ao seu sistema digestivo simples, os resíduos excretados pelas minhocas consistem principalmente em solo levemente modificado.

As minhocas, quando encontram condições ótimas de umidade e temperatura no solo, ocupam principalmente as camadas superficiais, mas também podem se mover a profundidades de 30 a 50 cm (BROWN; JAMES, 2007). Nessas profundidades, elas desempenham um papel direto ou indireto nas funções ecológicas do solo (HENDRIX; BOLHEN, 2002). O efeito físico no solo causado pelos oligoquetas, juntamente com cupins, besouros e formigas, é considerado bastante significativo, a ponto de serem chamados de "engenheiros do ecossistema" (LAVELLE, 2011; WRIGHT; JONES, 2006).

2.2 *Taxonomia Classica e Limitações*

Os principais critérios taxonômicos relevantes para a classificação dos oligoquetas baseiam-se em suas relações com seus parentes mais próximos. A presença de um clitelo mais desenvolvido e a capacidade de colonizar ambientes terrestres são indicativos de grupos evolutivos mais recentes (SOUSA et al., 2020abc). Michaelsen (1912) realizou as primeiras tentativas de criar uma base que explicasse as relações filogenéticas entre as espécies de minhocas terrestres, utilizando mapas de distribuição e associação de centros de origem das minhocas com as famílias. Posteriormente, Cordero (1944) e Righi (1971) propuseram classificar as minhocas sul-americanas, com ênfase em espécies nativas. Esses estudos destacam a importância de certos caracteres na consideração do estado primitivo das espécies ou gêneros, incluindo o sistema reprodutivo e a quantidade de glândulas calcíferas. A extensão do clitelo foi posteriormente considerada um caráter importante para a classificação de subgêneros do gênero *Pontoscolex* (RIGHI 1999), e o arranjo de cerdas e a extensão de tubérculos pubertários foram inclusive considerados caracteres-chave para delimitar subespécies (RIGHI ARAUJO 1999).

O princípio clássico para distinguir espécies ancestrais de espécies mais recentes baseia-se nas bases teóricas evolutivas, onde uma espécie é considerada mais recente quando o gasto energético necessário para obter o mesmo sucesso reprodutivo é menor (REF). Nesse sentido, minhocas com muitas estruturas repetidas (por exemplo, Holoicas com muitas glândulas calcíferas) ou estruturas extensas (como o clitelo) demandam um maior gasto energético e são consideradas mais primitivas. Por outro lado, minhocas com menos estruturas, provavelmente mais eficientes, são consideradas mais recentes. No entanto, essas considerações apresentam limitações em termos de validade genética e também existem conflitos entre alguns taxonomistas que não aceitam certas classificações, como no caso de subespécies ou até mesmo de gêneros e subgêneros, pois consideram essas medições arbitrárias.

A identificação taxonômica tradicional de minhocas até o nível de espécies requer expertise e geralmente é dificultada pela falta de caracteres estáveis, fáceis e distintivos provenientes da variabilidade ambiental que afeta os aspectos morfológicos (RICHARD et al., 2010). Essa caracterização externa é conhecida como caracterização morfológica e é realizada em exemplares previamente fixados em formol (4 a 10%) ou em etanol (100%), os quais são imersos na solução de interesse (água ou álcool 70%) em cubas para dissecação, onde são fixados com alfinetes entomológicos (RIGHI, 1966).

Como os principais caracteres externos são observados no estágio adulto, os casulos e indivíduos jovens raramente são considerados em estudos de campo, o que prejudica significativamente a avaliação da riqueza de espécies. Apenas poucos taxonomistas são capazes de

identificar espécies de minhocas, o que se torna uma limitação diante da rápida taxa de desmatamento e extinção de espécies. Por esse motivo, abordagens moleculares têm sido consideradas como ferramentas alternativas na classificação ou morfotipagem de minhocas (DECAËNS et al., 2016).

2.3 Traços funcionais ecológicos dos oligoquetas

Segundo Nunes-Neto et al. (2013), o termo "função" é frequentemente utilizado na ecologia contemporânea, especialmente no contexto de pesquisas sobre biodiversidade e funcionamento ecossistêmico. No entanto, uma parte da comunidade científica raramente define de forma clara a qual objeto a função se refere. O autor destaca a importância de explicitar nos trabalhos a qual(is) objeto(s) a função está sendo atribuída. Além disso, é essencial esclarecer os mecanismos pelos quais os componentes, sejam eles organismos ou o ecossistema como um todo, desempenham essas funções.

Determinar os caracteres funcionais que os organismos desempenham no ecossistema em que habitam, em vez de se basear apenas em sua classificação taxonômica, representa um avanço significativo nas medições dessas comunidades (BREMNER, 2008) e possibilita uma compreensão mais profunda de como os traços funcionais de uma espécie específica ou de um grupo de espécies influenciam o funcionamento ecossistêmico.

Uma das alternativas para compreender as funções ecológicas desempenhadas pelos organismos é por meio da abordagem funcional. Essa abordagem classifica os organismos em grupos funcionais de acordo com as características que melhor respondem às condições ambientais e que influenciam o funcionamento do ecossistema (DIAZ; CABIDO, 2001). Essas características são definidas como traços biológicos dos indivíduos e descrevem, de modo geral, o seu modo de vida, alimentação e estratégias de reprodução. Esses traços estão relacionados às atividades que os organismos desempenham no ecossistema (DIAZ; CABIDO, 2001).

A análise de traços biológicos (ATB) combina dados estruturais de conjuntos de espécies (como a abundância de espécies ou biomassa) com informações sobre as características funcionais de cada espécie (BREMNER et al., 2006a, 2003). Diferentes traços biológicos estão geralmente associados a funções ecológicas distintas (LAVOREL et al., 2002), o que significa que as propriedades do ecossistema dependem dos organismos presentes e da distribuição e abundância desses organismos ao longo do tempo e do espaço (HOOPER et al., 2005; BREMNER, 2008).

Os táxons, por meio de seus traços biológicos, interagem com as características físicas e químicas do ambiente (OTEGUI et al., 2016), de forma que os gradientes ambientais podem atuar

como filtros, selecionando os traços que irão ocupar regiões distintas. Nessa perspectiva, o ambiente é visto como uma força seletiva, excluindo espécies que são incapazes de tolerar as condições de um local específico (KRAFT et al., 2015).

As minhocas são indiscutivelmente um dos componentes essenciais da biota do solo que contribuem significativamente para a formação do solo, sua estrutura e ciclagem de nutrientes (HEDDE; VAN OORT; LAMY, 2012). As minhocas alteram as propriedades químicas e físicas do solo e influenciam processos que melhoram a fertilidade (LAL, 1988). Por exemplo, as oligoquetas terrestres estimulam o crescimento das plantas ao aumentar a disponibilidade de nitrogênio (VAN GROENIGEN et al., 2014). Além disso, por meio das atividades de escavação de galerias e produção de húmus, as minhocas afetam fisicamente as propriedades do solo, aumentando a capacidade de retenção de água, acelerando a drenagem do solo, muco e o carbono presentes no húmus melhoram a resistência dos agregados do solo (BLANCHART et al., 1999). Para compreender o papel das minhocas nos processos do solo e suas respostas ambientais, os pesquisadores estudaram suas características e as classificaram em grupos funcionais (FOURNIER et al., 2012; GARNIER; NAVAS, 2011; PEY et al., 2014a).

A abordagem dos traços funcionais, que enfatiza as características funcionais dos indivíduos, oferece respostas para o entendimento dos habitats e das funções do ecossistema (LAVOREL et al., 2013; VERBERK; VAN NOORDWIJK; HILDREW, 2013). Os traços funcionais de um organismo podem ser características morfológicas, fisiológicas, fenológicas ou alimentares, que estão conectadas à sua história de vida e sua função ecológica no ecossistema, determinando uma resposta individual às pressões e efeitos que precedem os processos ecológicos (DÍAZ et al., 2013; MOUILLOT et al., 2013). Dessa forma, os traços funcionais podem ser usados como indicadores de processos ecológicos específicos em escala local ou regional. Por exemplo, eles podem ser utilizados para fazer previsões sobre mudanças na distribuição das populações, quando uma dessas características é vista como um sinal de alerta precoce de distúrbios dentro da comunidade (HARRINGTON et al., 2010; LALIBERTÉ; LEGENDRE, 2010; WAN HUSSIN et al., 2012).

Com base nas estratégias de alimentação e distribuição no perfil do solo, as oligoquetas têm sido classificadas em três grandes categorias ecológicas: epígeicas, anécicas e endogeicas (BOUCHÉ, 1977; LAVELLE, 1983; LAVELLE et al., 1989). As minhocas pertencentes à categoria ecológica epígeica apresentam pigmentação total no corpo, uma musculatura escavadora pouco desenvolvida, tamanho pequeno ou mediano, e têm preferência por consumir alimentos ricos em matéria orgânica. Portanto, são encontradas preferencialmente em ambientes como a liteira ou serrapilheira, onde há um maior acúmulo de matéria orgânica (BOUCHÉ, 1977; LAVELLE, 1983;

LAVELLE et al., 1989). As minhocas da categoria ecológica anécica apresentam pigmentação frequentemente na parte anterior do corpo, o que serve de proteção contra a radiação solar devido à constante exposição da área corporal na superfície do solo durante a busca por recursos ricos em matéria orgânica. Além disso, possuem uma musculatura escavadora desenvolvida na parte anterior do corpo (BOUCHÉ, 1977; LAVELLE, 1983; LAVELLE et al., 1989). O tamanho das espécies varia, sendo de médio a grande porte, e possuem um padrão de construção de galerias verticais que podem atingir mais de 70 cm de profundidade (JIMÉNEZ & DECAËNS, 2003). As oligoquetas dentro dessas categorias têm um forte impacto na dinâmica de nutrientes e nas propriedades físicas do solo (LAVELLE E SPAIN, 2001). As minhocas da categoria ecológica endogeica representam o grupo mais diversos e menos conhecido, pois possuem poucas preferências e padrões indefinidos. Apresentam ausência de pigmentação e uma musculatura escavadora fortemente desenvolvida em todo o corpo. Não possuem padrões exatos para a construção de galerias, mas têm preferências por certos grupos de matéria orgânica, podendo ser classificadas em três subgrupos: oligohúmicas, mesohúmicas e polihúmicas.

Em 1959, Lee (LEE, 1959) utilizou categorias discretas para agrupar minhocas da família Megascolecidae da Nova Zelândia em três categorias com base no horizonte do solo: serapilheira, solo superficial e subsolo (LEE, 1959). Posteriormente, em 1972, Bouché sugeriu classificar as minhocas lumbricídeas europeias em três categorias ecológicas (epígeas, anécicas e endógeas), com base, entre outros fatores, no comportamento alimentar e na construção de galerias (BOUCHÉ, 1972). No entanto, a proposta original não incluía uma relação entre as minhocas e as propriedades do solo (BOUCHÉ, 1972). Isso ocorre porque as classificações combinam várias condições morfoanatômicas em uma única definição (ou seja, epígea, endógea ou anécica). Assim, alguns pesquisadores recomendaram a medição dos caracteres morfoanatomicos de forma mais precisos principalmente os que estiverem relacionados à história evolutiva das espécies para estudos funcionais (PEY et al., 2014a).

Segundo Violle et al., (VIOLLE et al., 2007) os traços funcionais incluem características morfológicas, fisiológicas, fenológicas ou comportamentais expressas nos fenótipos de organismos individuais e são relevantes para compreender a resposta desses organismos ao ambiente ou seus efeitos nas propriedades do ecossistema. Pey et al. (PEY et al., 2014b) propõem distinguir entre traços de desempenho, que abrangem o crescimento, reprodução e sobrevivência (aptidão), e características morfológicas, fenológicas e fisiológicas (traços "M-P-P"). Além disso, traços que têm um impacto direto nos processos do ecossistema são categorizados como traços de efeito, enquanto os traços relacionados às respostas individuais ao ambiente são comumente referidos como traços de resposta. (FOUNTAIN-JONES; BAKER; JORDAN, 2015).

Um estudo realizado por Bottinelli et al. (2020) revisou a classificação das três principais categorias (epigeicas, anécicas e endogeicas) e relatou o sucesso na redefinição estatística das três subclasses. As principais características mais influentes foram a pigmentação da pele, comprimento corporal e coloração da pele, resultando em uma nova configuração categórica triangular para epi-anécica, endo-anécica, epi-endogeica e intermediária.

Os traços funcionais em oligoquetas são mensurados por características específicas internas ou externas. Alguns traços, como o comprimento, diâmetro e biomassa da minhoca, estão relacionados com a capacidade de força e bioperturbação. A moela é responsável pela capacidade de trituração e bioperturbação. O tiflosol é responsável pela capacidade de assimilação da matéria orgânica. Os septos são elementos importantes do hidroesqueleto das minhocas e estão associados à força e ao potencial de capacidade de escavação. Esses traços funcionais podem ser afetados pelas mudanças no uso do solo (MARICHAL et al., 2017).

O estudo da composição de traços funcionais proporciona *insights* sobre o impacto dos filtros ambientais e o papel das interações entre espécies na condução da montagem da comunidade. Traços funcionais são mais adequados para explicar padrões comunitários do que a composição taxonômica devido à sua relação com histórias de vida, vínculos com a aptidão do organismo e resposta a diferentes condições ambientais (BERG et al., 2010; KAUSTUV; JABLONSKI; VALENTINE, 2001; VANDEWALLE et al., 2010). Embora informativa, essa relação com o filtro ambiental também introduz variabilidade nos traços das minhocas em nível individual (variabilidade intraespecífica) e pode ser necessário considerá-la ao caracterizar os traços funcionais da comunidade de minhocas [15,16].

Um estudo realizado por Marichal et al. (2017) demonstrou que as comunidades de minhocas apresentam proporções de traços funcionais entre indivíduos que respondem à degradação da paisagem. Esses dados enfatizam que características como tiflosol complexo e septos espessos e bem desenvolvidos estão associados a paisagens degradadas. Por outro lado, minhocas com septos intermediários e sem moela são encontradas em paisagens menos degradadas. Esses dados demonstram que traços como moela, tiflosol e septos podem ser considerados traços funcionais que apresentam respostas à degradação do ambiente. Portanto, a descrição detalhada dessas características está relacionadas à adaptação intestinal, e é mais informativa do que as descrições categóricas usadas em estudos anteriores, no entanto, os métodos são limitados pela disponibilidade de material para análise.

Na ecologia das minhocas, surge uma questão crucial: quais são os principais fatores impulsionadores da variabilidade nos traços funcionais? (MAKOTO; MINAMIYA; KANEKO, 2016). A variação interespecífica (a variabilidade ao nível das espécies) é abordada mais

frequentemente do que a variabilidade intraespecífica, considerando que espécies do mesmo gênero mudam em dimensão anatômica para o mesmo traço. Essa condição sugere a possibilidade de utilizar alguns indivíduos por espécie para medir características, como foi efetivamente feito para formigas (CADOTTE, 2017; SILVA; BRANDÃO, 2010). Portanto, uma abordagem intermediária para reduzir a carga de trabalho é selecionar um pequeno subconjunto de indivíduos de cada espécie e analisar seus traços funcionais. No entanto, a variabilidade dos traços funcionais para uma espécie específica reflete os fatores ambientais (por exemplo, condições locais do solo e mudanças no uso da terra) que também podem ajudar a prever a variabilidade dos traços funcionais, reduzindo assim a carga de trabalho na caracterização desses traços. Por exemplo, abordagens de traços funcionais baseadas nas características morfológicas de invertebrados são confiáveis para mostrar relações entre eco-regiões, essas relações são confirmadas pela existência de filtros ambientais que selecionam um subconjunto de espécies do conjunto de espécies regionais, com estruturas de traços específicas, a partir de um conjunto maior para formar uma comunidade local (CADOTTE, 2017; VANDEWALLE et al., 2010).

Dessa forma, vale compreender a importância relativa das mudanças no uso da terra, distâncias geográficas, propriedades do solo e táxons na variabilidade intraespecífica dos traços funcionais de minhocas.

2.4 Ocorrência e diversidade de oligoquetas

Os principais gêneros e espécies de minhocas nativas encontrados no bioma Amazônico pertencem às famílias Glossoscolecidae e Rhinodrilidae (Brown & James, 2007; James & Davidson, 2012; James, 2012). Anteriormente, as espécies desses gêneros eram classificadas em uma única família, a Glossoscolecidae, até que estudos moleculares detectaram sua polifilia (James & Davidson, 2012). Relatos sobre minhocas da EAB (Estrada de Ferro de Amapá) incluem os gêneros *Glossoscolecidae Righiodrilus*, *Diaguíta*, *Glossodrilus*, os gêneros *Rhinodrilidae Pontoscolex*, *Rhinodrilus*, *Urobenus*, *Atatina*, *Ocnerodrilus*, e o gênero *Acanthodrilidae, Dichogaster* (RIGHI et al., 1978; RIGHI, 1972, 1985, 1988; ZICSI & CSUZDI, 1999; ROUSSEAU et al., 2010; Dos SANTOS et al., 2017). Embora existam registros de espécies do gênero *Andiorrhinus* no estado do Pará (MARICHAL et al., 2017), esse gênero nunca foi relatado na EAB. O gênero *Rhinodrilidae, Andiorrhinus* e *Cognetti*, 1908, inclui 39 espécies distribuídas na Venezuela (19), Brasil (10), Bolívia (4), Colômbia (3), Paraguai (1), Chile (1) e Guiana (1).

Righiodrilus Zicsi (1995) é um gênero que possui 27 espécies, distribuídas principalmente na região amazônica da América do Sul. Uma importante compilação das descrições

das espécies desse gênero foi realizada por Righi (1995), que anteriormente as havia classificado como *Glossodrilus*. A diferença entre os dois gêneros está na ausência do reservatório em *Glossodrilus* e na estrutura da glândula calcária (ZICSI, 1995). *Righiodrilus* tem distribuição no Brasil, Equador, Colômbia e Venezuela (CELIS & RANGEL, 2015). Feijoo e Celis (2010) acrescentaram três novas espécies e apresentaram uma chave de identificação para as espécies de *Righiodrilus*. Em 2015, foi descoberta outra nova espécie na Colômbia (CELIS & RANGEL, 2015).

O termo "biodiversidade" é frequentemente mencionado tanto no discurso popular quanto na literatura científica, mas muitas vezes é usado sem uma definição clara, principalmente porque geralmente associamos biodiversidade à riqueza de espécies. No entanto, a biodiversidade pode ser compreendida em diferentes escalas, abrangendo não apenas a diversidade de espécies, mas também a variedade de tipos de comunidades presentes em determinadas regiões, como desertos e florestas em diferentes estágios de sucessão. Devido à ampla gama de significados atribuídos ao termo, é necessário definir de forma específica o seu uso prático (BEGON, TOWNSEND e HARPER, 2006).

Existem diversos fatores que influenciam a abundância das diferentes populações, ocasionando que exista muita heterogeneidade na riqueza de espécies, portanto a determinação ecológica da "biodiversidade" envolve cálculos métricos de certos parâmetros que compõem a biodiversidade e que representam não só a diversidade biológica em termos de número de espécies da região ("riqueza"), mas também, resgatam o valor do impacto ou dominância das espécies dentro dos ecossistemas em termos de abundância relativa ou "equidade" (ARAUJO, 2007; BEGON; TOWNSEND; HARPER, 2006).

Até o ano 2015, aproximadamente 6.200 minhocas haviam sido descritas globalmente (CSUZDI; SZLÁVECZ, 2016), das quais se estima que 3.200 sejam realmente válidas (CSUZDI, 2012). Os registros para o Brasil apresentam aproximadamente 336 espécies/subespécies de minhocas (BROWN et al., 2013), mas estima-se a presença de até 1.400 espécies. De fato, muitas novas espécies foram coletadas em território brasileiro nos últimos anos, as quais se encontram em coleções institucionais aguardando serem descritas.

Aproximadamente 85% das espécies de minhocas reportadas para o Brasil são nativas (BROWN; JAMES, 2007), as quais ao serem somadas as exóticas representam um total de nove famílias, algumas delas provenientes de diferentes continentes. A maioria das espécies nativas coletadas no Brasil pertence às famílias Glossoscolecidae (MICHAELSEN, 1900), Rhinodrilidae (BENHAM, 1890); Reclassificada por (JAMES, 2012), Ocnodrilidae (BEDDARD, 1891), Acanthodrilidae (CLAUS, 1880), Almidae (DUBOSCQ, 1902) e Criodrilidae (VEJDOVSKY, 1884).

Como representantes das famílias exóticas temos: Lumbricidae (13 espécies),

Megascolecidae (11 espécies), algumas espécies pertencentes à família Criodrilidae (8 espécies) Ocnerodrilidae (7) e Acanthodrilidae (12) e Eudrilidae (2 espécies). Os gêneros que apresentam maior diversidade de espécies dentro da família Glossoscolecidae e Rhinodrilidae são: *Glossoscolex* (46 espécies/subespécies), *Righiodrilus* (30 espécies/subespécies) e *Rhinodrilus* (29 espécies/subespécies), respectivamente.

Os principais estudos sobre diversidade de minhocas ocorreram no Sul do Brasil (BROWN; FRAGOSO, 2007; BARTZ et al. 2014; GERUSA et al. 2018), enquanto as regiões do norte e nordeste apresentam poucos relatos de levantamento de diversidade de oligoquetas (BROWN; FRAGOSO, 2007). Os primeiros estudos na região norte começaram com relatos de ocorrências e descrições de espécies novas (RIGHI, 1972, 1985; RIGHI; AYRES; BITTENCOURT, 1978; ZICSI; CSUZDI, 1999) em pontos específicos dos estados do Pará e Maranhão. Na Amazônia oriental brasileira existem apenas três trabalhos com a estimativa da diversidade de oligoquetas (CASTILHO et al., 2016; MARICHAL et al., 2010a; ROUSSEAU; SILVA; CARVALHO, 2010). Considerando as últimas publicações de espécies novas (HERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2018a, 2018b, 2018c; SANTOS et al., 2017a) existem onze gêneros de minhocas reportados para a Área de Endemismo de Belém (AEB): *Pontoscolex*, *Dichogaster*, *Rhinodrilus*, *Glossodrilus*, *Urobenus*, *Atatina*, *Diaguita*, *Righiodrilus*, *Andiorrhinus*, *Holoscolex*, *Brasilisia*, *Arraia*, *Liodrilus* e *Hyperdrilus* incluídos em quatro famílias (Glossoscolecidae, Rhinodrilidae, Acanthodrilidae e Ocnerodrilidae) (SOUSA et. al 2020abc).

2.5 DNA Barcoding

Os primeiros estudos que utilizaram ácidos nucleicos e proteínas para a identificação de espécies foram introduzidos em 1965 por ZUCKERKANDL e Pauling (1965). Em 1982, um artigo discutindo a hibridação DNA-DNA e mapas de restrição já sugeriu o uso dessas técnicas. O sequenciamento de DNA se expandiu na década de 1990 e se tornou rotineiro em 2003. Uma proposta apresentada em 2003 (HEBERT et al., 2003c) atraiu grande atenção ao introduzir o termo "código de barras de DNA" e estabelecer um objetivo ambicioso: mapear a biodiversidade e testar essa nova tecnologia para as 10 a 15 milhões de espécies de animais potencialmente existentes (GROOMBRIDGE, 1992; SAGE, 2020). A eficiência de identificação de 100% das espécies foi prometida, estimando-se na época que levaria 10 anos para sequenciar e catalogar os códigos de barras de DNA. No entanto, avanços significativos em tecnologias de sequenciamento molecular permitiram a obtenção de 10 milhões de sequências de DNA de forma mais rápida. Em um trabalho recente, foram estudadas 1.085.000 amostras e obtidas 930.000 sequências de DNA (HEBERT et al., 2016).

A identificação e classificação de espécies têm sido tradicionalmente realizadas por taxonomistas especializados, que desempenham um papel fundamental na nomenclatura e são essenciais para numerosos estudos biológicos. No entanto, questões cruciais sobre a biodiversidade de oligoquetas ainda precisam ser melhor compreendidas, incluindo a observação e caracterização por parte dos taxonomistas, bem como a validação da identificação e classificação das espécies por meio de ferramentas moleculares (HAJIBABAEI et al., 2006; ROUGERIE et al., 2009b). Novas chaves taxonômicas também são necessárias para auxiliar nesse processo.

A importância tanto do conhecimento clássico (taxonomia tradicional) quanto do uso de ferramentas moleculares (DNA barcoding) fortalece a necessidade e a importância de estimar a biodiversidade, garantindo a biossegurança e a proteção das espécies (ROUGERIE et al., 2010). Para alcançar esses objetivos e obter sucesso em programas de ação que enfatizam a pesquisa da biodiversidade, são necessárias redes globais eficientes e com capacidade de identificar todas as espécies descritas. Como expressou claramente Dayrat (2005), "delimitar corretamente os limites das espécies - e identificar as espécies - é crucial para a descoberta da diversidade da vida, pois determina se diferentes organismos individuais são membros da mesma entidade ou não".

A abordagem do DNA barcoding se baseia na premissa de que uma sequência padronizada curta pode distinguir indivíduos de espécies, uma vez que a variação genética entre as espécies é maior do que a variação dentro delas. Essa abordagem já foi bem descrita em estudos envolvendo pássaros (KERR et al., 2007; LIJTMAYER et al., 2012; TAVARES et al., 2011; TAVARES & BAKER, 2008), peixes (SHOLIHA et al., 2020; WARD, 2009), aranhas e lepidópteros (ASHFAQ et al., 2017; BLAGOEV et al., 2009; LUONG et al., 2016). Além disso, o sistema de DNA barcoding também tem sido relatado como eficaz em outros grupos, como plantas (HUSSAIN et al., 2020; THONGKHAO et al., 2020; WANG et al., 2020), macroalgas (EVANS & MANN, 2009; FEI et al., 2020; ORTEGA et al., 2020; PAUL & UDHAYA, 2020), fungos, protistas (KULIK et al., 2020; SINGH & SINGH, 2020; WANG et al., 2020) e bactérias (KRESS et al., 2015; Paul et al., 2020; VALENTINI et al., 2009).

A mitocôndria ocupa uma posição relevante nos estudos da biologia celular devido ao seu potencial para inferir o passado evolutivo e demográfico tanto da população quanto da espécie (BEREITER-HAHN & VÖTH, 1994). Sua capacidade de fusão, translocação dentro da célula e ocupação de até 25% do espaço celular tornam essa organela um alvo de estudos. A maioria das células eucarióticas contém várias cópias do DNA mitocondrial (mtDNA) (SOMERO, 2002). Cerca de 37 genes são codificados pelo mtDNA, sendo 24 responsáveis pelo maquinário translacional da própria mitocôndria (22 tRNAs e dois rRNAs). Os outros 13 genes codificam subunidades da cadeia de transporte de elétrons, onde carboidratos e gorduras são oxidados para gerar dióxido de carbono

(BALLARD & WHITLOCK, 2004).

Para os animais, o marcador genético selecionado da mitocôndria é o fragmento do gene mitocondrial chamado citocromo oxidase subunidade I (COI ou COX1). A seleção da mitocôndria para estudos de evolução e identificação das espécies deve-se à sua alta taxa de substituição. Em princípio, qualquer gene mitocondrial poderia ser utilizado, porém, com uma taxa de substituição menor. No entanto, são utilizados marcadores universais adequados para identificar um grande número de espécies, os quais podem ser usados para regiões conservadas dentro do genoma (BALLARD, WHITLOCK, 2004; BERNT et al., 2013). Dessa forma, esses marcadores universais funcionam com sucesso nos mais diferentes tipos de Metazoa. Além disso, existem conjuntos de iniciadores mais específicos para grupos individuais (FOLMER et al., 1994). A região de interesse desses iniciadores tem aproximadamente 650 pb, o que corresponde ao comprimento de uma leitura confiável em uma reação padrão de sequenciamento Sanger (DARNEL et al., 1990). Em outras palavras, a informação máxima pode ser obtida a partir de uma única reação de sequenciamento (LOBO et al., 2013). O fragmento padrão do gene COX1 foi um marcador ideal para o Metazoa, com exceção dos ramos basais, nos quais nem sempre possui a resolução necessária (HUANG et al., 2008, 2007b; VARGAS et al., 2012).

O conjunto de dados do DNA *barcode* é composto por sequências curtas de vários indivíduos da mesma espécie, geralmente de 5 a 10 indivíduos por espécie. A identificação do DNA por meio do *barcoding* é obtida pelo fragmento do genoma chamado COI (citocromo oxidase subunidade I), que é então comparado com uma biblioteca de DNA *barcode* de referência por meio de uma base de dados. Quando as sequências são alinhadas, formam-se agrupamentos de indivíduos, com uma probabilidade de inferência estatística e um modelo de evolução da espécie proposto para o estudo (CHANG et al., 2009; HUANG et al., 2007B).

O sucesso do DNA *barcode* depende em grande parte da qualidade da amostra e do processamento da biblioteca de referência (HAJIBABAEI et al., 2006). O trabalho segue inicialmente as seguintes etapas: diversos laboratórios de pesquisa em diferentes instituições trabalham em grupos específicos. Os resultados são verificados e aceitos somente em caso de coincidência. Todas as determinações morfológicas são feitas por taxonomistas especializados nesse grupo de organismos, e as amostras são utilizadas como referência.

Como limitações dessa metodologia, temos a idade e a degradação do DNA, o tipo de armazenamento ou a incapacidade de extrair material para análise do DNA sem prejudicar a amostra total. No entanto, alguns pesquisadores já relatam métodos alternativos para analisar amostras de DNA antigas ou menos conservadas provenientes de museus (GILBERT ET AL., 2007; ROHLAND; SIEDEL; HOFREITER, 2004).

Além disso, mesmo que as amostras sejam sequenciadas, a confiabilidade requer também a análise da variabilidade intraespecífica dessas amostras. Portanto, os trabalhos de taxonomistas profissionais que utilizam o sequenciamento de DNA como método auxiliar nas análises morfológicas podem ser considerados como fonte de dados verdadeiramente confiáveis para estudos filogenéticos. Esses trabalhos, que incluem pesquisas sobre a variabilidade genética das espécies, têm aprimorado a caracterização dos indivíduos e reagrupado as espécies mais próximas na escala evolutiva (SHEKHOVTSOV et al., 2019).

Quando se trabalha com qualquer espécie, geralmente ocorre uma formação implícita de grupos pré-existentes por meio de características morfológicas (conhecidos como morfogrupos) ou unidades taxonômicas operacionais moleculares (UTOM) (KRELL, 2004; LALIBERTÉ; LEGENDRE, 2010). O uso de índices clássicos de biodiversidade, como riqueza de espécies, índice de Simpson e índice de Shannon (MAGURRAN, 2013), pode ser complementado por novos índices desenvolvidos para explorar as informações contidas em conjuntos de sequências de DNA obtidas de um único ambiente. Assim, a estimativa de índices de biodiversidade pode ser baseada em UTOMs detectadas por meio do DNA barcode e incorporadas ao estudo de diversidade (BLAXTER et al., 2005), onde as abundâncias relativas de cada tipo de sequência de DNA (UTOM) substituem a abundância relativa clássica de cada espécie estimada a partir do número de indivíduos. Essa abordagem é comum na microbiologia ambiental para estimar diferentes índices de diversidade, como riqueza de espécies, índices de Shannon ou Simpson (por exemplo, Gomez-Alvarez; King; Nüsslein, 2007; Herrera et al., 2007), mas apresenta algum viés quando o número de espécies é muito grande (> 1000) (BLACKWOOD et al., 2007). O uso de UTOMs para estimar a biodiversidade das minhocas já foi relatado (CHANG; ROUGERIE; CHEN, 2009; HUANG et al., 2007b; SHEKHOVTSOV; SHEKHOVTSOVA; PELTEK, 2019).

CAPÍTULO 1: Variability of earthworm's functional traits in eastern Amazon is more species-dependent than environment-pendent.

Authors: André Luiz Raposo Barros^{1,5*}, Márcio Fernandes Alves Leite^{2,6*}, Luis Manuel Hernández-García^{3,7}, Sandriel Costa Sousa^{3,8}, Samuel Wooster James^{4,9*} and Guillaume Xavier Rousseau^{3,10}

¹*Posgraduate Program in Biodiversity and Biotechnology (PPG-BIONORTE/CCBS), Federal University of Maranhão-UFMA, São Luis, Cidade Universitária, Av. dos Portugueses, 1966, Bacanga, CEP: 65080-805, Brazil;*

²*Netherlands Institute of Ecology (NIOO-KNAW), Department of Microbial Ecology, 6708, PB Wageningen, The Netherlands;*

³*Postgraduate Program in Agroecology, Maranhão State University (UEMA), Avenida Lourenço Vieira da Silva 1000, Campus Universitário Paulo VI, Jardim São Cristovão, 65.055-310, São Luís, MA, Brazil;*

⁴*Maharishi University of Management, Fairfield IA, United States;*

*Corresponding author: andreluizraposo@gmail.com (A.L.R Barros), guilroux@yahoo.com.br (G.X. Rousseau)

⁵ <https://orcid.org/0000-0003-0933-9142>

⁶ <https://orcid.org/0000-0002-4943-2213>

⁷ <https://orcid.org/0000-0003-1478-4953>

⁸ <https://orcid.org/0000-0001-6346-6682>

⁹ <https://orcid.org/0000-0001-6758-5726>

¹⁰ <https://orcid.org/0000-0002-2482-4376>

Accepted in European Journal of Soil Biology©

Abstract

Understanding the causes of variability in functional traits is an important question in earthworm ecology. While interspecific variation in anatomical dimensions for the same trait is well accepted, the role of environmental filters, soil degradation, and environmental stress in affecting the variability of functional traits is not well understood. In this study, we sought to determine the relative importance of environmental factors and earthworm species taxonomy on the variability in functional traits within species (intraspecific variability). We focused on eight functional traits including body mass, body length, body diameter, gizzard, gizzard thickness, septum thickness, typhlosole, and gut organic matter. We sampled earthworms of 11 different species in various regions of the eastern Amazon to determine the general responses of different species' characteristics when exposed to various ecosystem and soil conditions. Our results suggest that the functional traits of earthworms are influenced in different ways by environmental conditions. One set of traits, including body mass, body length, and body diameter, was more constant and independent of environmental variability, while another set, including gizzard diameter and length, gizzard muscle thickness, septum thickness, typhlosole, and intestinal organic matter, was more sensitive. The most affected by different environmental variables was septum thickness. We also examined which environmental factors are most important for trait variability. Our study highlights the importance of considering both environmental factors and taxonomic classification when studying the variability of functional traits within earthworm species. Overall, our results suggest that taxonomic classification alone is a good guide for estimating the major functional traits of earthworms in the Brazilian Amazon, but local conditions can their variability is which is essential

1. INTRODUCTION

Earthworms are undoubtedly one of the essential soil biota components contributing significantly to soil formation, structure, and nutrient cycling [1]. Earthworms change chemical and physical properties in soil and influence processes that improve fertility [2]. For example, terrestrial oligochaetes stimulate plant growth by increasing plant N availability [3]. Also, by burrows activities, construction of galleries and casting, earthworms affect physically the soil properties increasing the water retention capacity, accelerate the soil drainage, and the mucus and carbon in cast improve the resistance of soil aggregates [4]. To understand the role of earthworms in soil processes and their environmental responses, researchers studied their characteristics and classified them into functional groups [5–7].

In 1959, Lee [8] used discrete categories to group Megascolecidae earthworms from New Zealand in three categories based on the soil horizon: litter, topsoil, and subsoil [8]. Later, in 1972, Bouché suggested classifying European lumbricids into three ecological categories (epigeic, anecic and endogeic) based, among other things, on feeding behavior and burrow construction [9]. However, the original proposal did not include a relationship between earthworms and soil properties [9]. This is because the classifications combine several morphoanatomical conditions into a single definition (i.e., epigeic, endogeic, or anecic), some researchers have recommended measuring more accurate data related to the evolutionary history of species for functional studies [6]. According to Violle et al., [10] functional traits include morphological, physiological, phenological, or behavioral characteristics that are expressed in phenotypes of individual organisms and are relevant to understand the response of such organisms to the environment or their effects on ecosystem properties. Pey et al. [11] propose distinguishing between performance traits, which encompass growth, reproduction, and survival (fitness), and morphological, phenological, and physiological characteristics ("M-P-P" traits). Furthermore, traits that have a direct impact on ecosystem processes are categorized as effect traits, while traits linked to individual responses to

the environment are commonly referred to as response traits. [12].

Studying functional trait composition provides insights into the impact of environmental filters and the role of species interactions on driving community assembly. Functional traits are better to explain community patterns than taxonomic composition because of their relationship with life histories, links to the organism's fitness, and response to different environmental conditions [13–15]. Albeit informative, these relationship with environmental filter also introduce variability of earthworm traits at individual level (intraspecific variability) and may need to be accounted when characterizing the functional traits of earthworm community [15,16].

In earthworm ecology, a pivotal question arises: what are the main drivers of variability in functional traits? [16]. The interspecific variation (the variability at species level) is more commonly approached than intraspecific variability by considering that species from the same genus change in anatomical dimension for the same trait. This condition suggests the possibility of using a few individuals by species to measure characters, as was effectively used for Ants [17,18]. Therefore, an intermediate approach to reducing the workload is to select a small subset of individuals from each species and analyze their functional traits. However, the variability of functional traits for a given species reflects the environmental factors (e.g., local soil conditions, and land-use changes) that can also help predict the variability of functional traits, thus reducing the workload of characterizing those traits. For example, functional trait approaches based on the morphological features of invertebrates are reliable for showing relationships between eco-regions, these relationships are confirmed by the existence of environmental filters that select a subset of species from the regional species pool., with specific traits structures, from a larger set to form a local community [13,17].

The present study aims to understand the relative importance of land use changes, geographical distances, soil properties, and taxa in the intra-species variability of functional traits. We hypothesized that the different species show similar responses in their functional traits towards those variables and an intraspecific variation of traits when taxa are widely distributed.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Earthworm Sampling

Earthworm specimens were selected from the Soil Invertebrates Collection located in the Soil Biology Laboratory at the Maranhão State University and the information on the soil properties and geographic conditions was obtained from the samples and sites in which each specimen originated. Earthworms were sampled from 2010 to 2014 in circular plots with a radius of 25 meters following the Tropical Soil Biology and Fertility method (TSBF) with some modifications [19,20]. We modified the TSBF method by employing five equally spaced monoliths measuring 25x25cm, which were excavated at a distance of 25m. The litter and 0-10cm layers were manually examined to sort the earthworms. After 2015, plots were represented by a circular area of 1 hectare, as recommended by Decaëns et al. [21]. A centered equilateral triangle was used as a reference to collect three monoliths 25x25cm x 20cm (width, length, and height). Qualitative sampling was carried out in all suitable microhabitats for earthworms, including organo-mineral and holorganic soil layers, litter accumulations, decaying trunks, epiphytic soils, termite nests, earthworm casts, cattle dung, and necromass. All the samplings were aimed to assess the effects of land use changes on the earthworm community in the Belém Endemism Area. The sampling encompassed a gradient of land uses, ranging from conserved forests to various agricultural practices, including slash and burn crops, slash and mulch crops, pastures (pastures+native grassland), secondary forests of different ages, and conserved and degraded old-growth forest remnants, as described in the Supplementary Tables S1 and S2.

2.2 Functional Traits Characterization

To understand the drivers of functional trait variability, previous studies used categorical approaches to classify the traits of earthworms, such as pigmentation, gizzard size, and typhlosole [22]. For example, gizzard size and typhlosole development have been measured as categorical data: absent, small/simple, medium/complex, large/very complex [23]. However, relying on categorical data presents a challenge to the standardization and reproducibility of the measurement due to its subjective nature, since the classification depends on individual observations. To overcome this limitation, in our study, we opted for quantitative approaches, using metric data instead of categorical or class-based measurements. This decision allowed for more accurate estimations and reduced the subjectivity associated with trait classification.

The functional traits proposed in this research were evaluated according to Guilherme et al., [24] on adult/clitellate specimens. To select what functional traits to measure in our study we followed the criteria from BETSI database (<http://betsi.cesab.org/>) which aims to promote the use of trace-based approaches in soil invertebrate ecology in addition to providing a reference framework for archiving soil invertebrate trace data. The measured data of the earthworm traits with some modifications as expressed in Table 1. Hence, the traits measured in this study were body mass(g), body length (mm), body diameter (mm), gizzard development (diameter vs length, mm), gizzard muscle thickness (mm), septa thickness (mm), the occupancy of the typhlosole (%) and organic matter gut (%).

Body size in earthworm is an important indicator of strength and burrowing ability [23]. In big earthworms, it is positive related to body length, mass and body diameter. Since larger earthworms delay reaching reproductive maturity [25], highest values of these traits are expected in undisturbed areas, where larger and heavier individuals could be more successful [26]. Large earthworms have a thicker cuticles and epidermis [27], which is expected to be determinant in reducing water loss and resistance to drought condition. There are some viability costs of becoming

large [28], and in earthworms, growing represents an important energy cost.

In tropical soils with low sources, gizzard increase the chance of survival [9]. Earthworms use gizzards to maximize the digestion process reducing the particle size, chemically degrading nutrients and regulating the feed flow [29]. In Brazil, out of the 38 large earthworms recorded, 36 belong to Glossoscolecidae and Rhinodrilidae families, whose main characteristic is a strong gizzard in the segment six. Lignified source could be environmental filters selecting adaptations in gizzard muscle thickness with more compression strength.

The earthworm tegument is also a reflection of species ecology concerning burrowing activities [27], as cephalic region exerts the greatest digging pressure [23]. Traits related to pre-clitellar septa thickness could be selected in species living deeper.

The typhlosole is an invagination in the gut that forms the dorsal lamina of the intestine, which is expected to increase the assimilation of organic matter digested in the gut [23]. Earthworms living in soil with low organic matter contents are expected to have more complex typhlosole occupying the intestine [9]. Marichal et al. [23] found that 40% of earthworm sample in Amazon Forest were related to burrowing activities, where gizzard and typhlosole have an important function.

To estimate the occupancy of the typhlosole (%) in the intestine was used the relation between the diameter of intestine (in cross section) and the length of typhlosole obtained by micrometer.

In this study, we consider the use of organic matter preference (OM) as an ecological preference trait. According to Pey et al. [11], an ecological preference trait refers to the optimum and/or breadth of a trait on an environmental gradient. It is considered "functional" when it influences the performance of the organism and hence its fitness. Earthworms' selective behavior towards organic matter increases their energy acquisition, resulting in biomass growth and improved survival. OM preference was estimated visually as the relation of the length in occupancy of dark

soil, necromass or fragment of dead leaves over the total length of earworm gut (%). A minimum value of 0% for organic matter content was assigned when the gut was filled with sand particles, clay, or a mixture without any residual necromass or organic matter-related particles. Simultaneously, we observed variations in the colors of the intestinal organic matter content in earthworms.

Clique ou toque aqui para inserir o texto..

Table 1. Functional traits proposed by the BETSI platform and modifications proposed in this work.

Trait type	Characteristic features	Existing measurement unit	Proposed measurement unit	of Reference
Performance Traits	Weight	Gram	Gram	[50]; [22]; [24]
Ecological Preference	<i>Soil preference C/N</i>	low, high (Binary)	MO, absent = 0, present = %	[24] This study
Population parameter	<i>Length</i>	Mm	Mm	[50]; [22]; [24]
Population parameter	<i>Diameter</i>	Mm	Mm	[50]; [22]; [24]
Population parameter	<i>Development of typhlosol</i>	0=absent, 1=simple, 2=complex, 3=very complex	% Occupancy in the intestine	This study
MPPB Traits	Body Thickness	Fine, intermediary, thickness (0,0.5,1)	Millimeter	[51]
MPPB Traits	<i>Gizzard development</i>	0=absent, 1=poorly developed, 2=medium developed, 3=very developed	Millimeter (average, diameter + length, gizzard muscle thickness)	This study

1

2

3 2.3 Geographic and land use variability of earthworms

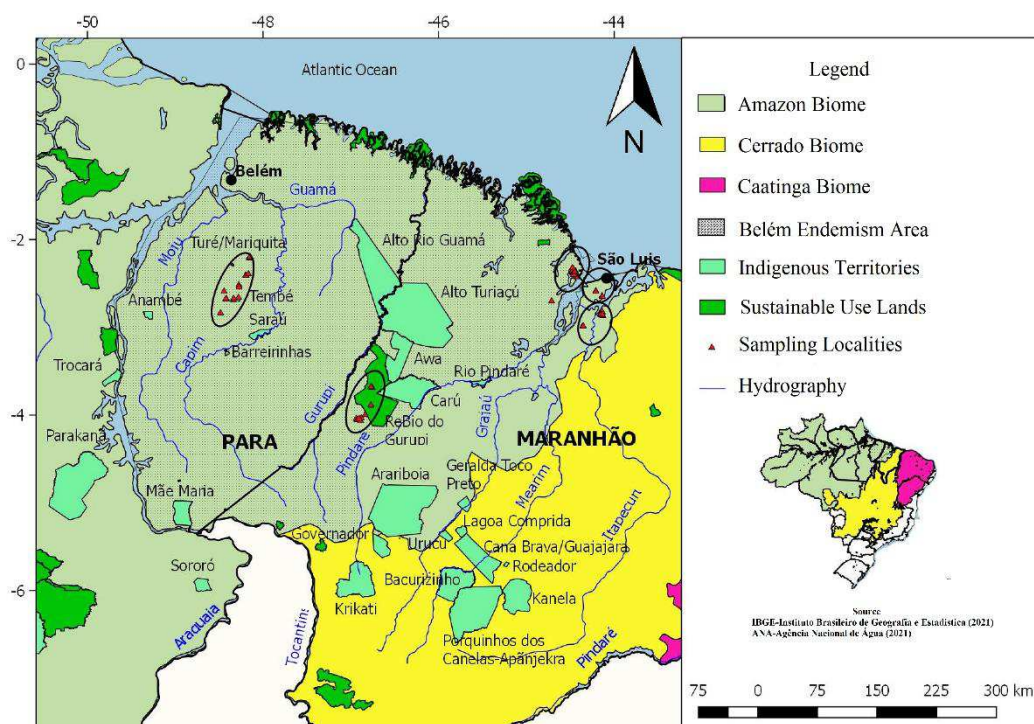
4 The selected individuals come from four different land use and were collected in 7 different
 5 locations, 6 in the State of Maranhão and Pará, Brazil were: Centro Novo do Maranhão and Itinga
 6 do Maranhão (3°46' S; 46°44' W) (samplings inside or near the Gurupi Biological Reserve), São
 7 Luís (2°34' S; 44°16' W), Alcântara (2°24' S; 44°24' W), Rosário (2°56' S; 44°14' W), São José de
 8 Ribamar (2°32' S; 44°04' W), and Tomé-Açu (2°24' S; 48°09' W) (Figure 1). Supplementary table
 9 S2, shows the occurrence of the selected individuals across the different land use and counties.
 10 According to Köppen's classification, the climate varies from, tropical rainforest (Af), and monsoon
 11 (Am) [30]. The average annual temperature ranges between 28.0-29.4°C and precipitation varies
 12 between 1468-2059 mm [31]. The area is located in the Itapecurú formation with soils mainly of the
 13 yellow Latosol and Plintosoils type [32]. The topography changes by location with undulated form
 14 in the Gurupi Biological Reserve, São José de Ribamar, Rosário, and Tomé-Açu. and plain at
 15 Alcântara and São Luis [33]. The typical native vegetation is categorized as Dense Ombrophyllous
 16 Forest [34] (Tomé-Açu, Centro Novo and Itinga), and Open Ombrophyllous Forest with coastal
 17 influence (Alcântara, São Luís, São José de Ribamar, and Rosário). Earthworms used for functional
 18 traits were not present in all land uses as shown in Supplementary Table S1, we discuss the influence
 19 of this phenomenon in our analysis in section 2.5.

Supplementary Table S1. Occurrence of earthworms used in this study from various municipalities in the states of Pará and Maranhão in the Brazilian Amazon region. Legend: The numbers in parentheses indicate the number of earthworms. Anel - *Arraia nelmae*; Abar - *Andiorrhinus (Turedrilus) barrosoi*; Amir - *Andiorrhinus (Turedrilus) miricuri*; Bpun - *Brasilisia punki*; Ocn - *Ocnerodrilidae* gen.n; Dbol - *Dichogaster bolau*; Hala - *Holoscolex alatus*; Hdos - *Holoscolex dossantosi*; Hfer - *Holoscolex Fernandoi*; Pcor - *Pontoscolex corethrurus*; Rgur - *Righiodrilus gurupi*.

Rosário	Centro Novo	Itinga	Tomé-Açu	Alcântara	São Luís - Fazenda Escola (UEMA)	São José de Ribamar - Sítio Aghuay
Abar (1), Anel (2)						

Anel (2), Pcor (5),	Amir (1), Abar (1), Hfer (3)	Abar (1),	Pcor (5)	Abar (1), Bpun (9), Pcor (5), RG (2)	Pcor (5)	Bpun (5)
	Amir (4), Hala (1), Hdos (5), Hfer (8), Pcor (2), Rgur (6)	Abar (1), Amir (2), Ocn (5), Dbol (5),				Pcor (5)
	Hala (5), Abar (3)					

20



21

22 Figura 1. Sampling locations of total oligochaetes from the Soil Invertebrates Collection in the Soil
 23 Biology Laboratory from Maranhão State University in the Eastern Amazon. Source: IBGE-
 24 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2021) and ANA-Agência Nacional de Água (2021).

25 2.4 Earthworm collection and sample preparation

26 The earthworms collected in the field were preserved in 96% alcohol at 1:3 biomass to
 27 ethyl alcohol volume ratio. Alcohol was changed every 24 h for three days after collection,
 28 followed by a final preservation stage with ethyl alcohol (99%). Clitellated species were not
 29 present in all land use types as the native species *Holoscolex fernandoi* (Hernández et al. 2018)

30 and *Andiorrhinus (Turedrilus) barrosoi* (Hernández-García et al. 2018) were present in only 5 out
31 of 16 land uses sampled, while *Holoscolex alatus* (Hernández-García et al. 2018) and an unknown
32 Ocnernodrilidae genus were present in only two (see Supplementary Material Table S2. A
33 minimum of 4 adult individuals per species were randomly selected, and for those that were
34 abundant and widely distributed, 5 individuals were selected per land use. A total of 100
35 individuals belonging 11 species were measured: *Andiorrhinus (Turedrilus) barrosoi* (Hernández-
36 García & James 2018) (Abar, 8 specimens); *Andiorrhinus (Turedrilus) miricuri* (Hernández-García
37 & James 2018) (Amir, 7 specimens); *Brasilisia punki* (Hernandez-Garcia & James, n. sp. 2018)
38 (Bpun, 14 specimens); *Ocnodrilidae* (Beddard, 1892) gen.n (Ocn, 5 specimens); *Dichogaster*
39 (*Diplotheodrilus*) *bolau* (Michaelsen, 1891) (Dbol, 5 specimens); *Holoscolex alatus*
40 (Hernández-García, Burgos, Rousseau & James 2018) (Hala, 6 specimens); *Holoscolex dossantosi*
41 (Hernández-García, Rousseau & James 2018) (Hdos, 5 specimens); *Arraia nelmae* Hernandez-
42 Garcia & James. 2018) (Anel, 4 specimens); *Holoscolex fernandoi* (Hernández-García, dos Santos,
43 Rousseau & James 2018) (Hfer, 11 specimens); *Pontoscolex (Pontoscolex) corethrurus* (Muller,
44 1857) (Pcor, 27 specimens); *Righiodrilus gurupi* (Hernández-García, Rousseau & James 2017)
45 (Rgur, 8 specimens). *Pontoscolex (Pontoscolex) corethrurus* (Muller, 1857) is considered by some
46 authors as a peregrine species for Amazon region out the Guyana shield [35,36]. The earthworm's
47 species were previously identified and described anatomically by Dos Santos et al. [37],
48 Hernández-García et al. [38–41] and Sousa et al. [42,43].

49 2.5 Soil analysis

50 Soil samples were collected in duplicate adjacent to each TSBF monolith using metallic
51 cylinders with a volume of 566 cm³ at depths of 0-10 cm and 10-20 cm. A 40 g subsample of each
52 replicate was oven-dried at 105°C to determine moisture values. We assessed soil bulk density and
53 particle size (sand, silt, and clay percentages) as indicators of soil physical properties. Bulk density
54 was calculated by dividing soil dry mass by cylinder volume. Samples collected at the same depth

55 from each plot were combined to create composite samples, which were used to estimate physical-
56 chemical parameters. Soil particle size was determined using the densitometry method after air-
57 drying and sieving [44]. Each sample was analyzed for pH (using a 0.01 M CaCl₂ suspension with
58 a soil/solution ratio of 1:2.5 v/v), P-availability (extracted using Amberlite IRA 400 resin), and
59 exchangeable K (Mehlich I), Ca, Mg (KCl extraction), and H+Al (extracted using the SMP
60 method) according to standard methods of the Agronomic Institute of Campinas [45]. Cation
61 exchange capacity (CEC) was calculated as the sum of K, Ca, Mg, and (H+Al), while the sum of
62 bases (BS) was calculated as the sum of K, Ca, and Mg. Base saturation percentage (V%) was
63 calculated as $BS/CEC*100$.

64 *2.6 Statistical Analysis*

65 *2.6.1 Functional traits*

66 First, we described the variability of the earthworm traits using boxplot and compared the
67 differences between species using a linear regression model and Tukey test with
68 heteroscedasticity-consistent estimation of the covariance matrix to allow analyze the variables
69 that did not presented homogeneous variance [46]. The Tukey test highlighted the importance of
70 including species as an explanatory variable when trying to determine the general effects of
71 environmental conditions, such as land use, soil properties and geographic distance.

72 To evaluate how functional traits respond to the changes in soil properties and land uses,
73 we adapted the hierarchical model of species communities (HMSC) from HMSC R package [47].
74 The HMSC approach belongs to the category of joint models, which allow modelling the effects
75 of a set of covariates on multiple response variables. Originally, HMSC framework was conceived
76 to joint model the combination of data on phylogenetic relationships, functional traits,
77 environmental covariates along with Spatio-temporal context (geographic distances) and see how
78 those factors can explain the structure of species communities (e.g., explaining the abundance

79 and/or occurrence of different taxa) found in different ecosystems. Later, alternative uses of the
80 framework were proposed to study not only the changes in abundance or occurrence, but other
81 types of observation. For example, Opedal and Hegland [48] used the HMSC framework to model
82 pollinator foraging choices. Similarly, our use of the HMSC framework is done to model individual
83 level variability of the functional traits. Consequently, the set of functional traits measured for each
84 specimen corresponded to our response variables (earthworm specimen as the sampling unit) and
85 the earthworm species, soil properties/variables, land uses, and geographic distances were used as
86 our explanatory variables. The earthworm species were considered as random variable to observe
87 general response on the functional traits. The information on the soil properties were obtained from
88 the physico-chemical analysis performed after the sampling and the land use and geographic was
89 recorded from the site were each earthworm specimen originated. As geographic distance we used
90 the Euclidean distance calculated from the UTM coordinates of the sampling sites.

91 Another advantage of considering the species as a random effect is that earthworm's
92 species do not need to be present in all the different land uses. For example, the specie
93 (*Andiorrhinus (Tuedrilus) miricuri*) a large worm with a high body mass when compared to values
94 that could mask the environmental effect. In summary, our response variables consisted of the table
95 of functional traits for the different individuals selected, then as explanatory factors we used (i)
96 the geographic location where the selected earthworms were collected, (ii) the information on the
97 soil properties, and (iii) their taxonomic classification as the random effect. Altogether, the analysis
98 focus on the trait variability that was not explained by inter-specific differences

99 Since these are models based on Bayesian statistics, we use Markov chain simulations to
100 estimate the regression and correlation coefficients of the potential interactions between the
101 dependent variables and the covariates. Three models were used: the first model, called the null
102 model, does not account for the influence of soil, land-uses and geographic distance on the
103 variability of functional traits; the second model (model A) incorporates soil variables, and the
104 third model (model B) also includes geographic distance as an explanatory variable of the observed

105 trait variability. Since not all species were present and selected in the different areas, we considered
106 the geographical distance between the points as a variable in the hierarchical model. [49].

107 For each model, we estimated the regression coefficients using six Markov chains with
108 4000 iterations each, discarding the first 1000 as burn in. The effective sampling size (nESS) of
109 the chains was high for most parameters, and the potential scale reduction factor (psrf) was always
110 close to one. To ensure that the chains reached stable estimates of the regression coefficients, we
111 performed effect-size analysis and Gelman and Rubin's convergence diagnostic. From the three
112 models, we sought to determine which of the three sets of explanatory variables (null model with
113 no covariates; model A with only soil variables; and model B with geographic distance) are
114 necessary for a good prediction of the functional traits. For this we conducted a two-fold cross-
115 validation, dividing the data into two randomly selected subsets to assess their predictive
116 performance separately for each functional trait. The predictive performance was assessed with R^2
117 and RMSE for the three different models. We also used the Widely Applicable Information
118 Criterion (WAIC) from the Hmisc package [47] in each of the three models to identify the best
119 model. In summary, we divided our analysis of the HMSC models into two stages: (i) evaluating
120 the models explanatory power and (ii) predictive performance for the three different models tested.

121 From the three models, we determined which of the three sets of explanatory variables
122 (from the simplest to the most complex model) are necessary for a good prediction of the functional
123 traits studied. To do this, we conducted a two-fold cross-validation, dividing the data into two
124 subsets to assess their predictive performance separately for each functional trait.

125 We summarize the effect of the soil variables on shifting the earthworm traits from model
126 B by showing the regression coefficients in which the 90% credible interval does not include zero.
127 We also highlighted the regression coefficients in which the 95% credible interval does not contain
128 zero. With that, we approached the significance of the variables following the language of evidence
129 [50].

130 Another advantage of the HMSC model is its ability to assess the influence of

131 environmental factors while considering correlations between the dependent variables (in our case,
132 the potential correlation between the earthworm traits). This characteristic is fundamental to the
133 present study since some functional traits are strongly correlated (e.g., length and diameter of the
134 earthworms). Thus, the models applied allowed us to capture the variability in the functional traits
135 of Amazonian earthworms in a way that allowed us to verify the relative importance of soil,
136 geographic distance, land use, and taxonomic factors. The dataset used in these analyses has been
137 deposited with the DOI: 10.5281/zenodo.8034485.

138 **3.0 RESULTS**

139 *3.1 Bio-ecological aspects of earthworms*

140 Eleven earthworms species were studied: *A. (T.) barrosoi* (Hernández et al. 2018) (Abar, 8
141 specimens), *A. (T.) miricuri* (Hernández et al. 2018) (Amir, 7 specimens), *R. gurupi* (Santos et al.
142 2017) (Rgur, 8 specimens), *H. fernandoi* (Hernández et al. 2018) (Hfer, 11 specimens), *H. alatus*
143 (Hernández et al. 2018) (Hala, 6 specimens), *H. dossantosi* (Hernández et al. 2018) (Hdos, 5
144 specimens), *A. nelmae* (Hernández et al. 2018) (Anel, 4 specimens), and *B. punki* (Hernández et al.
145 2018) (Bpun, 14 specimens), Ocneroдрilidae (Beddard, 1892) sp.n (Ocn, 5 specimens); one exotic
146 *D. (D.) bolawi* (Michaelsen, 1891) (Dbol, 5 specimens) and one peregrine species *P. (P.) corethrurus*
147 (Muller, 1857) (Pcor, 27 specimens). Only Amir, Abar and Dbol are pigmented (at least dorsally).
148 Dbol was mainly found in dung or organic matter related to cattle activities, living mainly in litter
149 layers (Supplementary Table S2). Unpigmented earthworms were found mainly living in soil
150 microhabitat (Decaëns Method [21]), eating sources poor in organic matter as observed in the
151 intestinal content. Yellow color was observed in the intestinal region of Bpun before fixing in
152 alcohol. The color derived from the chloragogen cells that are responsible for collecting nitrogenous
153 wastes from the coelomic fluid and from the blood that flows in the intestinal walls. Pcor was found
154 mainly in swampy soil in lowlands with medium to high organic matter, this species was absent in

155 the more conserved plots. [47–49] (Supplementary Table S2).

156

157 Table 2. Supplementary Table S2. Supplementary Table S2, Earthworms' bio-ecological aspects and occurrence in different land uses in the State of Pará
 158 and Maranhão, Brazil. Legend: * Land-use with adult earthworms used for functional traits ** total distribution area concerning all plot sampled.
 159 Numbers in parentheses mean number of sites of occurrence.

Species	County	Type Soil	Landuse(sites number)	Length (cm)	Biomass (g)	Pigmentation	Genital marking	Tuberculas Pubertarias	Prostatic pores	Distribution Area (Ha)**
<i>Arraia nelmae</i> (Hernández-García & James 2018)	Rosário	Gleysol	Young Secondary Forest (1)	23-34	0.086-0.092	Absent	Absent	Absent	At ends of grooves, along b line in XVII	443,464
			Advanced Secondary Forest* (1)							
			Advanced AFS*(1)							
			Young AFS*(1)							
			Advanced AFS (1)							
<i>Andiorrhinus (Tuedrilus) barrosoi</i> (Hernández-García & James 2018)	Rosário, Alcântara, Centro Novo do Maranhão, Bom Jardim	Gleysol, Ferrasol	Young AFS* (1)	61-165	0.612-1.28	Darkborwn dorsally, yellow venrally	Absent	smooth straight band shape on BC line in XX–XXIII, (1/3)XXIV	Absent	1979267.260 ha
			Logged Forest(1)							
			Young Secondary Forest* (1)							
			Pasture*(2)							
			Intermediate Secondary Forest*(3)							
			Old-growth Forest* (2)							
<i>Andiorrhinus (Tuedrilus) miricuri</i> (Hernández-García & James 2018)	Centro Novo do Maranhão, Bom Jardim	Ferrasol	Old-growth Forest*(9)	60-245	2.45-7.57	Darkborwn dorsally, yellow venrally	In XVII, XIX–XXIV	Band-shaped near B line in XX–XXV.	Absent	39454.720 ha
			Logged Forest*(8)							
			Intermediate Secondary Forest*(6)							
			Pasture(3)							
<i>Brasilisia punki</i> (Hernandez-Garcia & James, n. sp. 2018)	Alcantara, São José de Ribamar	Gleysol	Old-growth Forest(1)	24-56	0.040-0.172	Absent	Of <i>ab</i> line in VII–XVI as big papillae	Absent	Prostatic pores in XVII on <i>ab</i> line	3187.229 ha
			Logged Forest(1)							
			Advanced Secondary Forest*(2)							
			Intermediate Secondary Forest(1)							
			Young Secondary							

			Forest*(3)							
			Slash-burn(2)							
			Slash-mulch(2)							
			Grassland*(1)							
<i>Ocnero_NG</i> (Beddard, 1892)	Centro Novo do Maranhão	Ferrasol	Old-growth Forest*(3)	25-36	0.025-0.048	Absent	Absent	Absent	Prostatic pores in XVII on AB line	13921.656 ha
			Logged Forest*(6)							
<i>Dichogaster (Diplothecondrilus) bolau</i> (Michaelsen, 1891)	Centro Novo do Maranhão	Ferrasol	Old-growth Forest*(3)	19-24	0.038-0.048	Darkborwn dorsally	Absent	Absent	Prostatic pores in XVII, XIX on AB line	5682223.025 ha
			Logged Forest*(4)							
			Intermediate Secondary Forest*(4)							
			Pasture(8)							
			Slash-mulch(1)							
<i>Holoscolex alatus</i>	Centro Novo do Maranhão	Ferrasol	Old-growth Forest (11)	38-87	0.119-0.362	Absent	On segments VIII, IX at AB line, X-XIV A line.	On XIX–XXII in B line	Absent	51037.833 ha
			Logged Forest* (7)							
			Intermediate Secondary Forest (8)							
			Pasture* (9)							
<i>Holoscolex dossantosi</i> (Hernández-García, Burgos, Rousseau & James 2018)	Centro Novo do Maranhão	Ferrasol	Old-growth Forest*(3)	45-50	0.118-0.174	Absent	As circular papillae in VIII and IX just on AB line and XV to XVIII	On XIX–XXII in B line	Absent	110.619 ha
			Logged Forest*(3)							
<i>Holoscolex fernandoi</i> (Hernández-García, Rousseau & James 2018)	Centro Novo do Maranhão	Ferrasol	Old-growth Forest*(12)	20-73	0.141-768	Absent	Absent	Extended along AB line in XIX–XXII	Absent	57035.784 ha
			Logged Forest*(10)							
			Intermediate Secondary Forest*(7)							
			Pasture(8)							

<i>Pontoscolex</i> (<i>Ponstoscolex</i>) <i>corethrurus</i> (Muller, 1857)	São Luis, São José de Ribamar, Rosário, Tomé Açu, Centro Novo do Maranhão, Alcântara	Gleysol, Arenosol, Ferrasol	Old-growth Forest*(25)	19-66	0.192-0.864	Absent	Four pairs of genital markings are ventrally between the tubercula pubertatis field protruding along the segment	Band-shaped on XIX–(1/2) XXII in BC line	Absent	3333315.323 ha
			Old-growth Riparian Forest(9)							
			Logged Forest*(5)							
			Advanced Secondary Forest*(1)							
			Advanced Secondary Riparian Forest(9)							
			Advanced AFS(1)							
			Intermediate Secondary Forest*(9)							
			Intermediate Secondary Riparian Forest(9)							
			Intermediate AFS(6)							
			Young Secondary Forest*(2)							
			Young Secondary Riparian Forest(9)							
			Young AFS(3)							
			Slash-burn(1)							
			Slash-mulch(1)							
			Pasture*(9)							
Manihot(4)										
<i>Righiodrilus gurupi</i> (Hernández-García, Rousseau & James 2017)	Centro Novo do Maranhão, Alcântara	Ferrasol, Gleysol	Old-growth Forest*(3)	0.26-0.63	0.068-0.292	Absent	Absent	In xvii–xxi within paired bands of tubercula pubertatis with slight	Absent	467887.776 ha
			Logged Forest*(6)							
			Intermediate Secondary Forest*(4)							
			Young Secondary Forest*(2)							
			Pasture(4)							

			Slash-mulch(1)				long groove and associated to genital setae		
--	--	--	----------------	--	--	--	---	--	--

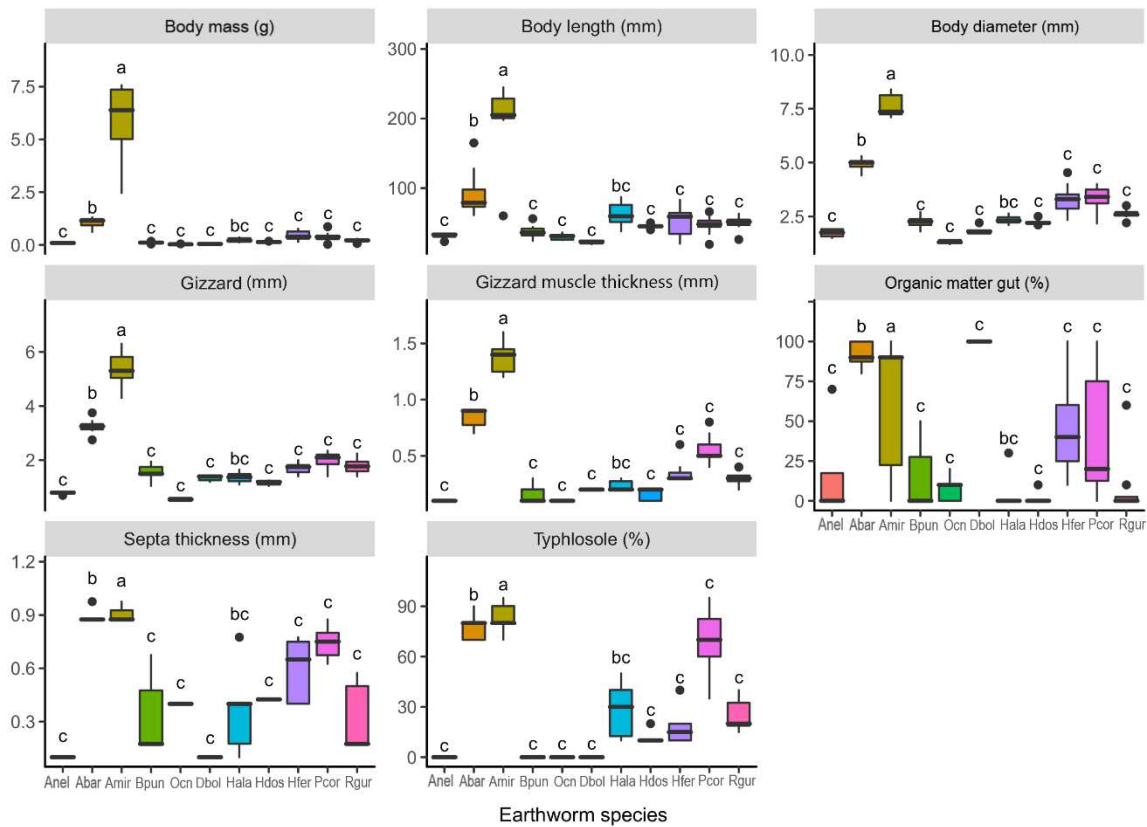
160

161

162

163 3.2 Variability of functional traits in earthworm's species

164 The Hfer, and Pcor species had the highest preference for ingesting organic matter particles
165 (value median 45% and 23%) (Figure 2). In contrast, the traits measured, such as organic matter
166 content and septa thickness, exhibit greater variability across earthworm species. Unpigmented
167 earthworm species tend to inhabit soil layers where these traits vary more, while the largest
168 pigmented earthworm species tend to inhabit intermediate soil-litter layers where these traits are
169 more consistent. The typhlosole occupation was found to be the third most variable trait in
170 unpigmented earthworms that inhabit soil layers. Traits dimensions are positive relate to the size of
171 earthworms.: The large species of *Andiorrhinus* had the greatest development of the gizzard,
172 typhlosole, and septa thickness, as well as, feeding preferentially on more organic matter than others.
173 These two species of *Andiorrhinus* have large bodies (approximately 96 and 208 mm), diameter,
174 body mass and distinct feeding habits (Figure 2). This justifies species-based modeling to investigate
175 the general effects of variables on functional trait variability, hence we choose to consider species
176 as a random factor.



177
 178 Figura 2. Differences in functional traits among oligochaete species. Simple linear model with
 179 adjustment for heterogeneity of variance (gamma distribution). Equal letters do not differ
 180 statistically according to Tukey's test. The linear model was adjusted for heterogeneity of variances
 181 at the 5% probability level. Legend: Anel - *Arraia nelmae*; Abar - *Andiorrhinus (Turedrilus)*
 182 *barrosoi*; Amir - *Andiorrhinus (Turedrilus) miricuri*; Bpun - *Brasilisia punki*; Ocn - *Ocnerodrilidae*
 183 *gen.n.*; Dbol - *Dichogaster bolau*; Hala - *Holoscolex alatus*; Hdos - *Holoscolex dossantosi*; Hfer -
 184 *Holoscolex Fernandoi*; Pcor - *Pontoscolex corethrurus*; Rgur - *Righiodrilus gurupi*

185 3.3 Variability of ecological preferences for different species

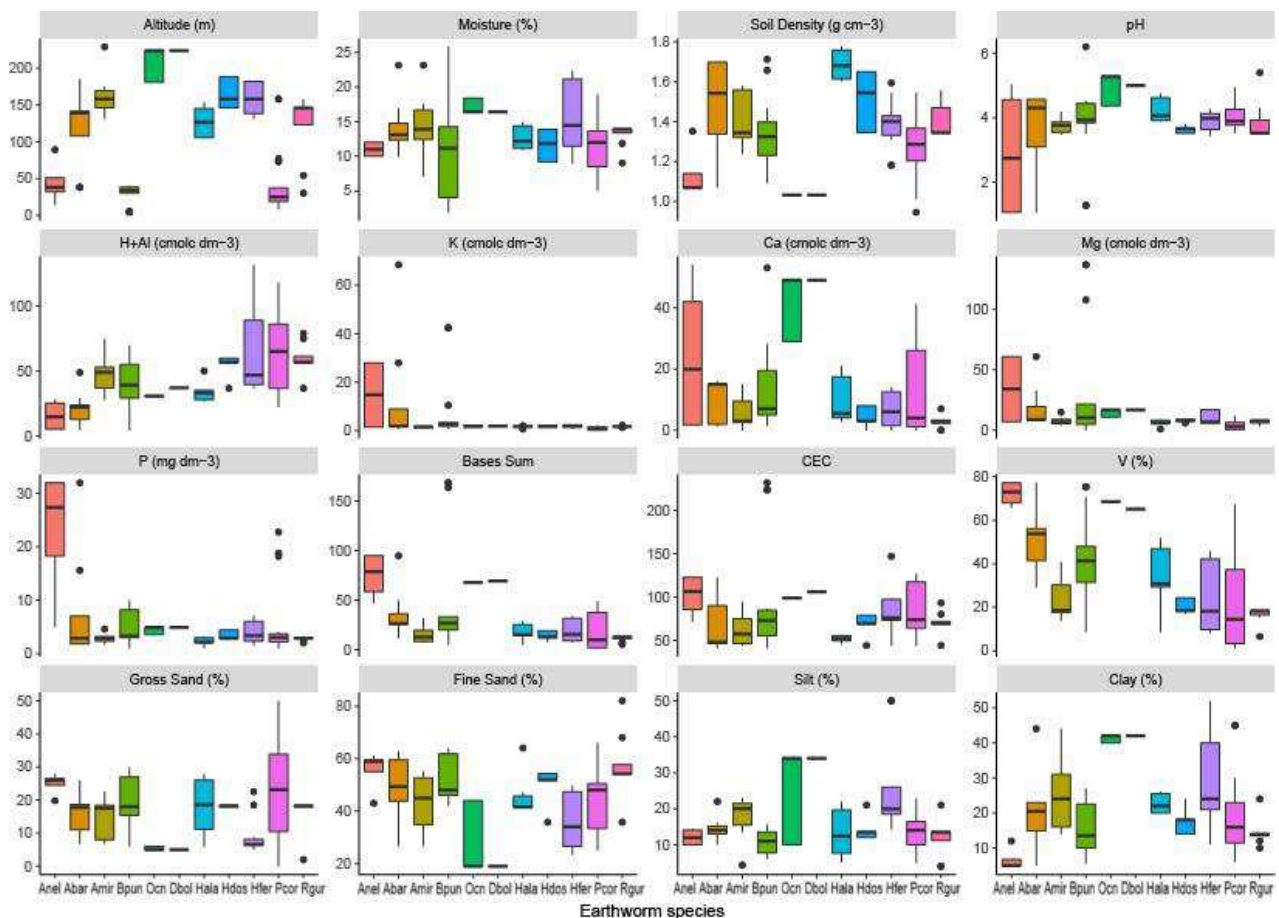
186 Correlation analysis between soil physical properties showed that elevation was negatively
 187 correlated with coarse sand and fine sand, and positively correlated with clay and silt (Table 3). As
 188 elevation became an important variable in models explaining species and trait data, we consider
 189 this variable to represent the condition of a group of soil physical attributes that filter burrowing
 190 adaptations. *D. (D.) bolau* (Dbol) and the unknown *Ocnerodrilidae* genus (Ocn) were collected at
 191 areas more elevated, in soils with low bulk density (approximately 1.0 g cm^{-3}) (Figure 3). On the
 192 other hand, *H. alatus* (Hala) was found on lowest areas, but on soils with higher bulk density than
 193 the previous two species ($1.6\text{-}1.8 \text{ g cm}^{-3}$) (Figure 3). Ocn and Dbol were more susceptible to
 194 physico-chemical attributes, particularly clayey soils, fine sand, and even soils with higher Ca

195 content (Figure 3), whereas in soils with coarse sand and low P value the variability is lower. *P.*
 196 *corethrurus* (*Pcor*) was found in almost all areas but was related to low areas (Supplementary Table
 197 S1 and S2). The earthworms in this study came from 4 different land uses with significant
 198 variability and, because of this, it is necessary to investigate which proportion of functional traits
 199 variability could be explained by soils properties. These effects were explored in detail through
 200 the hierarchical model of communities.

Table 3. Correlations between elevation and soil physical properties that are important for selecting traits related to burrowing activities.

Soil physical attribute	Elevation
Bulk Density	0.07
Coarse Sand	-0.48*
Fine Sand	-0.45*
Silt	0.59*
Clay	0.52*

*= statistically significant with $P \leq 0.05$.



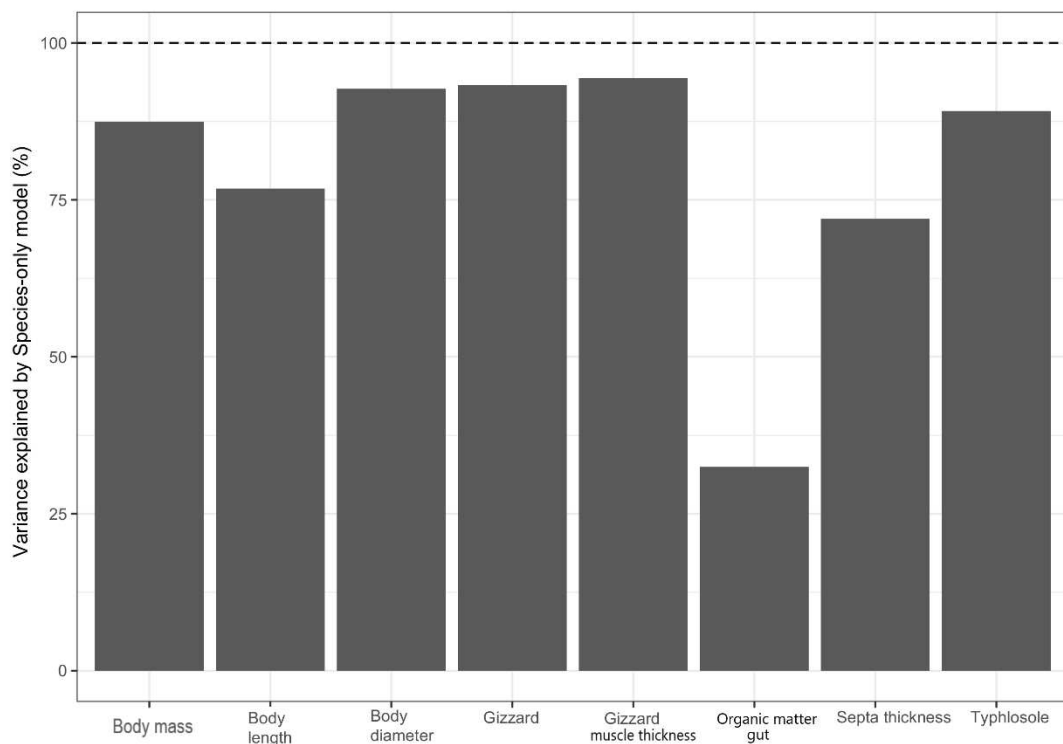
203

204 Figura 3. Ranges of soil attributes where earthworm species were sampled. Legend: AN - *Arraia*
 205 *nelmae*; ATB - *Andiorrhinus Turedrilus barrosoi*; ATM - *Andiorrhinus Turedrilus miricuri*; BP -

206 *Brasilisia punki*; DA - *Dichogaster afinis*; DB - *Dichogaster bolaii*; HA - *Holoscolex alatus*; HD -
 207 *Holoscolex dossantosi*; HF - *Holoscolex Fernandoi*; PC - *Pontoscolex corethrurus*; RG -
 208 *Righiodrilus gurupi*.

209 3.4 Modeling the variability of earthworm functional traits as a function of soils attributes and
 210 taxonomy

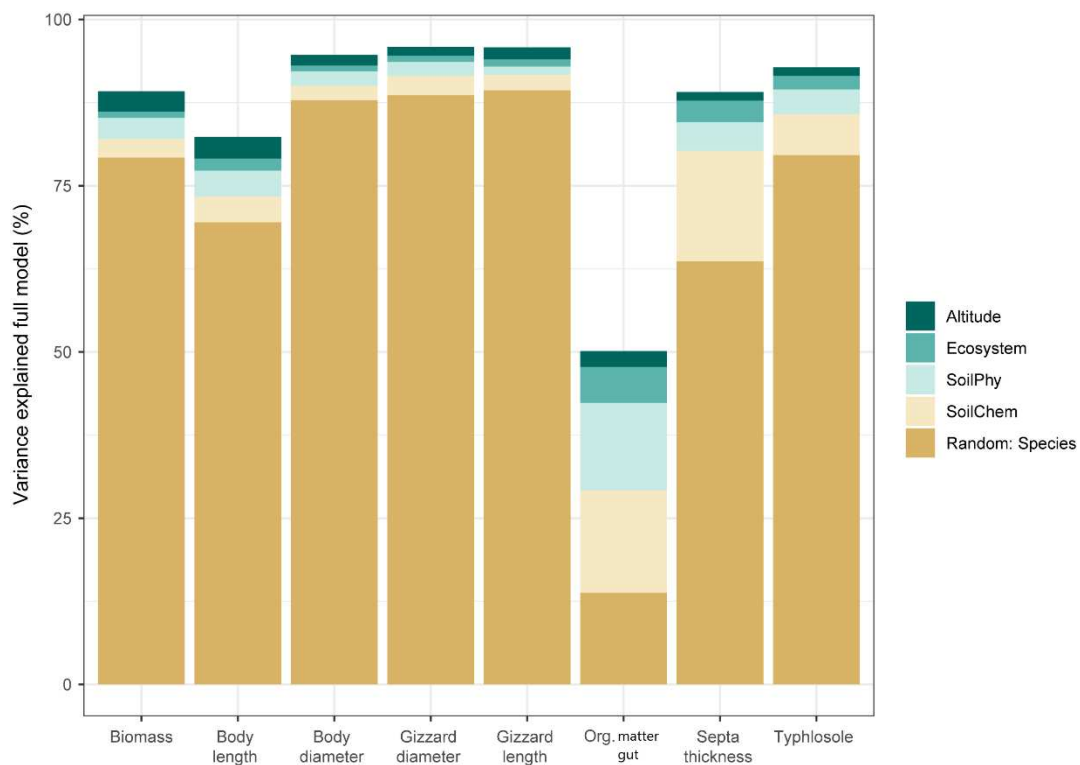
211 The HMSC allowed us to capture the variability of earthworm traits and their response to
 212 the environmental conditions (land use, soils properties, and geographic distance). The first model
 213 (null model) contained only the species as explanatory variable and explained an average 86% of
 214 the species influence on the trait variance (Figure 4). However, the explanatory power of the model
 215 varied according to the trait observed, being the highest in gizzard length (94.4%) and the lowest
 216 for organic matter in the earthworm gut (32.44%).



217
 218 Figura 4. Variation partitioning of the null model where the variability in earthworm traits is
 219 explained only by the species differences.

220
 221 For the second model (model A), we noticed that accounting for the different land uses and
 222 the soil properties as predictors of the traits' variability contributed to improve the explanatory

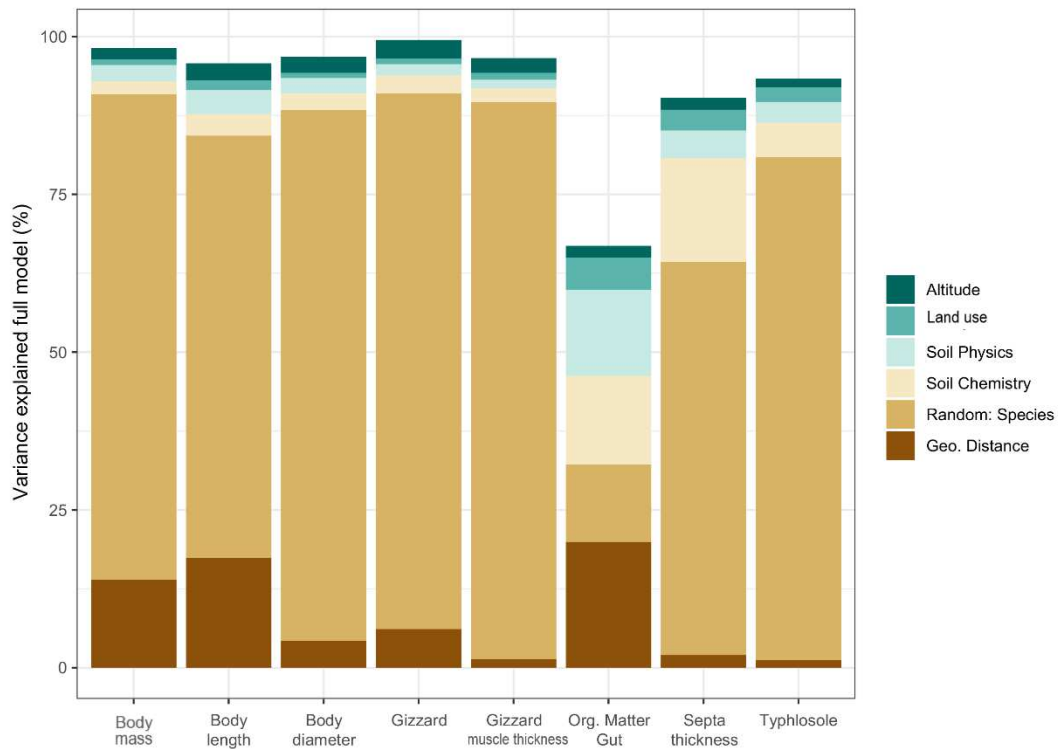
223 power of the model (Figure 5). For most of the traits (body mass, body length, body diameter,
 224 gizzard development, gizzard muscle thickness, septa thickness, thyphlosole), we captured more
 225 than 80% of the variability and this model now explains 50% of the variability in organic matter
 226 found in the earthworm gut. For this variable, we also observed that the explanatory power of the
 227 species decreased compared with the previous model, being now 27.5%. For the other traits, we
 228 observed a similar trend, but reduced. For example, the species contribution to the variance in body
 229 mass decreased from 87.4% in the null model to 79.2% in model A. This result suggested that part
 230 of the taxonomic influence suggested by the null model is an effect of the different environmental
 231 conditions in the earthworm habitats.



232
 233 **Figure 5.** Variation partitioning of model A with land use and soil factors as the predictors of the
 234 variance in earthworm traits (species considered a random effect).

235
 236 Finally, for the third model (model B) the incorporation of geographic distances further
 237 enhanced the model's ability to capture the variance in earthworm traits (Figure 6). Now, all the
 238 predictors explained more the 90% of most of the variables, except for the organic matter content
 239 in earthworm gut, which also increased to 66.8% after accounting for the geographic distance.
 240 Here again, we noticed a decreasing explanatory power of the species differences when including

241 the environmental predictors and the geographic distance. For the organic matter in the earthworm
 242 gut, the contribution of species decreases from 27.5% in model A to 18.3% in model B, and the
 243 inclusion of geographic distances explained 29.8% of the variability in the gut's organic matter of
 244 earthworms.



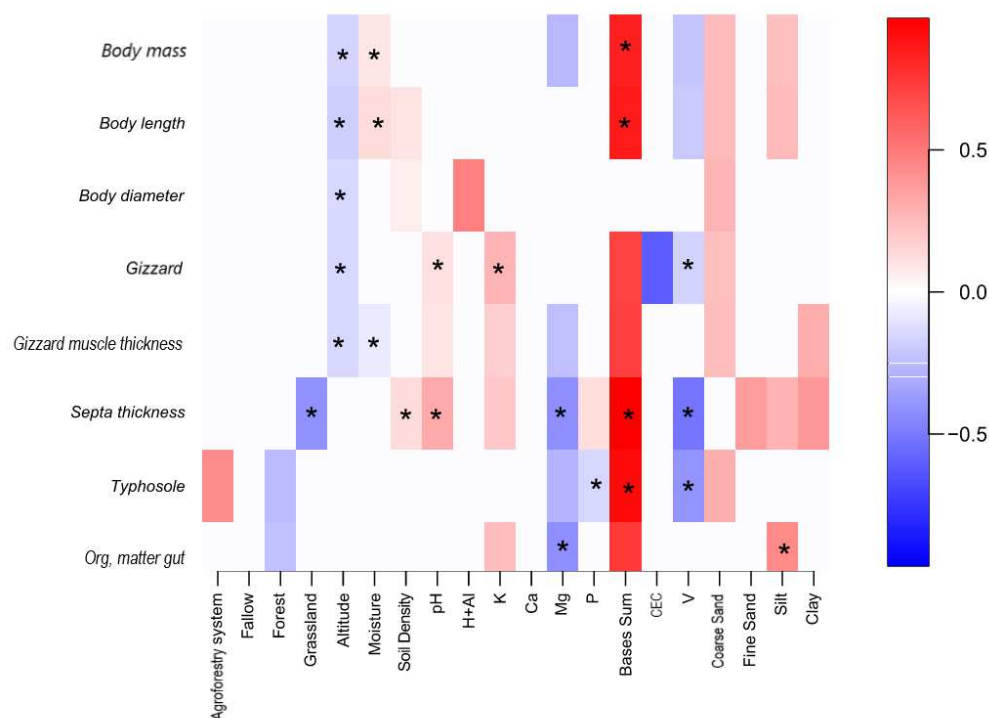
245

246 **Figure 6. Partition of Variance.** Effect of taxonomic differences and altitude, land use, soil
 247 physicochemical properties, and geographical distance on the variability of earthworm functional
 248 traits. Application of Hierarchical Modeling of Species Communities (HMS), model B.

249

250 The hierarchical model also allowed us to evaluate the scale of the effects of each of the
 251 environmental variables on the different functional traits (Figure 7). Interestingly, septa thickness,
 252 was significantly explained by 6 environmental variables. Overall, the land uses, altitude, and soil
 253 variables influence at least one functional trait. Altitude, instead of soil physical attributes, was
 254 significant and negatively related to the burrowing traits (Gizzard development, septal thickness
 255 and size). However, significant correlations between those variables suggest altitude represent
 256 intrinsically physical gradients of clay or coarse sand, Table 3. For example, typhlosole
 257 development was related to low phosphorus content and higher sum of bases (Figure 7). On the
 258 other hand, soil in grassland were more compacted (higher bulk density) and earthworm living in

259 this type of environment had thicker septas. Earthworms living in low areas and more alkaline
 260 soils had a more developed gizzard ($p < 0.05$). Gizzard muscles were also stronger in earthworms
 261 from drier soils ($p < 0.05$). Biggest earthworms were found in lowest areas, and in wetter soils
 262 ($p < 0.05$). Similarly, we can note that the soil physical variables (coarse sand, fine sand, silt, clay)
 263 in general express a slight positive interaction with the traits. Similar results were observed for soil
 264 variable coarse sand that affected 6 functional traits (body mass, body length, body diameter,
 265 gizzard, gizzard muscle thickness, typhlosole). Soils with more silt content were related positively
 266 to the intestinal organic matter content ($p < 0.05$) and marginally explained the size of earthworms.



267
 268 **Figure 7.** Effect of environmental factors (land use, soil physicochemical properties, and geographic
 269 distance) on the functional traits of oligochaetes as suggested by model B (gamma distribution).
 270 Red and blue colors represent the positive and negative values for the regression coefficient if the
 271 bounds of the 90% credible interval do not overlap the zero. Stars indicate the regression coefficients
 272 in which the 95% credible interval do not overlap zero.

273 3.5 Model performance in prediction of earthworm traits

274 As the models became more complex and their explanatory power improved, the cross-
 275 validation allowed to assess the predictive performance of them (Table 2). The cross validation
 276 showed that the predictive performance (R^2 and RMSE) of organic matter in earthworm gut is better

277 for the model A. Thus, knowing the soil conditions is relevant for better predicting the percentage
 278 of organic matter in the earthworm gut. For all the other traits (biomass, body length and diameter,
 279 gizzard diameter and length, and typhlosole), knowing the species is already enough to obtain a
 280 reliable estimate of the earthworm traits (Table 2).

Table 4. Predictive performance of the three different models (null model, model A, and model B) based on two-fold cross-validation. All models included species as random effect at the individual level. Predictive performance is measured by R^2 and the RMSE as a

Test	Model	Body mass	Body length	Body diameter	Gizzard	Gizzard muscle thickness	Organic Matter Gut	Septa thickness	Typhlosole
R^2	Null Model	82.93	70.88	90.3	91.67	92.88	9.85	67.7	85.21
	Model A	72.52	66.69	75.26	79.63	81.5	14.64	60.91	61.63
	Model B	70.86	66.33	72.18	76.23	78.3	10.08	62.21	64.46
RMSE	Null Model	0.41	0.54	0.31	0.29	0.27	0.95	0.57	0.38
	Model A	0.53	0.59	0.5	0.45	0.43	0.94	0.63	0.63
	Model B	0.55	0.59	0.53	0.49	0.47	0.98	0.62	0.6

281

282 Finally, the values of WAIC allowed us to identify which of the three models performs
 283 better in terms of prediction and complexity. Similar to the previous result, the null model showed
 284 the lowest value of WAIC (15.38), slightly smaller than model A (WAIC = 16.11), and model B
 285 (WAIC = 18.63).

286

287

288 4.0 DISCUSSION

289 This is the first study to perform a quantitative measure of earthworm traits related to
290 borrowing activities and resource preference. Previous studies categorized traits hierarchically [11]
291 or established interval classes for traits such as the anterior musculature of the earthworm [23].
292 Notably, our results of the hierarchical model showed that the functional traits are primarily
293 species-dependent with a significant part of trait variability explain by soil properties, highlighting
294 the role of environmental filter of the soil during the process of community assembly.

295 The HMSC measured the model explanatory power and predictive performance thanks to
296 the use of cross-validation approach. In our study, this allowed us to identify that the models which
297 included covariates and geographic distance contributed largely to a better understanding of the
298 variability of the traits but are not strictly needed to predict most of the traits measured. The results
299 revealed that knowing the environmental conditions is only relevant for predicting the percentage
300 of organic matter in the earthworm gut.

301 The balance between explanatory power, predictive performance, and model complexity
302 remains an open debate with some authors saying we should avoid over parametrization [51] and
303 other recommending that one uses the maximum amount of information as long as the model
304 presents good convergence [52]. Thanks to the HMSC approach we could identify the
305 environmental conditions played a significant role in explaining the traits variability and their
306 relative contribution to predicting the traits of other earthworms. Altogether, we conclude that, with
307 exception of the organic matter in the earthworm gut, the continuous data (i.e., non-categorical) of
308 taxonomic metrics of earthworm are a good proxy for the traits under study.

309 Our research linked the variations in gizzard size and thickness primarily to differences
310 between earthworm species followed by soil properties. This contrasts with the outcomes reported
311 by Marichal et al. [23], who relied on visual categorization of the gizzard (not visible (G0), small
312 (G1), medium (G2), and large (G3)) and found that traits provide greater predictive and

313 explanatory capabilities compared to relying on species alone. Therefore, by relying on more
314 quantitative approaches, our study showed that knowing earthworm species already provides a
315 good predictive and explanatory power of the traits' variability in the eastern Amazon. In
316 Crassicitellata the presence of a gizzard in some species is associated with greater suitability in
317 food processing because it aids in the grinding of organic matter [53]. The two main families in
318 Latin America (Glossoscolecidae and Rhinodrilidae) have well-developed gizzards in segment six
319 [54] and generally species of giant earthworms in America belong to genera within these families
320 (e.g. *Rhinodrilus* and *Andiorrhinus*). Thus, our study showed our quantitative study reveals that
321 earthworm species alone provide substantial predictive and explanatory power for trait variability
322 in the eastern Amazon.

323 Our results showed intraspecific variability of our measured traits induced by
324 environmental filters. Our reported negative relationship of typhlosole with Forest, Mg, and P,
325 reinforces discussion that environments with soils poor in nutrients are related to more convoluted
326 or complex typhlosoles [23]. Therefore, our findings suggest that earthworms with well-developed
327 gizzard and typhlosole are more successful in disturbed environments (non-forest environments).

328 The traits selected for this study considered were based on the geophage habit exhibited by
329 many of the species found in eastern Amazônia [41]. However, we found that the concept of
330 ecological categories developed by Bouché [9] for French earthworms is not applicable in the
331 tropics. The category corresponding to endogeic, oligo- and polyhumic earthworms (*H. fernadoi*,
332 *P. (P) corethrurus*), and anecic (*A. (T) miricuri*) showed preferences for organic matter depending
333 on site offerings [14,55]. An ecological category analysis conducted in French Guiana showed that
334 earthworm metagenomic operational taxonomic units (MOTUs) of the epigeic ecological category
335 are widely distributed in both epigeic and endogeic environments [21]. Only the endogeic group
336 seems to be well restricted to its environment being unlikely to be found in epigeic soil or litter
337 [56] and for this reason researchers suggested they cannot be considered as a functional group for
338 tropical environments [10,57].

339 Our study also highlights the importance of adopting quantitative approaches to measure
340 the earthworm traits, especially when evaluating how those traits responded to changes in the
341 environmental conditions (e.g., soil properties). For example, earthworms increase their gut
342 organic matter in soils with higher silt content and lower Mg content. In old tropical forests soil
343 nutrients are scarce [58] but litter and necromass are abundant [59], thus earthworms can exhibit
344 higher gut organic matter. By quantifying organic matter as a percentage, we effectively capture
345 the traits' variability and their relationship with soil properties. Limitations of the quantitative
346 methods exist, particularly for measuring the intestinal organic matter of earthworms relying on
347 visual quantification of length instead of volume or other analytical approach. However, more
348 complex approaches struggle to accurately evaluate smaller species with the same precision as
349 larger ones. Hence, detailed description of traits related to intestinal adaptation is more informative
350 than categorical descriptions used in previous studies [23,60–62]; however, the methods are
351 constrained by the availability of material for analysis.

352 Deforestation for cattle raising is common in the Amazon of Maranhão [63] and results in
353 a more compacted soil [64]. In our study, soil compaction led to thicker septa, which corroborates
354 with previous studies Marichal et al. [23]. Additionally, septa thickness was the trait most affected
355 by soil properties and also showed a positive relationship ($p < 0.05$) with pasture ecosystems. The
356 septa thickness is associated with strength and potential burrowing ability [23]. However, in most
357 cases, the genetic factor is the main determinant for the development of these characters, and the
358 group of species that present genes for the formation of certain adaptations perform better and end
359 up being successful in specific environments [65,66]. Therefore, thicker septa are a crucial trait
360 for the earthworms in Amazonian pastures. Our results show that the development of the septa in
361 *B. punki*, *H. alatus*, *H. fernandoi*, and *R. gurupi* shows intraspecific variability possibly indicating
362 a type of plasticity as a function of soil compaction.

363 Our study also showed that two species of *Andiorrhinus* (*A.(T) barrosoi* and *A. (T) miricuri*)
364 have large bodies and distinct feeding habits which may suggest a greater influence of

365 environmental factors on their morphological traits, especially on body mass, length, and diameter.
366 According to Briones and Álvarez-Otero [27], the development of the integument of earthworms
367 reflects both gallery-building activities and ontogenetic changes and they suggest detailed
368 histological studies to determine if there are intermediate ecological categories because the
369 development of the musculature varies according to the intensity of the habits and age of the
370 earthworm. Therefore, the greater the size of the earthworms, the more relevant the importance of
371 the trait in a species. *Andiorrhinus*, for example, had the most developed gizzard, typhlosole, and
372 septa thickness, and fed on more gut organic matter than others [55].

373 The study found that changes in altitude, moisture, and total bases affected the body mass
374 and body length of earthworms. Moisture and total bases had a positive influence on these traits,
375 while altitude had a negative influence. Interestingly, altitude in this study was found to be
376 positively related to clayed soil. This suggests that small earthworms, likely found in the litter
377 layer, inhabit soils that are poor in bases, indicating less frequent fire events or undisturbed areas.
378 On the other hand, larger earthworms, despite their K-strategy, were found in areas that have
379 recently been burned or altered by human activity, which contradicts what would be expected for
380 a species with a K-strategy [26] that strive in less disturbed environments.

381 Few studies quantified the direction and magnitude of intraspecific trait shifts [67,68].
382 Despite that, researchers already recognized that the covariance between intra- and interspecific
383 trait variation is not consistent among traits, or along environmental gradients [18,69]. Our study
384 contributed to the discussion by identifying two levels of sensitivity to the environmental
385 gradients. The first group of traits is mainly explained by the inter-species variability (body and
386 gizzard variables, and typhlosole), whereas the second group (organic matter in gut and septa
387 thickness) changed following the environmental variables.

388 In summary, our results indicate that functional traits respond to distinct environmental
389 conditions. Finally, we suggest more precise metrics of the key traits to improve the definitions of
390 the ecological categories proposed by Bouche [70] and like Briones & Alvares-Otero [27] and

391 Bottinelli & Capowiez [22], we propose that the functional approach be defined from
392 morphometric traits avoiding as much as possible the use of classes or categories.

393 **5.0 CONCLUSION**

394 In conclusion, the hierarchical model revealed that functional traits primarily depend on
395 the species and are influenced by soil properties, indicating the role of the soil's environmental
396 filter during community assembly. While models incorporating covariates and geographic distance
397 improved our understanding of trait variability, they were not strictly necessary for predicting most
398 traits, except for the percentage of organic matter in the earthworm gut. Besides, our study found
399 intraspecific variability in measured traits influenced by environmental filters. Thicker septa,
400 associated with strength and burrowing ability, were crucial for earthworms in Amazonian
401 pastures, with intraspecific variability suggesting plasticity in response to soil compaction. Certain
402 earthworm species, such as *Andiorrhinus (A.(T) barrosoi* and *A. (T) miricuri*), exhibited larger
403 bodies and distinct feeding habits, with well-developed traits like the gizzard, typhlosole, and septa
404 thickness. Environmental factors, including altitude, moisture, and total bases, influenced
405 earthworm body mass and length. Therefore, understanding these trait-environment relationships
406 is essential for ecological categorization and underscores the need for precise metrics and
407 morphometric approaches.

408 **ACKNOWLEDGEMENTS**

409 This study was funded by the Research Support Foundation of the State of Maranhão (FAPEMA)
410 (UNIVERSAL-00840/2019). We thank the students of the State University of Maranhão (UEMA),
411 who helped us in the field and in the laboratory. UEMA provided us with logistical and laboratory
412 support. Finally, we would like to thank the entire Soil Biology Laboratory team for their
413 collaboration.

414

415 REFERENCE

- 416 [1] M. Hedde, F. van Oort, I. Lamy, Functional traits of soil invertebrates as indicators for
 417 exposure to soil disturbance, *Environmental Pollution*. 164 (2012) 59–65.
 418 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.01.017>.
- 419 [2] R. Lal, Effects of macrofauna on soil properties in tropical ecosystems, *Agric Ecosyst*
 420 *Environ.* 24 (1988) 101–116. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0167-8809\(88\)90059-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0167-8809(88)90059-X).
- 421 [3] J.W. van Groenigen, I.M. Lubbers, H.M.J. Vos, G.G. Brown, G.B. de Deyn, K.J. van
 422 Groenigen, Earthworms increase plant production: a meta-analysis, *Sci Rep.* 4 (2014) 1–7.
- 423 [4] E. Blanchart, A. Albrecht, J. Alegre, A. Duboisset, C. Gilot, B. Pashanasi, P. Lavelle, L.
 424 Brussaard, Effects of earthworms on soil structure and physical properties, CAB International,
 425 Wallingford, UK, 1999.
- 426 [5] E. Garnier, M.L. Navas, A trait-based approach to comparative functional plant ecology:
 427 concepts, methods and applications for agroecology. A review, *Agronomy for Sustainable*
 428 *Development* 2011 32:2. 32 (2011) 365–399. <https://doi.org/10.1007/S13593-011-0036-Y>.
- 429 [6] B. Pey, J. Nahmani, A. Auclerc, Y. Capowiez, D. Cluzeau, J. Cortet, T. Decaens, L.
 430 Deharveng, F. Dubs, S. Joimel, C. Briard, F. Grumiaux, M.-A. Laporte, A. Pasquet, C. Pelosi, C.
 431 Pernin, J.-F. Ponge, S. Salmon, L. Santorufo, M. Hedde, Current use of and future needs for soil
 432 invertebrate functional traits in community ecology, *Basic Appl Ecol.* 15 (2014) 194–206.
 433 <https://doi.org/10.1016/j.baee.2014.03.007>.
- 434 [7] B. Fournier, E. Samaritani, J. Shrestha, E.A.D. Mitchell, R.C. Le Bayon, Patterns of
 435 earthworm communities and species traits in relation to the perturbation gradient of a restored
 436 floodplain, *Applied Soil Ecology.* 59 (2012) 87–95.
 437 <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2012.03.015>.
- 438 [8] K.E. Lee, A key for the identification of New Zealand earthworms, Soil Bureau,
 439 Department of Scientific and Industrial Research, 1959.
- 440 [9] M.B. Bouché, *Lombriciens de France - écologie et systématique*, Institut National de
 441 Recherche en Agriculture, Alimentation et Environnement, Paris, 1972.
- 442 [10] C. Violle, M.L. Navas, D. Vile, E. Kazakou, C. Fortunel, I. Hummel, E. Garnier, Let the
 443 concept of trait be functional!, *Oikos.* 116 (2007) 882–892. <https://doi.org/10.1111/J.0030-1299.2007.15559.X>.
- 445 [11] B. Pey, M.A. Laporte, J. Nahmani, A. Auclerc, Y. Capowiez, G. Caro, D. Cluzeau, J. Cortet,
 446 T. Decaens, F. Dubs, S. Joimel, M. Guernion, C. Briard, F. Grumiaux, B. Laporte, A. Pasquet, C.
 447 Pelosi, C. Pernin, J.F. Ponge, S. Salmon, L. Santorufo, M. Hedde, A thesaurus for soil invertebrate
 448 trait-based approaches, *PLoS One.* 9 (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108985>.
- 449 [12] N.M. Fountain-Jones, S.C. Baker, G.J. Jordan, Moving beyond the guild concept:
 450 Developing a practical functional trait framework for terrestrial beetles, *Ecol Entomol.* 40 (2015)
 451 1–13. <https://doi.org/10.1111/EEN.12158>.
- 452 [13] M. Vandewalle, F. de Bello, M.P. Berg, T. Bolger, S. Dolédec, F. Dubs, C.K. Feld, R.
 453 Harrington, P.A. Harrison, S. Lavorel, P.M. da Silva, M. Moretti, J. Niemelä, P. Santos, T. Sattler,
 454 J.P. Sousa, M.T. Sykes, A.J. Vanbergen, B.A. Woodcock, Functional traits as indicators of

- 455 biodiversity response to land use changes across ecosystems and organisms, *Biodivers Conserv.*
456 19 (2010) 2921–2947. <https://doi.org/10.1007/s10531-010-9798-9>.
- 457 [14] M.P. Berg, E. Toby Kiers, G. Driessen, M. van der Heijden, B.W. Kooi, F. Kuenen, M.
458 Liefjing, H.A. Verhoef, J. Ellers, Adapt or disperse: understanding species persistence in a
459 changing world, *Glob Chang Biol.* 16 (2010) 587–598. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2486.2009.02014.X>.
- 461 [15] R. Kaustuv, D. Jablonski, J.W. Valentine, Climate change, species range limits and body
462 size in marine bivalves, *Ecol Lett.* 4 (2001) 366–370. <https://doi.org/10.1046/J.1461-0248.2001.00236.X>.
- 464 [16] K. Makoto, Y. Minamiya, N. Kaneko, Differences in soil type drive the intraspecific
465 variation in the responses of an earthworm species and, consequently, tree growth to warming,
466 *Plant and Soil* 2016 404:1. 404 (2016) 209–218. <https://doi.org/10.1007/S11104-016-2827-Z>.
- 467 [17] M.W. Cadotte, Functional traits explain ecosystem function through opposing
468 mechanisms., *Ecol Lett.* 20 (2017) 989–996. <https://doi.org/10.1111/ele.12796>.
- 469 [18] R.R. Silva, C.R.F. Brandão, Morphological patterns and community organization in leaf-
470 litter ant assemblages, *Ecol Monogr.* 80 (2010) 107–124. <https://doi.org/10.1890/08-1298.1>.
- 471 [19] G.X. Rousseau, P.R. dos S. Silva, D. Celentano, C.J. Carvalho, Soil macrofauna in a
472 Chronosequence of fallows, old-growth forests and pastures in the Belem Endemism Center,
473 Eastern Amazon, *Acta Amazon.* 44 (2014) 499–511. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201303245>.
- 475 [20] G.X. Rousseau, P.R.S. Silva, C.J.R. Carvalho, Earthworms, ants and other arthropods as
476 soil health indicators in traditional and no-fire agro-ecosystems from Eastern Brazilian
477 Amazonia, *Acta Zool Mex.* 1 (2010) 110–115. <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0065-17372010000500009> (accessed December 16, 2022).
- 479 [21] T. Decaëns, D. Porco, S.W. James, G.G. Brown, V. Chassany, F. Dubs, L. Dupont, E.
480 Lapiéd, R. Rougerie, J.P. Rossi, V. Roy, DNA barcoding reveals diversity patterns of earthworm
481 communities in remote tropical forests of French Guiana, *Soil Biol Biochem.* 92 (2016) 171–
482 183. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.10.009>.
- 483 [22] N. Bottinelli, M. Hedde, P. Jouquet, Y. Capowiez, An explicit definition of earthworm
484 ecological categories – Marcel Bouché’s triangle revisited, *Geoderma.* 372 (2020) 114361.
485 <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114361>.
- 486 [23] R. Marichal, C. Praxedes, T. Decaëns, M. Grimaldi, J. Oszwald, G.G. Brown, T. Desjardins,
487 M.L. da Silva, A. Feijoo Martinez, M.N.D. Oliveira, E. Velasquez, P. Lavelle, Earthworm
488 functional traits, landscape degradation and ecosystem services in the Brazilian Amazon
489 deforestation arc, *Eur J Soil Biol.* 83 (2017) 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2017.09.003>.
- 490 [24] D.R. Guilherme, J.L.P. Souza, E. Franklin, P.A.C.L. Pequeno, A.C. das Chagas, F.B.
491 Baccaro, Can environmental complexity predict functional trait composition of ground-dwelling
492 ant assemblages? A test across the Amazon Basin, *Acta Oecologica.* 99 (2019) 103434.
493 <https://doi.org/10.1016/J.ACTAO.2019.05.004>.
- 494 [25] B. Van Praagh, S.H.-S. Reports, undefined 2002, Survey of the Giant Gippsland
495 Earthworm, *Megascolides australis* in areas potentially affected by a realignment of the South
496 Gippsland Highway—Bena to, *Museumsvictoria.Com.Au.* 3 (2002) 1–5.

- 497 <https://doi.org/10.24199/j.mvsr.2002.03>.
- 498 [26] M.A. Little, Evolutionary Strategies for Body Size, *Front Endocrinol (Lausanne)*. 11
499 (2020) 107. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2020.00107/BIBTEX>.
- 500 [27] M.J.I. Briones, R. Álvarez-Otero, Body wall thickness as a potential functional trait for
501 assigning earthworm species to ecological categories, *Pedobiologia (Jena)*. 67 (2018) 26–34.
502 <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2018.02.001>.
- 503 [28] W.U. Blanckenhorn, The quarterly review of biology: The evolution of body size: What
504 keeps organisms small?, *Quarterly Review of Biology*. 75 (2000) 385–407.
505 <https://doi.org/10.1086/393620>.
- 506 [29] B.S.-W.P.S. Journal, undefined 2011, The gizzard: function, influence of diet structure and
507 effects on nutrient availability, Cambridge.Org. (n.d.).
508 [https://www.cambridge.org/core/journals/world-s-poultry-science-journal/article/gizzard-](https://www.cambridge.org/core/journals/world-s-poultry-science-journal/article/gizzard-function-influence-of-diet-structure-and-effects-on-nutrient-availability/576132C5D1E0B5A7BD0F5D0EC2DBA43C)
509 [function-influence-of-diet-structure-and-effects-on-nutrient-](https://www.cambridge.org/core/journals/world-s-poultry-science-journal/article/gizzard-function-influence-of-diet-structure-and-effects-on-nutrient-availability/576132C5D1E0B5A7BD0F5D0EC2DBA43C)
510 [availability/576132C5D1E0B5A7BD0F5D0EC2DBA43C](https://www.cambridge.org/core/journals/world-s-poultry-science-journal/article/gizzard-function-influence-of-diet-structure-and-effects-on-nutrient-availability/576132C5D1E0B5A7BD0F5D0EC2DBA43C) (accessed March 28, 2023).
- 511 [30] C.A. Alvares, J.L. Stape, P.C. Sentelhas, J.L. de Moraes Gonçalves, G. Sparovek, Köppen's
512 climate classification map for Brazil, *Meteorologische Zeitschrift*. 22 (2013) 711–728.
513 <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>.
- 514 [31] POWER Project's, The data was obtained from the National Aeronautics and Space
515 Administration (NASA) Langley Research Center (LaRC) Prediction of Worldwide Energy
516 Resource (POWER) Project funded through the NASA Earth Science/Applied Science Program.,
517 (2022). <https://power.larc.nasa.gov/docs/> (accessed August 16, 2022).
- 518 [32] C.A.A. Peixoto Neto, G.P. Lima, L.P.F.A. Chaves, R.A. Silva, G.M. Siqueira,
519 BIOGEOGRAPHY OF THE CENTRAL MESOREGION OF MARANHÃO (BRAZIL), *Journal*
520 *of Geospatial Modelling*. 1 (2016) 33. <https://doi.org/10.22615/JGM-1.1-5812>.
- 521 [33] IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, (2010).
522 <https://www.ibge.gov.br/pt/inicio.html> (accessed December 16, 2022).
- 523 [34] L.S. Lima, M.T. Coe, B.S. Soares Filho, S. v. Cuadra, L.C.P. Dias, M.H. Costa, L.S. Lima,
524 H.O. Rodrigues, Feedbacks between deforestation, climate, and hydrology in the Southwestern
525 Amazon: implications for the provision of ecosystem services, *Landscape Ecology* 2013 29:2.
526 29 (2013) 261–274. <https://doi.org/10.1007/S10980-013-9962-1>.
- 527 [35] G.G. Brown, S.W. James, *Ecologia, biodiversidade e biogeografia das minhocas no Brasil*,
528 in: G.G. Brown, C. Fragoso (Eds.), *Minhocas Na América Latina: Biodiversidade e Ecologia*,
529 *Embrapa Soja, Londrina, 2007: pp. 297–381*.
- 530 [36] L. Cunha, G.G. Brown, D.W.G. Stanton, E. da Silva, F.A. Hansel, G. Jorge, D. McKey, P.
531 Vidal-Torrado, R.S. Macedo, E. Velasquez, S.W. James, P. Lavelle, P. Kille, Soil animals and
532 pedogenesis: The role of earthworms in anthropogenic soils, *Soil Sci*. 181 (2016) 110–125.
533 <https://doi.org/10.1097/SS.0000000000000144>.
- 534 [37] B.T.S. dos Santos, M.L.C. Bartz, L.M. Hernández-García, G.X. Rousseau, M.B. Martins,
535 S.W. James, New earthworm species of *Righiodrilus* (Clitellata, Glossoscolecidae) from eastern
536 Amazonia, *Zootaxa*. 4242 (2017) 392–400. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4242.2.11>.
- 537 [38] L.M. Hernández-García, J.E. Burgos-Guerrero, G.X. Rousseau, S.W. James, *Brasilisia n.*

- 538 gen. and *Arraia* n. gen., two new genera of Ocnodrilidae (Annelida, Clitellata, Oligochaeta)
 539 from Eastern Amazonia, Brazil, *Zootaxa*. 4496 (2018) 472–480.
 540 <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4496.1.36>.
- 541 [39] L.M. Hernández-García, J.E. Burgos-Guerrero, B.T. Silva Dos Santos, G.X. Rousseau,
 542 S.W. James, Three new species of *Holoscolex* (Clitellata, Glossoscolecidae) from the Gurupi
 543 Biological Reserve, last forest remnant of the Belém Endemism Area, Eastern Amazon, *Zootaxa*.
 544 4496 (2018) 459–471. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4496.1.35>.
- 545 [40] L.M. Hernández-García, M.L. Bartz, J.E. Burgos-Guerrero, S.C. Sousa, G.X. Rousseau,
 546 S.W. James, Additions to *Andiorrhinus* (*Turedrilus*) (Rhinodrilidae, Clitellata) from Eastern
 547 Amazonia, *Zootaxa*. 4496 (2018) 481–491. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4496.1.37>.
- 548 [41] L.M. Hernández-García, S.C. Souza, J.E.B. Guerrero, G.X. Rousseau, MINHOCAS DA
 549 AMAZÔNIA MARANHENSE, PRIMEIRO LEVANTAMENTO DE UM PATRIMÔNIO
 550 BIOLÓGICO RICO E AMEAÇADO, in: Régia Maria Reis Gualter, Ana Roberta Lima de
 551 Miranda (Eds.), *A Ciência Do Solo No Progresso Técnico-Científico e Sustentável Do Maranhão:
 552 Um Panorama Das Pesquisas Em Seus Agroecossistemas*, 1^a, Acadêmica Editorial, Parnaíba PI,
 553 2021: pp. 52–71.
- 554 [42] S.C. Sousa, A.M. de Sousa, L.M. Hernández-García, R.M.R. Gualter, G.X. Rousseau, A
 555 new earthworm species of the genus *Rhinodrilus* (Rhinodrilidae, Clitellata) and new records of
 556 earthworms species from the Amazon-Cerrado-Caatinga transition in the State of Maranhão,
 557 Brazil, *Zootaxa*. 4810 (2020) 169–174. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4810.1.11>.
- 558 [43] S.C. Sousa, L.M. Hernandez-Garcia, G.X. Rousseau, A new species of *Pontoscolex*
 559 earthworm (Rhinodrilidae, Clitellata) from the Gurupi Biological Reserve, along with records of
 560 earthworm species from the Amazon region of Maranhão, Brazil, *Zootaxa*. 4801 (2020) 105–
 561 114. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4801.1.4>.
- 562 [44] M.E.C. CLAESSEN, M.E.C. Claessen, *Manual de métodos de análise de solo.*, Rio de
 563 Janeiro: EMBRAPA-CNPq, 1997., 1997.
- 564 [45] E. Bernardo, R. João, C. De Andrade, H. Cantarella, J.A. Quaggio, B. Raij, J.C. Van;
 565 Andrade, H.; De; Cantarella, J.A. Quaggio, *Análise química para avaliação da fertilidade de solos
 566 tropicais*, (2001). http://lab.iac.sp.gov.br/Publicacao/Raij_et_al_2001_Metod_Anal_IAC.pdf
 567 (accessed March 30, 2023).
- 568 [46] F. Cribari-Neto, W.B. da Silva, A new heteroskedasticity-consistent covariance matrix
 569 estimator for the linear regression model, *ASTA Advances in Statistical Analysis*. 95 (2011) 129–
 570 146. <https://doi.org/10.1007/S10182-010-0141-2>.
- 571 [47] G. Tikhonov, Ø.H. Opedal, N. Abrego, A. Lehtikoinen, M.M.J. de Jonge, J. Oksanen, O.
 572 Ovaskainen, Joint species distribution modelling with the r-package *Hmsc*, *Methods Ecol Evol*.
 573 11 (2020) 442–447. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13345>.
- 574 [48] Ø.H. Opedal, S.J. Hegland, Using hierarchical joint models to study reproductive
 575 interactions in plant communities, *Journal of Ecology*. 108 (2020) 485–495.
 576 <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13301>.
- 577 [49] O. Ovaskainen, G. Tikhonov, A. Norberg, F. Guillaume Blanchet, L. Duan, D. Dunson, T.
 578 Roslin, N. Abrego, How to make more out of community data? A conceptual framework and its
 579 implementation as models and software, (2017). <https://doi.org/10.1111/ele.12757>.

- 580 [50] S. Muff, E.B. Nilsen, R.B. O’Hara, C.R. Nater, Rewriting results sections in the language
581 of evidence, *Trends Ecol Evol.* 37 (2022) 203–210.
582 <https://doi.org/10.1016/J.TREE.2021.10.009/ATTACHMENT/EBFC6F62-753D-4E53-A08C->
583 [1334AB7A9958/MMC1.ZIP](https://doi.org/10.1016/J.TREE.2021.10.009/ATTACHMENT/EBFC6F62-753D-4E53-A08C-1334AB7A9958/MMC1.ZIP).
- 584 [51] S. Müller, J. Scaely, A.W.-S. Science, undefined 2013, Model selection in linear mixed
585 models, *Projecteuclid.Org.* 28 (2013) 135–167. <https://doi.org/10.1214/12-STS410>.
- 586 [52] D.J. Barr, R. Levy, C. Scheepers, H.J. Tily, Random effects structure for confirmatory
587 hypothesis testing: Keep it maximal, *J Mem Lang.* 68 (2013) 255–278.
588 <https://doi.org/10.1016/J.JML.2012.11.001>.
- 589 [53] P.J. Bohlen, S. Scheu, C.M. Hale, M.A. McLean, S. Migge, P.M. Groffman, D. Parkinson,
590 Non-Native Invasive Earthworms as Agents of Change in Northern Temperate Forests, *Front*
591 *Ecol Environ.* 2 (2004) 427. <https://doi.org/10.2307/3868431>.
- 592 [54] S.W. James, Re-erection of *Rhinodrilidae* Benham, 1890, a senior synonym of
593 *Pontoscolecidae* James, 2012 (Annelida: Clitellata), *Zootaxa.* 3540 (2012) 67–68–67–68.
594 <https://doi.org/10.11646/ZOOTAXA.3540.1.6>.
- 595 [55] C.A. Edwards’, K.E. Fletcher, Interactions between Earthworms and Micro-organisms in
596 Organic-matter Breakdown, 1988.
- 597 [56] E.K. Cameron, T. Decaëns, E. Lapied, D. Porco, N. Eisenhauer, Earthworm databases and
598 ecological theory: Synthesis of current initiatives and main research directions, *Applied Soil*
599 *Ecology.* 104 (2016) 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.11.012>.
- 600 [57] D. De Vleeschauwer, R.L.-S. Sci, undefined 1981, Properties of worm casts under
601 secondary tropical forest regrowth, *Biblio.Iita.Org.* 132 (1981).
602 [https://biblio.iita.org/documents/S81ArtDevleeschauwerPropertiesInthomNodev.PDF-](https://biblio.iita.org/documents/S81ArtDevleeschauwerPropertiesInthomNodev.PDF-23add42c42541085dd61ed8012c45f05.pdf)
603 [23add42c42541085dd61ed8012c45f05.pdf](https://biblio.iita.org/documents/S81ArtDevleeschauwerPropertiesInthomNodev.PDF-23add42c42541085dd61ed8012c45f05.pdf) (accessed March 30, 2023).
- 604 [58] R.T. Corlett, Tropical Forest Ecosystem Ecology: Water, Energy, Carbon, and Nutrients,
605 in: L. Pancel, M. Köhl (Eds.), *Tropical Forestry Handbook*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin,
606 Heidelberg, 2016: pp. 491–501. https://doi.org/10.1007/978-3-642-54601-3_53.
- 607 [59] T. Li, J. Zhang, X. Wang, I. Hartley, J. Zhang, Y.Z.-A.S. Ecology, undefined 2022, Fungal
608 necromass contributes more to soil organic carbon and more sensitive to land use intensity than
609 bacterial necromass, Elsevier. (n.d.).
610 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929139322001081> (accessed March 30,
611 2023).
- 612 [60] P. Lavelle, F. Charpentier, C. Villenave, J.-P. Rossi, L. Derouard, B. Pashanasi, J. André,
613 J.-F. Ponge, N. Bernier, Effects of earthworms on soil organic matter and nutrient dynamics at a
614 landscape scale over decades, in: *Earthworm Ecology*, CRC Press Boca Raton, 2004: pp. 145–
615 160.
- 616 [61] P. Lavelle, A. Martin, Small-scale and large-scale effects of endogeic earthworms on soil
617 organic matter dynamics in soils of the humid tropics, *Soil Biol Biochem.* 24 (1992) 1491–1498.
618 [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(92\)90138-N](https://doi.org/10.1016/0038-0717(92)90138-N).
- 619 [62] M. Blouin, M.E. Hodson, E.A. Delgado, G. Baker, L. Brussaard, K.R. Butt, J. Dai, L.
620 Dendooven, G. Peres, J.E. Tondoh, D. Cluzeau, J.J. Brun, A review of earthworm impact on soil
621 function and ecosystem services, *Eur J Soil Sci.* 64 (2013) 161–182.

- 622 <https://doi.org/10.1111/EJSS.12025>.
- 623 [63] C.H.L. Silva Junior, D. Celentano, G.X. Rousseau, E.G. de Moura, I. van D. Varga, C.
624 Martinez, M.B. Martins, Amazon forest on the edge of collapse in the Maranhão State, Brazil,
625 Land Use Policy. 97 (2020) 104806. <https://doi.org/10.1016/J.LANDUSEPOL.2020.104806>.
- 626 [64] A. Chauvel, M. Grimaldi, E. Barros, E. Blanchart, T. Desjardins, M. Sarrazin, P. Lavelle,
627 Pasture damage by an Amazonian earthworm, Nature. 398 (1999) 32–33.
628 <https://doi.org/10.1038/17946>.
- 629 [65] N.H. Barton, P.D. Keightley, Understanding quantitative genetic variation, Nature Reviews
630 Genetics 2001 3:1. 3 (2002) 11–21. <https://doi.org/10.1038/nrg700>.
- 631 [66] K. Böhning-Gaese, T. Caprano, K. van Ewijk, M. Veith, Range Size: Disentangling Current
632 Traits and Phylogenetic and Biogeographic Factors, <https://doi.org/10.1086/501078>. 167
633 (2015) 555–567. <https://doi.org/10.1086/501078>.
- 634 [67] J. Mathieu, EGrowth: A global database on intraspecific body growth variability in
635 earthworm, Soil Biol Biochem. 122 (2018) 71–80.
636 <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2018.04.004>.
- 637 [68] F. de Bello, S. Lavorel, C.H. Albert, W. Thuiller, K. Grigulis, J. Dolezal, Š. Janeček, J.
638 Lepš, Quantifying the relevance of intraspecific trait variability for functional diversity, Methods
639 Ecol Evol. 2 (2011) 163–174. <https://doi.org/10.1111/J.2041-210X.2010.00071.X>.
- 640 [69] O.L. Petchey, K.L. Evans, I.S. Fishburn, K.J. Gaston, Low functional diversity and no
641 redundancy in British avian assemblages, Journal of Animal Ecology. (2007) 977–985.
- 642 [70] M.B. Bouché, Strategies lombriciennes, Ecological Bulletins. (1977) 122–132.
643
644

645 **CAPÍTULO 2: Diversidade filogenética de minhocas na Amazônia Oriental via códigos de**
646 **barras de DNA**

647 **Resumo**

648 O uso da ferramenta molecular como Códigos de Barra de DNA (*DNA barcode*) permitem delimitar
649 grupos de espécies cuja a taxonomia é desconhecido. O produto dos códigos de barra de DNA gera
650 UOTM's (Unidade Operacional Taxônomico Molecular) que podem ser usados como morfoespécies
651 para descrever a diversidade e a estrutura das comunidades além de ser possível explorar as
652 interações entre atributos do solo e os processos ecológicos. Portanto, este estudo objetivou-se
653 investigar o potencial da diversidade filogenética através dos códigos de barra de DNA (*DNA*
654 *barcode*) com região de interesse gene COI de espécies novas de anelídeos e a sua relação com
655 identificação mediante taxonomia clássica. Foram processadas a extração do DNA de 1.014
656 amostras de minhocas. No entanto, somente 56 amostras foram sequenciadas. Nossos resultados
657 demonstram que apesar dos problemas técnicos laboratoriais na amplificação e sequenciamento das
658 amostras. Houve formação de agrupamento entre espécie de minhocas e alguns grupos de minhocas
659 a nível de gênero que já tiveram sido identificados pela taxonomia clássica corroboram com análise
660 filogenética (*Pontoscolex* e *Andiorhinus*) mediante a alta similaridade com as bases de dados
661 existentes. Concluímos que os dados apresentados neste capítulo necessitam ser refeitos a partir do
662 processo de amplificação e sequenciamento das amostras.

663

664 **1. INTRODUÇÃO**

665 A região do DNA mais utilizada para os estudos filogenéticos das espécies é o DNA
666 *barcode* dos animais e dos protistas. Um segmento de 600 pares de bases do gene mitocondrial da
667 citocromo-oxidase subunidade I (COI) (HEBERT et al., 2003b; ROUGERIE et al., 2009a). Usado
668 na identificação dos juvenis, detecção de espécies crípticas e de taxa novos (DECAËNS et al.,
669 2013; ROUGERIE et al., 2009). No caso onde a taxonomia clássica é limitada sendo por falta de
670 especialistas e de recursos ou quando um caracter entra em conflito dentro da chave taxônomico,
671 o DNA *barcode* permite contribuir na delimitação das espécies através das OTUs moleculares e
672 também quando correlacionados com varáveis ambientais reforça as predições da ecologia
673 funcional na descrição das comunidades de espécies (DECAËNS et al., 2016).

674 O retorno do desmatamento na Amazônia no último ano tem promovido alterações do uso
675 da terra, por exemplo, a conversão de florestas em pastagens (MONTEIRO, 2017). A busca de
676 mecanismos para avaliar os impactos sobre os engenheiros do solo (oligoquetas) pode representar
677 uma estratégia para demonstrar além da relevância da proteção e conservação destes ambientes e
678 futuras medidas de uso e conservação do solo (PÉRÈS et al., 2011). A junção da taxonomia

679 integrativa relacionados com gradiente de degradação florestal (florestas, florestas exploradas,
680 capoeiras e pastos) pode permitir o acesso aos processos chaves das inter-relações entre as
681 comunidades de minhocas e a qualidade do solo (COULIS et al., 2015; HEDDE et al., 2010).

682 O DNA *barcode* permitem por exemplo delimitar unidades taxonômicas operacionais
683 (OTUs) cuja validade biológica pode ser comparada a outras fontes de informações (morfológicas,
684 ecológicas ou de distribuição) através de uma abordagem de taxonomia integrativa (BOYER;
685 BLAKEMORE; WRATTEN, 2011b). Para grupos de espécies cuja a taxonomia é mal conhecida,
686 essas OTUs podem ser usados como proxys de espécies para descrever a diversidade e a estrutura
687 das comunidades, e explorar as ligações com os fatores ambientais ou de certos processos
688 ecológicos do indivíduo. Os traços funcionais dos invertebrados do solo foram definidos como
689 toda característica morfológica, fisiológica, fenológica ou comportamento mensurável sobre um
690 indivíduo e que influencia sua performance e sua aptidão (PEY et al., 2014b)

691 Assim objetiva-se, (i) investigar o potencial da diversidade filogenética através do DNA
692 *barcode*, (ii) avaliar os efeitos das mudanças de uso do solo sobre a diversidade filogenética das
693 minhocas, (iii) determinar os efeitos da dinâmica do uso do solo sobre a estrutura das comunidades
694 de minhocas. A conjectura desta tese investiga se a diversidade filogenética das OTUs (via *DNA*
695 *barcode*) tem relação com a diversidade morfológica (clássica) e funcional nos diferentes
696 ambientes da Amazônia Maranhense

697

698 1.1 Objetivo Geral

- 699 • Testar se a diversidade filogenética medida por códigos de barras de DNA para inferir as
700 regras de assembleia das comunidades de minhocas.

701 1.1.1 Objetivos Específicos

- 702 • Extração, amplificação e checagem do DNA das minhocas;
- 703 • Determinar a diversidade filogenética e formação dos morfogrupos através de
704 comparações de sequencias com outros bancos de dados;
- 705 • Avaliar os efeitos das mudanças de uso do solo sobre a diversidade filogenética
706 das minhocas;
- 707 • Determinar os efeitos da dinâmica do uso do solo sobre a estrutura das
708 comunidades de minhocas;

709

710 2. MATERIAL E MÉTODOS

711 *Coleção de minhocas e prepare das amostras*

712 Os anelídeos coletados no campo foram preservados em 96% de álcool à razão de 1:3 de
 713 biomassa para volume de álcool, para garantir a integridade do material. O álcool era trocado a
 714 cada 24 h por três dias após a coleta, seguido de uma etapa final de conservação com álcool etílico
 715 PA (99%). Um total de 56 indivíduos de minhocas pertencentes a 10 espécies: *Andiorrhinus*
 716 (*Turedrilus*) *barrosoi*; *Andiorrhinus* (*Turedrilus*) *awa*; *Andiorrhinus* (*Turedrilus*) *miricuri*;
 717 *Brasilisia punki*; *Ocnereus* *NG*; *Holoscolex alatus*; *Holoscolex dossantosi*; *Holoscolex fernandoi*;
 718 *Pontoscolex corethrurus*; *Righiodrilus gurupi*, foram obtidos da coleção de invertebrados do
 719 Laboratório de Artrópodes e Microbiologia do Solo da Universidade Estadual do Maranhão. As
 720 minhocas foram descritas de acordo com as características anatômicas em estudos realizados por
 721 (DOS SANTOS et al., 2017; HERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2018a, 2018b, 2018c, 2021; SOUSA;
 722 HERNANDEZ-GARCIA; ROUSSEAU, 2020).

723 *Extração do DNA das Oligoquetas*

724 O DNA foi obtido através do uso de Kits comerciais Wizard® Genomic DNA Purification
 725 Kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA) para extração de DNA. As etapas de extração de
 726 DNA foram seguidas de acordo com o protocolo do fabricante. A presença de DNA foi verificada
 727 por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8% e quantificado por espectrometria (Biodrop,
 728 UK).

729 *Amplificação do DNA*

730 A região COI - citocromo C oxidase subunidade I (COI), correspondente à região do DNA
 731 barcode (Hebert et al., 2003), seguindo protocolo Internacional Barcode of Life project
 732 (<http://ibol.org/>) Através do uso dos iniciadores LCO1490/HCO2198 (James et al., 2012; Folmer et
 733 al., 1994; Hebert et al., 2003).

734 Forward (LCO1490) 5' – GGTCACAATCATAAAGATATTGG – 3'

735 Reverse (HCO2198) 5' – TAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA – 3'

736 As condições de PCR consistirão na desnaturação inicial em 94°C por dois minutos, seguido
 737 de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento à 47°C por 60 segundos, e
 738 alongação a 72°C por 90 segundos. O último ciclo, uma incubação a 72°C por sete minutos para
 739 completar quaisquer fitas parcialmente não sintetizadas (JAMES et al., 2012) com algumas

740 modificações. Amostras de DNA amplificado foram armazenadas em freezer -14 °C

741 *Sequenciamento de DNA*

742 As reações de sequenciamentos foram realizadas separadamente para cada iniciador sendo
743 utilizado 3uL de DNA amplificado e purificado, 0,5uL do primer, 1uL do kit de sequenciamento
744 *Big Dye Terminator* v.3.0, 3uL de tampão Save Money e 2,5uL de água ultra-pura. A reação de
745 sequenciamento será realizada em um termociclador, em que os ciclos: inicial a 96°C por 1 minuto,
746 e submetida a 30 ciclos de desnaturação a 96°C por 15 segundos, anelamento a 47°C por 5
747 segundos e elongação a 60°C por 4 minutos, após retiradas do termociclador serão adicionados as
748 amostras 2 uL de acetato de amônio, 66 uL de etanol absoluto e 10uL de água ultrapura e após
749 centrifugadas durante 50 minutos a 13.000 rpm o líquido será inteiramente desprezado e em
750 seguida adicionando-se 100 uL de etanol 70% as amostras serão levadas novamente à centrifuga
751 durante 15 minutos a 13.000 rpm novamente o líquido será desprezado, os tubos serão deixados
752 secar durante 24h. O sequenciamento se dará em sequenciadores do tipo Sanger de 96 capilares
753 *Applied Biosystems ABI3500xl (Hitachi Termofisher)*.

754 *Análise estatística*

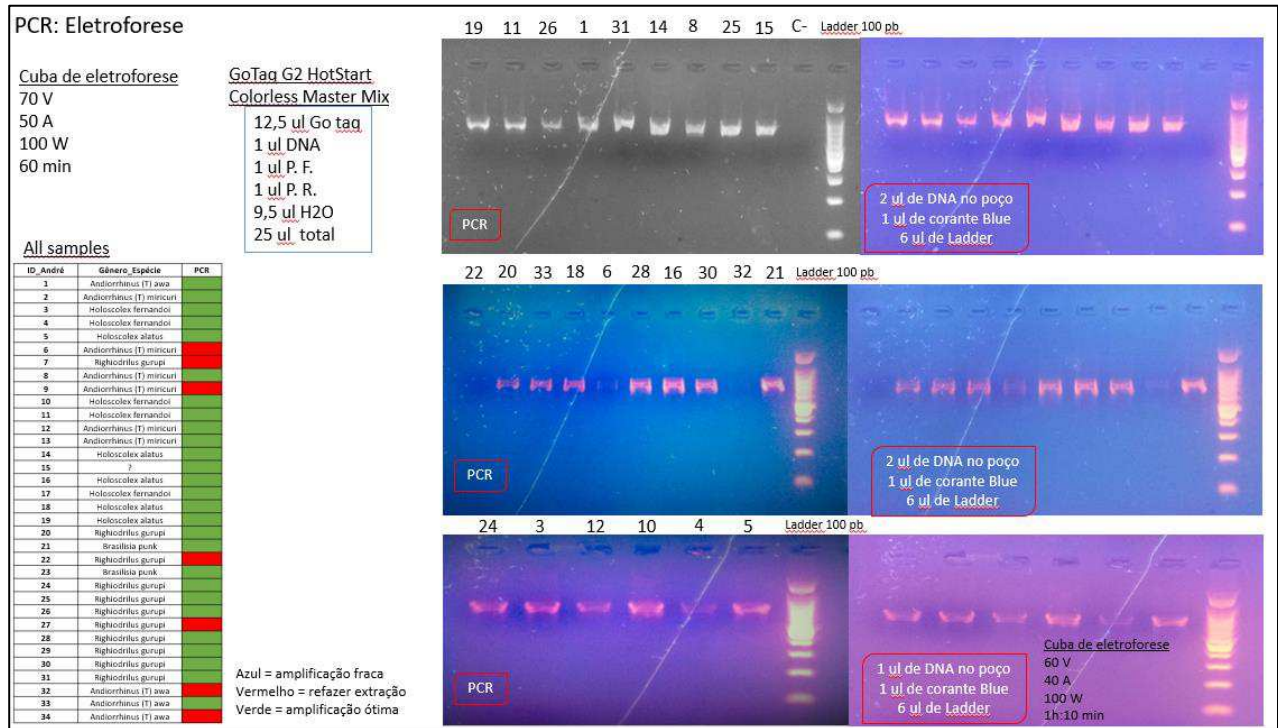
755 As sequências de DNA foram editadas no *Bioedit* v.5.0.6 (HALL, 2001) em seguida,
756 analisadas as distâncias no MEGA v.7 (KUMAR et al., 2016), utilizando um algoritmo de
757 vizinhança mais próxima (SAITOU et al., 1987) com o modelo de evolução selecionado a partir
758 das análises no programa ModelTest v.3.6 (DARRIBA et al., 2012) foram usado para seleção do
759 modelo evolução usando Critério de informação Akaike (CIA) (AKAIKE, 1973) e inferência
760 Bayesiana (SCHWARZ, 1978) para estimar distâncias genéticas. As sequências no formato .ab1
761 foram editadas usando o pacote *sangeranalyseR* na versão de software R com um *Phred* Score de
762 40. As sequencias foram comparadas com os bancos de dados filogenéticos de minhocas:
763 *Boldsystem, Genbank*.

764

765 **3. RESULTADOS**

766 Foram processadas a extração do DNA de 1.014 amostras de oligoquetas das regiões do
767 Gurupi Norte e Sul (Centro Novo e Itinga), Alcântara, Rosário, Tomé Açu e São Luís. Do total
768 foram amplificados 236 indivíduos, contudo, apenas 56 amostras foram para sequenciamento. Esta

769 seleção ocorreu devido prioridades inerentes a espécies já descritas morfologicamente. Podemos
 770 notar que na figura 1, consta relatório de controle de PCR das amostras com presenças de bandas
 771 e com as especificações de ladder. Este mesmo relatório controle também foram feito para extração
 772 do DNA.

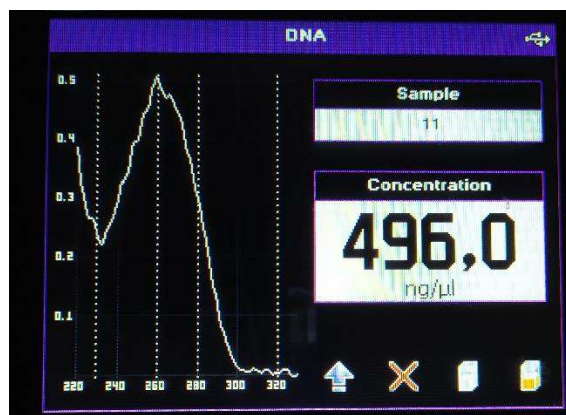


773

774 Figura 8. Amostra do controle de sequências DNA em gel de eletroforese

775

776 Foram realizados a leitura da concentração de DNA por microlitro tanto do material
 777 extraído como também da amplificação do DNA. Abaixo consta uma fotografia do aparelho que
 778 mensurou a concentração e qualidade do DNA das amostras de minhocas.



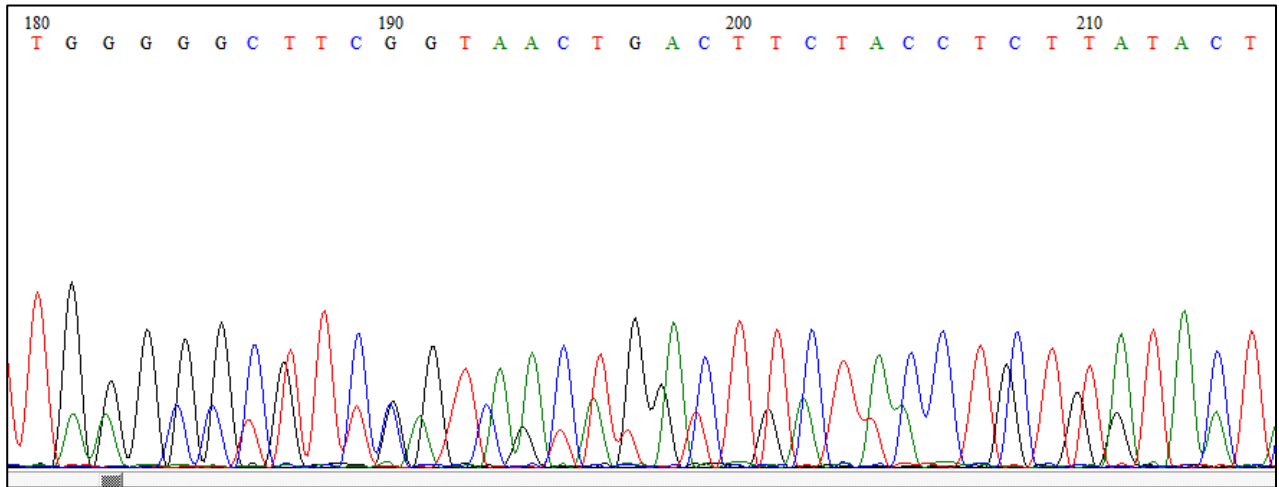
779

780 Figura 9. Leitura da concentração de DNA no *picodrop*

781

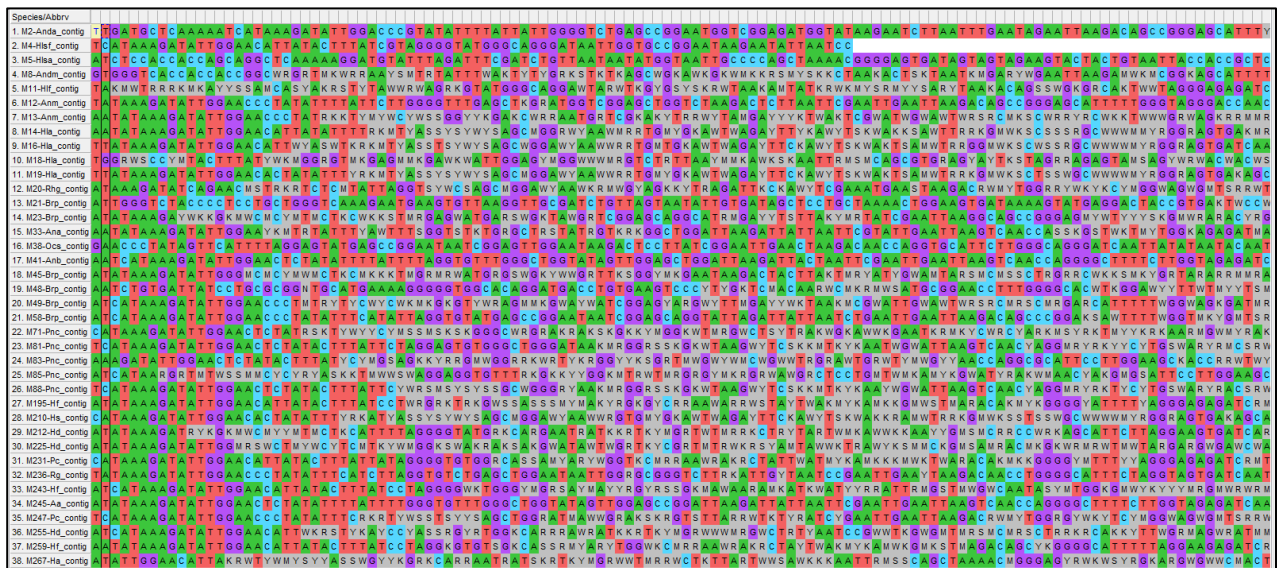
782 O eletroferograma do sequenciamento de DNA das minhocas demonstrou presença de
 783 sobreposições de nucleotídeos dificultando assim a edição e correção das bases tanto no *forward*

784 quanto no *reverse*. Na figura 3 podemos observa a presença de sobreposição de nucleotídeos. As
785 seqüências no formato *.abl* foram editadas usando o pacote *sangeranalyse R* na versão de software
786 R com um *Phred Score* de 40 ou superior.



787
788 Figura 10. Eletroferograma de sequenciamento da fita *forward* entre as sequencia 180-215 pb.

789
790 Podemos notar que os códigos de barras de DNA quando alinhados fica evidente
791 substituições/deleções de alguns pares de bases por outras. Em cinza são apresentadas a
792 substituição feita pelo algoritmo de correção e edição das seqüências realizadas pelo pacote
793 *sangeranalyseR*.



794
795 Figura 11. Todas as sequencias foram alinhadas usando *muscle* algoritmo no software MEGA.

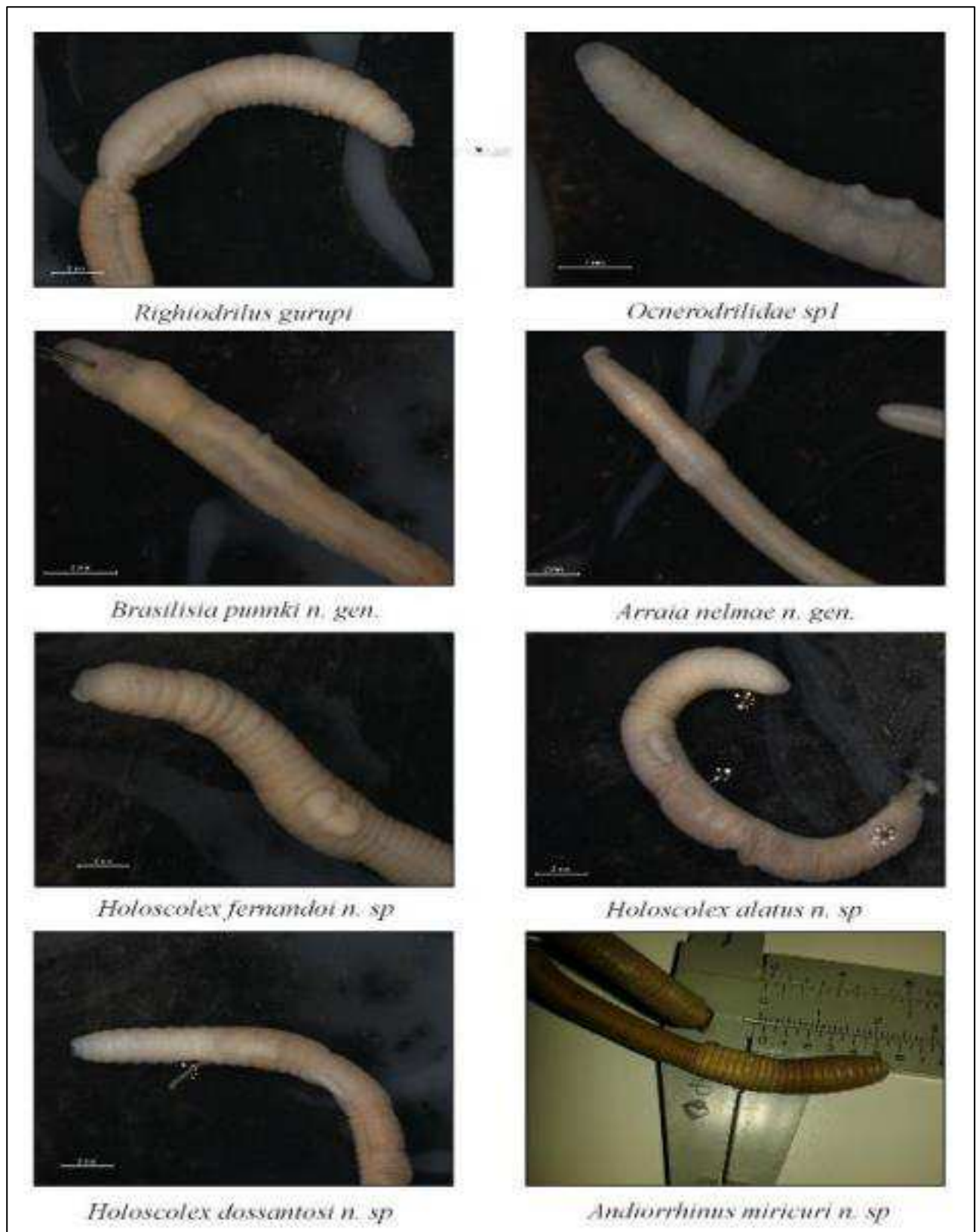
796
797 O sequenciamento de DNA das amostras de minhocas apresentou qualidade insuficiente
798 para criar árvores filogenéticas com similaridade significativa com outras bases de dados. No
799 entanto, criamos algumas árvores com todas amostras (Figura 5) para destacar a formação de 6
800 grandes grupos com similaridade bem distintas entre si.

801 Apenas uma espécie de minhoca com qualidade parcialmente satisfatória foi possível criar
 802 árvore filogenética (Figura 6) representada pelas amostras de *Pontoscolex corethrurus* que
 803 apresentou similaridade de 99,75% com banco de dados *Boldsystems*. No entanto, os demais
 804 morfogrupos alinhados pela similaridade não demonstraram concatenação com as bases de dados
 805 existente.

806 Podemos notar na figura 7 e 8 que os indivíduos de *Andiorrhinus* e *Holoscolex* fazem
 807 formação grupos externos quando comparados com indivíduos *Glossodrilus* e *Righiodrilus*
 808 (*Boldsystem*).

Tabela 5. Espécies de minhocas usadas no sequenciamento e respectivas legendas usadas nas árvores filogenética.

Espécies	Legendas
<i>Andiorrhinus (Turedrilus) barrooi</i>	M41-Anb
<i>Andiorrhinus (Turedrilus) awa</i>	M2-Anda, M33Ana, M245Aa, M1-Anda, M2Anda, M32Ana
<i>Andiorrhinus (Turedrilus) miricuri</i>	M8-Andm, M12-Anm, M203-Am
<i>Brasilisia punki</i>	M45-Brp, M21-Brp, M23-Brp, M49-Brp, M48-Brp, M58-Brp
<i>Ocnero_NG</i>	M38-Ocs, M36-SM3, M39-SM1, M47-SM1
<i>Holoscolex alatus</i>	M5-Hlsa, M14-Hla, M16-Hla, M18-Hla, M19-Hla, M267-Ha
<i>Holoscolex dossantosi</i>	M212-Hd, M225-Hd, M255-Hd,
<i>Holoscolex fernandoi</i>	M4-Hlsf, M195-Hf, M243-Hf, M11-Hlf
<i>Pontoscolex corethrurus</i>	M71-Pnc, M83-Pnc, M85-Pnc, M81-Pnc, M247-Pnc, M231-Pnc
<i>Righiodrilus gurupi</i>	M20-Rhg, M236-Rg, M246-Rg, M257-Rg, M217-Rg, M25-Rhg, M57-Rhg, M64-Rhg, M67-Rhg, M28-Rhg, M229-Rg, M233-Rg, M209-Rg



809

810 Figura 12. Ilustração de exemplares de espécies novas usadas no estudo de filogenético. Fonte:
 811 Hernandez-Garcia et., 2021.

812

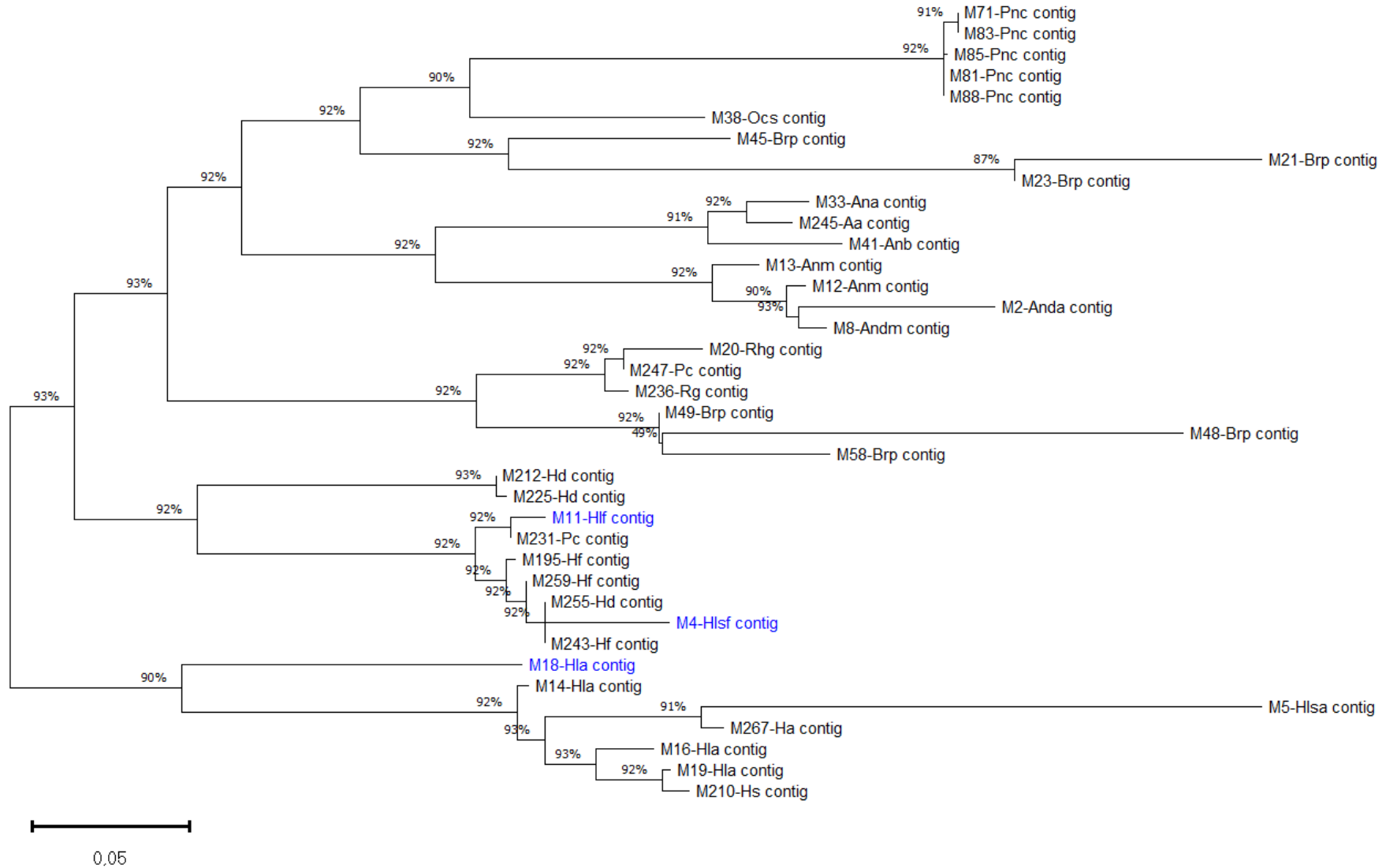


Figura 13. Árvore filogenética de máxima verossimilhança do gene COI exibindo todas as amostras de minhocas.

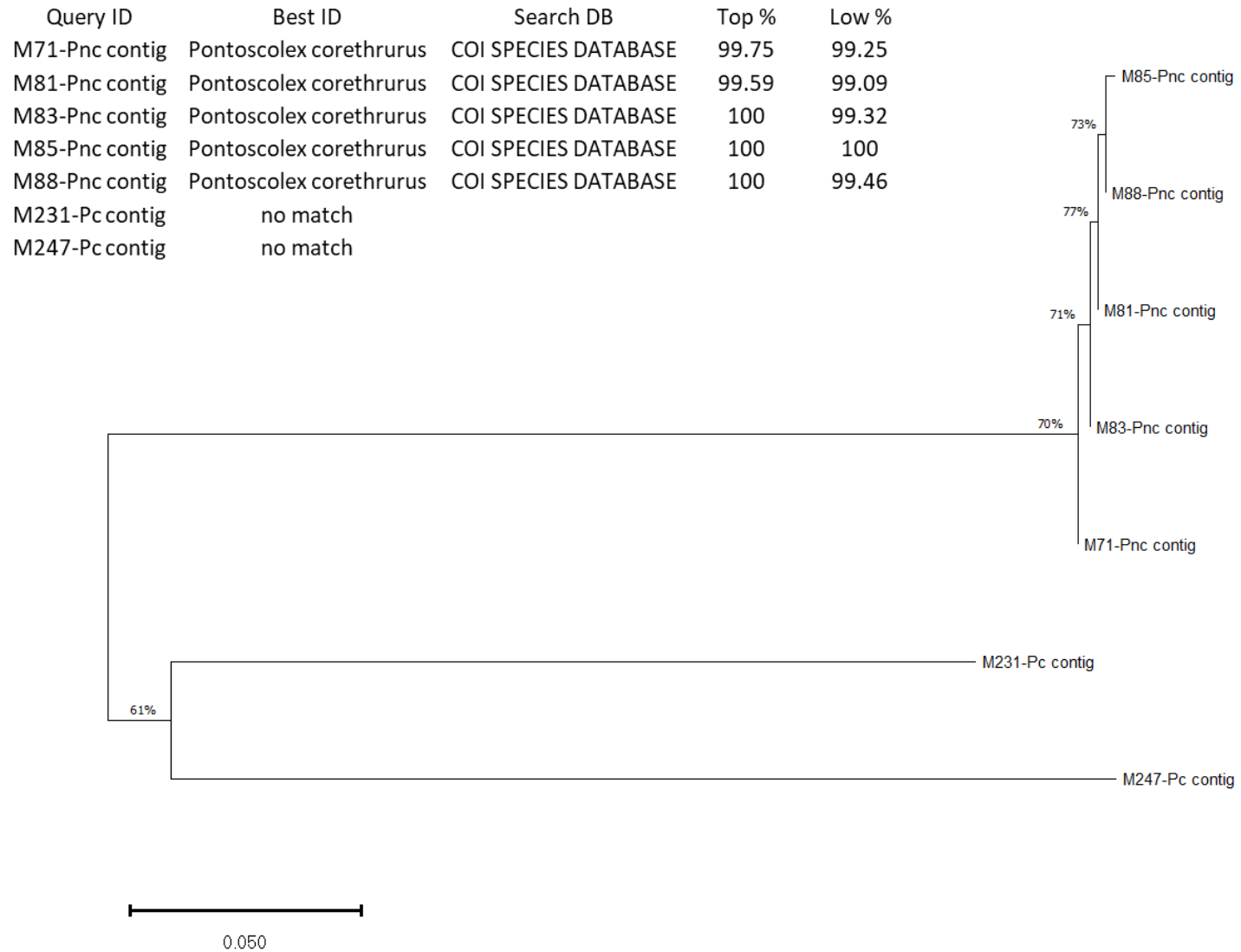


Figura 14. Árvore filogenética de máximo verossimilhança do gene COI das amostras de *Pontoscolex corethrurus* exibindo formação de dois grupos.

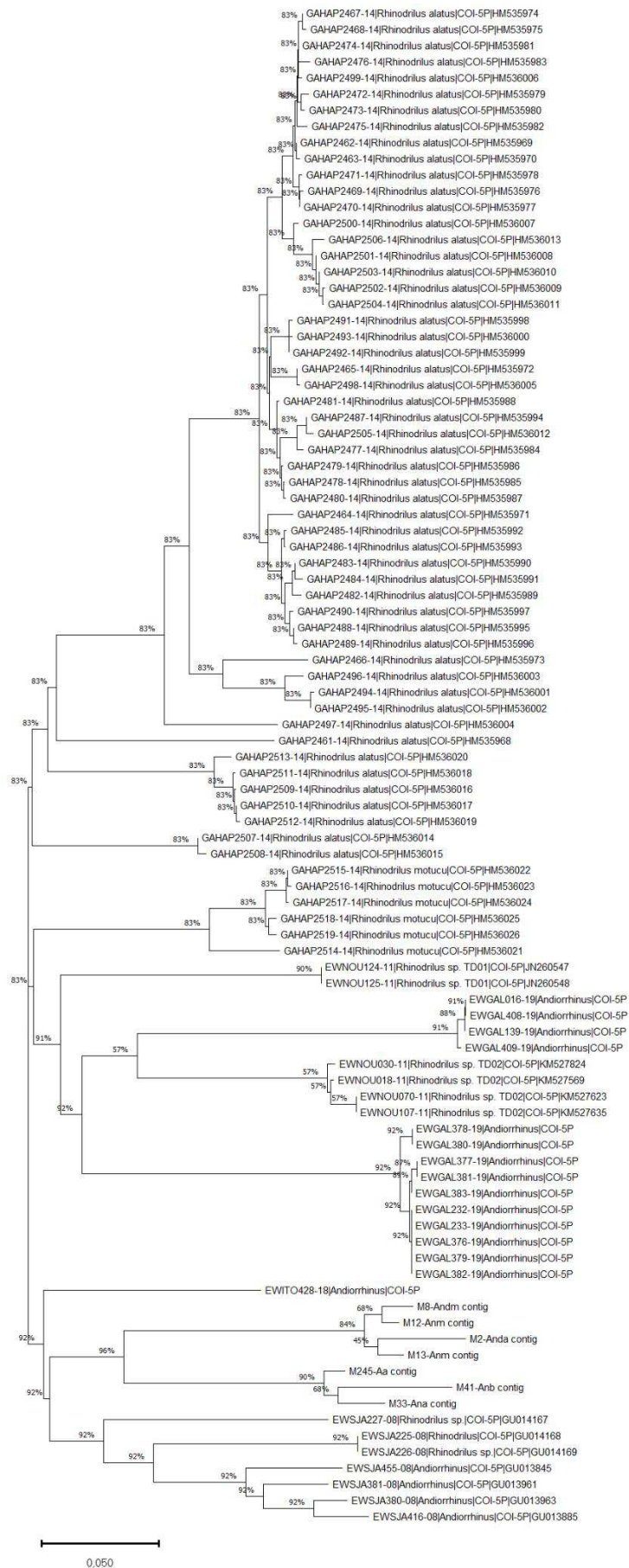


Figura 15. Árvore filogenética de máxima verossimilhança do gene COI das amostras de *Andiorrhinus* e todos os isolados do *Boldysystem* dos gêneros *Rhinodrilus* e *Andiorrhinus*.

e todos os isolados do *Boldysystem* dos gêneros *Glossodrilus* e *Righiodrilus*.

4. CONCLUSÕES

Em conclusão, o modelo hierárquico revelou que as características funcionais dependem principalmente da espécie e são influenciadas pelas propriedades do solo, indicando o papel do filtro ambiental do solo durante a montagem da comunidade. Embora os modelos que incorporam covariáveis e distância geográfica tenham melhorado nossa compreensão da variabilidade das características, eles não foram estritamente necessários para prever a maioria das características, exceto a porcentagem de matéria orgânica no trato digestivo das minhocas. Além disso, nosso estudo encontrou variabilidade intraespecífica nas características medidas influenciadas por filtros ambientais. Septos mais espessos, associados à força e capacidade de escavação, foram cruciais para as minhocas em pastagens amazônicas, com a variabilidade intraespecífica sugerindo plasticidade em resposta à compactação do solo. Certas espécies de minhocas, como *Andiorrhinus* (*A.(T) barrosoi* e *A. (T) miricuri*), exibiram corpos maiores e hábitos alimentares distintos, com características bem desenvolvidas como a moela, tiflosol e espessura dos septos. Fatores ambientais, incluindo altitude, umidade e bases totais, influenciaram a massa corporal e o comprimento das minhocas. Portanto, compreender essas relações entre características e ambiente é essencial para a categorização ecológica e destaca a necessidade de métricas precisas e abordagens morfométricas.

Podemos concluir todos os artefatos tenha sido provavelmente causado pelas falhas na parte técnica laboratorial através do manuseio dos reagentes, tempo de permanência das amostras no congelador ou no sequenciamento de DNA. Foram extraída uma quantidade significativa de DNA para futuros testes de amplificação e sequenciamento. No geral, as sequências de nucleotídeos apresentaram sobreposição de nucleotídeos no eletroferograma em virtude desse problema fica inviabilizado a confecção de árvores filogenéticas robustas. Contudo, mesmo assim foi possível de construir árvores filogenéticas e com isso identificar a formação de alguns grandes grupos. Destacamos o caso da espécie de *Pontoscolex corethrurus* que apresentou alta similaridade com mesma espécie da Indonésia. As sequencias, mesmo com qualidade ruim, demonstram também que os gêneros identificados mediante taxonomia clássica (por exemplo *Andiorrhinus*) estão relacionados com dados existentes na base de dados.

REFERÊNCIAS

- AKAIKE, H. Maximum likelihood identification of Gaussian autoregressive moving average models. *Biometrika*, v. 60, n. 2, p. 255-265, 1973.
- ARAÚJO, M. A. R. Unidades de Conservação no Brasil: da república à gestão de classe mundial. Belo Horizonte: SEGRAC, 2007.
- ASHFAQ, M. et al. Mapping global biodiversity connections with DNA barcodes: Lepidoptera of Pakistan. *PLOS ONE*, v. 12, n. 3, p. e0174749, 24 mar. 2017.
- BALLARD, J. W. O.; WHITLOCK, M. C. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular ecology*, v. 13, n. 4, p. 729-744, 2004.
- BARETTA, D. et al. Fauna edáfica avaliada por armadilhas e catação manual afetada pelo manejo do solo na região oeste catarinense. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v. 2, n. 2, p. 97-106, 2003.
- BARROS, E. et al. Development of the soil macrofauna community under silvopastoral and agrosilvicultural systems in Amazonia. *Pedobiologia*, v. 47, n. 3, p. 273-280, 2003.
- BARROS, E. et al. Effects of land-use system on the soil macrofauna in western Brazilian Amazonia. *Biology and Fertility of Soils*, v. 35, n. 5, p. 338-347, 2002.
- BARTZ, M. L. C. et al. Earthworm communities in organic and conventional coffee cultivation. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 44, n. 8, p. 928-933, 2009.
- BARTZ, M. L. C. et al. Earthworm richness in land-use systems in Santa Catarina, Brazil. *Applied Soil Ecology*, v. 83, p. 59-70, nov. 2014.
- BASELGA, A. Partitioning the turnover and nestedness components of beta diversity. *Global Ecology and Biogeography*, v. 19, n. 1, p. 134-143, 2010.
- BEDDARD, F. E. On the anatomy of *Ocneroдрilus* (Eisen). *Transactions of the Royal Society, Edinburgh*, v. 36, n. 2, p. 563-585, 1891.
- BEGON, M.; TOWNSEND, C. R.; HARPER, J. L. *Ecology From individuals to Ecosystems*. 4. ed. Miami. EEUU.: Blackwell Publishing, 2006.
- BENHAM, WB. An attempt classify earthworms. *Quart. J. Micros. Sci*, v. 31, n. No. CXXII, p. 201-315, 1890.
- BEREITER-HAHN, J.; VÖTH, M. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microscopy research and technique*, v. 27, n. 3, p. 198-219, 1994.
- BERNT, M. et al. Genetic aspects of mitochondrial genome evolution. *Mitogenomics and Metazoan Evolution*, v. 69, n. 2, p. 328-338, 1 nov. 2013.
- BLACKWOOD, C. B. et al. Interpreting ecological diversity indices applied to terminal restriction fragment length polymorphism data: insights from simulated microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, v. 73, n. 16, p. 5276-5283, 2007.
- BLAGOEV, G. et al. Prospects for using DNA barcoding to identify spiders in species-rich genera. *ZooKeys*, v. 16, p. 27-46, 29 jul. 2009.
- BLANCHART, E.; JULKA, J. M. Influence of forest disturbance on earthworm (*Oligochaeta*) communities in the Western Ghats (South India). *Soil Biology and Biochemistry*, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 303-306, 1997.
- BLAXTER, M. et al. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 360, n. 1462, p. 1935-1943, 29 out. 2005.
- BOTTINELLI, N. et al. An explicit definition of earthworm ecological categories – Marcel Bouché's triangle revisited. *Geoderma*, v. 372, p. 114361, 1 ago. 2020.

- BOTTINELLI, N.; CAPOWIEZ, Y. 2020. Earthworm ecological categories are not functional groups. *Biology and Fertility of Soils*, 57: 329-331.
- BOUCHÉ, M. B. *Lombriciens de France: écologie et systématique*. [s.l.] Institut national de la recherche agronomique Paris, 1972. v. 72
- BOUCHÉ, M. B. *Stratégies lombriciennes*. *Ecological Bulletins*, v. 25, p. 122- 132., 1977.
- BOUCHÉ, M. B. *Stratégies lombriciennes*. In: LOHM, U.; PERSSON, T. (Eds.). *Soil organisms as components of ecosystems*. 25th ed. Stockholm: *Ecological Bulletins*, 1977. p. 122-132.
- BOUCHÉ, M. B. *Stratégies lombriciennes*. In: LOHM, U.; PERSSON, T. (Eds.). *Soil organisms as components of ecosystems*. 25th ed. Stockholm: *Ecological Bulletins*, 1977. p. 122-132.
- BOUCHÉ, M. B. *Stratégies lombriciennes*. *Ecological Bulletins*, p. 122-132, 1977.
- BOUCHÉ, M. *Relations entre les structures spatiales et fonctionnelles des écosystèmes, illustrées par le rôle pédobiologique des vers de terre*. Pesson, Paul *La Vie dans le Sols; Aspects Nouveaux, Etudes Experimentales*, 1971.
- BOUCHÉ, M.B. (1983) - The establishment of earthworm communities. In: Satchell, J.E. (Ed.) *Earthworm ecology: from Darwin to vermiculture*. London, Chapman and Hall, p. 431-448.
- BOUCHE', M.B., 1977. *Stratégies lombriciennes*. In: Lohm, U., Persson, T. (Eds.), *Soil Organisms as Components of Ecosystems*. *Ecological Bulletin*, vol. 25, pp. 122–132. [Stockholm, Sweden].
- BOYER, S.; BLAKEMORE, R. J.; WRATTEN, S. D. An integrative taxonomic approach to the identification of three new New Zealand endemic earthworm species (Acanthodrilidae, Octochaetidae: Oligochaeta). *Zootaxa*, 2011a.
- BOYER, S.; BLAKEMORE, R. J.; WRATTEN, S. D. An integrative taxonomic approach to the identification of three new New Zealand endemic earthworm species (Acanthodrilidae, Octochaetidae: Oligochaeta). *Zootaxa*, 2011b.
- BROWN, G. et al. *Biodiversidade da fauna do solo e sua contribuição para os serviços ambientais*. Embrapa Florestas-Capítulo em livro científico (ALICE), 2015.
- BROWN, G. G. et al. No-tillage greatly increases earthworm populations in Paraná state, Brazil: The 7th international symposium on earthworm ecology· Cardiff· Wales· 2002. *Pedobiologia*, v. 47, n. 5–6, p. 764–771, 2003.
- BROWN, G. G. et al. *Terrestrial oligochaete research in Latin America: The importance of the Latin American Meetings on Oligochaete Ecology and Taxonomy*. *Applied Soil Ecology*, v. 69, p. 2–12, 2013.
- BROWN, G. G.; BAROIS, I.; LAVELLE, P. Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. Paper presented at the 16th World Congress of Soil Science, 20–26 August 1998, Montpellier, France. *European Journal of Soil Biology*, v. 36, n. 3, p. 177–198, 1 jul. 2000.
- BROWN, G. G.; JAMES, S. W. *Ecologia, biodiversidade e biogeografia das minhocas no Brasil*. *Minhocas na América Latina: biodiversidade e ecologia*. Londrina: Embrapa Soja, p. 297-381, 2007.
- BROWN, G. G.; JAMES, S. W. *Ecologia, biodiversidade e biogeografia das minhocas no Brasil*. In: BROWN, G. G.; FRAGOSO, C. (Eds.). *Minhocas na América Latina: biodiversidade e ecologia*. Londrina: Embrapa Soja, 2007. p. 297–381.
- BROWN, S. D. et al. Spider: an R package for the analysis of species identity and evolution, with particular reference to DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, v. 12, n. 3, p. 562-565, 2012.
- CADOTTE, M. W.; DAVIES, T. J.; PERES-NETO, P. R. Why phylogenies do not always predict ecological differences. *Ecological Monographs*, v. 87, n. 4, p. 535–551, 2017.
- CASTILHO, S. C. et al. Effect of land use changes in Eastern Amazonia on soil chemical, physical, and biological attributes. *Soil Science*, v. 181, p. 133–147, 2016.

- CAVENDER-BARES, J.; KEEN, A.; MILES, B. Phylogenetic Structure of Floridian Plant Communities Depends on Taxonomic and Spatial Scale. *Ecology*, v. 87, n. sp7, p. S109–S122, 2006.
- CHANG, C.-H.; ROUGERIE, R.; CHEN, J.-H. Identifying earthworms through DNA barcodes: Pitfalls and promise. *Pedobiologia*, v. 52, n. 3, p. 171–180, mar. 2009.
- CLAUS, C. *Grundzüge der Zoologie zum wissenschaftlichen Gebrauche*. 4. ed. Marburg: N.G. Elwert'sche Universität, 1880.
- COULIS, M. et al. Functional dissimilarity across trophic levels as a driver of soil processes in a Mediterranean decomposer system exposed to two moisture levels. *Oikos*, v. 124, n. 10, p. 1304–1316, 2015.
- CSABA, C.; SÁNDOR, M. *A Monograph of the Paleotropical Benhamiinae Earthworms: Annelida: Oligochaeta, Acanthodrilidae*. Hungarian Natural History Museum, 2010. ISBN 9639877107.
- CSUZDI, C. Earthworm species, a searchable database. *Opuscula Zoologica (Budapest)*, v. 43, n. 1, p. 97–99, 2012.
- CSUZDI, C.; SZLÁVE CZ, KATALIN. Earthworm (Clitellata: Megadrili) taxonomy in the last 200 years: A homage to András Zicsi (1928–2015). *Opuscula Zoologica (Budapest)*, v. 47, n. 1, p. 1–7, 2016.
- DARRIBA, D. et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*, v. 9, n. 8, p. 772–772, 2012.
- DAVIDSON, E. A. et al. The Amazon basin in transition. *Nature*, v. 481, n. 7381, p. 321–328, 2012.
- DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 85, n. 3, p. 407–415, 2005.
- DE LANGE, H. J.; KRAMER, K.; FABER, J. H. Two approaches using traits to assess ecological resilience: A case study on earthworm communities. *Basic and Applied Ecology*, 2013.
- DE LIMA, A. C. R.; BRUSSAARD, L. Earthworms as soil quality indicators: local and scientific knowledge in rice management systems. *ACTA ZOOLOGICA MEXICANA (NS)*, v. 26, n. 2, 2010.
- DECAËNS, L., T. et al. Soil invertebrates and ecosystem services. *European Journal of Soil Biology*, v. 42, p. S3–S15, 2006.
- DECAËNS, T. et al. DNA barcoding reveals diversity patterns of earthworm communities in remote tropical forests of French Guiana. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 92, p. 171–183, 2016.
- DECAËNS, T. et al. Potential of DNA barcoding for earthworm research in taxonomy and ecology. *Applied Soil Ecology*, v. 65, p. 35–42, 2013.
- DECAËNS, T. et al. DNA barcoding reveals diversity patterns of earthworm communities in remote tropical forests of French Guiana. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 92, p. 171–183, 1 jan. 2016.
- DECAËNS, T. et al. Potential of DNA barcoding for earthworm research in taxonomy and ecology *Applied Soil Ecology*, 2013.
- DECAËNS, T. Macroecological patterns in soil communities. *Global Ecology and Biogeography*, v. 19, n. 3, p. 287–302, 2010.
- DECAËNS, T. Macroecological patterns in soil communities *Global Ecology and Biogeography* John Wiley & Sons, Ltd, , 1 maio 2010.
- DECAËNS, T.; JIMÉNEZ, J. J.; ROSSI, J.-P. A null-model analysis of the spatio-temporal distribution of earthworm species assemblages in Colombian grasslands. *Journal of Tropical Ecology*, v. 25, n. 4, p. 415–427, 2009.
- DÍAZ, S. et al. Functional traits, the phylogeny of function, and ecosystem service vulnerability. *Ecology and Evolution*, v. 3, n. 9, p. 2958–2975, 2013.
- Díaz, S., and M. Cabido. 2001. Vive la diffe ´rence: plant functional diversity matters to ecosystem processes. *Trends in Ecology and Evolution* 16:646–655.

- DORAN, J. W.; PARKIN, T. B. Defining and assessing soil quality. *Defining soil quality for a sustainable environment*, v. 35, p. 1–21, 1994.
- DUBOSCQ, O. *Alma zebanguii* n. sp., et les *Alminae*, Oligochètes de la famille des *Glossoscolecidae*. *Mich. Arch. Zool. expér. gen.*, v. 10, n. 7, p. 97–106, 1902.
- EDWARDS, C. A. *Earthworm ecology*. [s.l.] CRC press, 2004.
- ELITH, J.; LEATHWICK, J. R. Species distribution models: ecological explanation and prediction across space and time. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, v. 40, p. 677–697, 2009.
- EVANS, K. M.; MANN, D. G. A proposed protocol for nomenclaturally effective DNA barcoding of microalgae. *Phycologia*, v. 48, n. 1, p. 70–74, 1 jan. 2009.
- FAITH, D. P. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological Conservation*, v. 61, n. 1, p. 1–10, 1 jan. 1992.
- FEI, C. et al. A quick method for obtaining high-quality DNA barcodes without DNA extraction in microalgae. *Journal of Applied Phycology*, v. 32, n. 2, p. 1165–1175, 1 abr. 2020.
- FOLMER, O. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*, v. 3, n. 5, p. 294–299, 1994.
- FONTES, M. *Intemperismo de rochas e minerais*. *Pedologia-Fundamentos*. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p. 171–205, 2012.
- FOOTTIT, R. et al. DNA barcodes to identify species and explore diversity in the Adelgidae (Insecta: Hemiptera: Aphidoidea). *Molecular Ecology Resources*, v. 9, n. s1, p. 188–195, 2009.
- FOURNIER, Bertrand et al. Patterns of earthworm communities and species traits in relation to the perturbation gradient of a restored floodplain. *Applied Soil Ecology*, v. 59, p. 87–95, 2012.
- FRAGOSO, C.; LAVELLE, P. Earthworm communities of tropical rain forests. *Soil Biology and Biochemistry*, [s. l.], v. 24, n. 12, p. 1397–1408, 1992.
- FRANCO, A. A. et al. Uso de leguminosas florestais noduladas e micorrizadas como agentes de recuperação e manutenção da vida do solo: um modelo tecnológico. *Oecologia Australis*, v. 1, n. 1, p. 459–467, 2017.
- FRECKLETON, R. P.; COOPER, N.; JETZ, W. Comparative Methods as a Statistical Fix: The Dangers of Ignoring an Evolutionary Model. *The American Naturalist*, v. 178, n. 1, p. E10–E17, 1 jul. 2011.
- FRÜND, H.-C.; GRAEFE, U.; TISCHER, S. Earthworms as bioindicators of soil quality. In: *Biology of earthworms*. [s.l.] Springer, 2011. p. 261–278.
- GATES, G. E. Burmese earthworms: An introduction to the systematics and biology of megadrile oligochaetes with special reference to Southeast Asia. *Transactions of the American philosophical Society*, v. 62, n. 7, p. 1–326, 1972.
- GILBERT, M. T. P. et al. DNA Extraction from Dry Museum Beetles without Conferring External Morphological Damage. *PLOS ONE*, v. 2, n. 3, p. e272, 7 mar. 2007.
- GODOY, O.; KRAFT, N. J. B.; LEVINE, J. M. Phylogenetic relatedness and the determinants of competitive outcomes. *Ecology Letters*, v. 17, n. 7, p. 836–844, 2014.
- GOMEZ-ALVAREZ, V.; KING, G. M.; NÜSSLEIN, K. Comparative bacterial diversity in recent Hawaiian volcanic deposits of different ages. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 60, n. 1, p. 60–73, 1 abr. 2007.
- GOTELLI, N. J.; ELLISON, A. M. Biogeography at a regional scale: determinants of ant species density in New England bogs and forests. *Ecology*, v. 83, n. 6, p. 1604–1609, 2002.
- GRAHAM, C. H.; FINE, P. V. A. Phylogenetic beta diversity: linking ecological and evolutionary processes across space in time. *Ecology Letters*, v. 11, n. 12, p. 1265–1277, 2008.
- GROOMBRIDGE, B. *Global biodiversity: status of the earth's living resources*. [s.l.] Chapman and Hall, 1992.

- HAJIBABAEI, M. et al. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, n. 4, p. 968-971, 2006.
- HAJIBABAEI, M. et al. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes*, v. 6, n. 4, p. 959-964, 2006.
- HALL, T. BioEdit version 5.0.6. North Carolina State University, Department of Microbiology, Raleigh, North Carolina, v. 192, 2001.
- HARRINGTON, R. et al. Ecosystem services and biodiversity conservation: concepts and a glossary. *Biodiversity and Conservation*, v. 19, n. 10, p. 2773-2790, 2010.
- HEBERT, P. D. et al. Counting animal species with DNA barcodes: Canadian insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 371, n. 1702, p. 20150333, 2016.
- HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2003a.
- HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2003b.
- HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 7 fev. 2003c.
- HEBERT, P. D.; CYWINSKA, A.; BALL, S. L. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.
- HEDDE, M. et al. Patterns and mechanisms responsible for the relationship between the diversity of litter macro-invertebrates and leaf degradation. *Basic and applied ecology*, v. 11, n. 1, p. 35-44, 2010.
- HEDDE, M.; VAN OORT, F.; LAMY, I. Functional traits of soil invertebrates as indicators for exposure to soil disturbance. *Environmental Pollution*, 2012.
- HEINER, B. et al. Stable isotope ^{15}N and ^{13}C labelling of different functional groups of earthworms and their casts: a tool for studying trophic links. *Pedobiologia*, v. 54, n. 3, p. 169-175, 2011.
- HEINER, B. et al. Stable isotope ^{15}N and ^{13}C labelling of different functional groups of earthworms and their casts: A tool for studying trophic links. *Pedobiologia*, v. 54, n. 3, p. 169-175, 10 maio 2011.
- HENDRIX, P. F.; BOLHEN, P. J. Exotic Earthworm Invasions in North America: Ecological and Policy Implications Expanding global commerce may be increasing the likelihood of exotic earthworm invasions, which could have negative implications for soil processes, other animal and plant spe. *Bioscience*, v. 52, n. 9, p. 801-811, 2002.
- HERNÁNDEZ-GARCÍA, L. M. et al. Additions to *Andiorrhinus* (*Turedrilus*) (*Rhinodrilidae*, *Clitellata*) from Eastern Amazonia. *Zootaxa*, v. 4496, n. 1, p. 481-491, 2018a.
- HERNÁNDEZ-GARCÍA, L. M. et al. *Brasilisia* n. gen. and *Arraia* n. gen., two new genera of *Ocnerodrilidae* (*Annelida*, *Clitellata*, *Oligochaeta*) from Eastern Amazonia, Brazil. *Zootaxa*, v. 4496, n. 1, p. 472-480, 2018b.
- HERNÁNDEZ-GARCÍA, L. M. et al. Three new species of *Holoscolex* (*Clitellata*, *Glossoscolecidae*) from the Gurupi Biological Reserve, last forest remnant of the Belém Endemism Area, Eastern Amazon. *Zootaxa*, v. 4496, n. 1, p. 459-471, 2018c.
- HERRERA, A. et al. Species richness and phylogenetic diversity comparisons of soil microbial communities affected by nickel-mining and revegetation efforts in New Caledonia. *European Journal of Soil Biology*, v. 43, n. 2, p. 130-139, 1 mar. 2007.
- HHNA, S. et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol*, v. 61, n. 3, p. 539-542, 2012.
- HICKMAN, JR. ; ROBERTS, L; LARSON, A. *Integrated principles of Zoology*. In: *Integrated principles of Zoology*. 11. ed. New York, USA: McGraw-Hill, 2014.

- HILL, M.; SMITH, A. Principal component analysis of taxonomic data with multi-state discrete characters. *Taxon*, p. 249-255, 1976.
- HILLIS, D. M.; DIXON, M. T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly review of biology*, v. 66, n. 4, p. 411-453, 1991.
- HUANG, D. et al. Slow Mitochondrial COI Sequence Evolution at the Base of the Metazoan Tree and Its Implications for DNA Barcoding. *Journal of Molecular Evolution*, v. 66, n. 2, p. 167–174, 1 fev. 2008.
- HUANG, J. et al. Identifying earthworms through DNA barcodes. *Pedobiologia*, 2007a.
- HUANG, J. et al. Identifying earthworms through DNA barcodes. *Pedobiologia*, v. 51, n. 4, p. 301–309, out. 2007b.
- HUSSAIN, K. et al. Molecular identification of sugarcane black bug (*Cavelarius excavates*) from Pakistan using cytochrome C oxidase I (COI) gene as DNA barcode. *International Journal of Tropical Insect Science*, 2 maio 2020.
- IAC. Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. 2001.
- INPE. Monitoramento da Floresta Amazônica Brasileira por Satélite. http://www.obt.inpe.br/prodes/prodes_1988_2016.htm, 2019.
- INPE. Monitoramento da Floresta Amazônica Brasileira por Satélite.
- IVANOVA, N. V. et al. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, v. 7, n. 4, p. 544-548, 2007.
- JAMES, S. W. Re-erection of *Rhinodrilidae* Benham, 1890, a senior synonym of *Pontoscolecidae* James, 2012 (Annelida: Clitellata). *Zootaxa*, v. 3540, p. 67–68, 2012.
- JAMES, S. W.; DAVIDSON, S. K. Molecular phylogeny of earthworms (Annelida: Crassicitellata) based on 28S, 18S and 16S gene sequences. *Invertebrate Systematics*, v. 26, n. 2, p. 213-229, 2012.
- JAMES, S. W.; DAVIDSON, S. K. Molecular phylogeny of earthworms (Annelida:Crassicitellata) based on 28S, 18S and 16S gene sequences. *Invertebrate Systematics*, v. 3540, p. 67–68, 2012.
- JIMÉNEZ, J. J. et al. Earthworm communities in native savannas and man-made pastures of the Eastern Plains of Colombia. *Biology and Fertility of soils*, v. 28, n. 1, p. 101-110, 1998.
- JIMÉNEZ, J. J.; DECAËNS, T. Distribución vertical de las lombrices de tierra en los suelos de los “llanos” de Colombia cubiertos por especies forrajeras. *El arado natural: las comunidades de macroinvertebrados del suelo en las sabanas neotropicales de Colombia*, p. 96-114, 2003.
- JIMÉNEZ, J. J.; DECAËNS, T.; ROSSI, J. P. Soil environmental heterogeneity allows spatial co-occurrence of competitor earthworm species in a gallery forest of the Colombian ‘Llanos’. *Oikos*, v. 121, n. 6, p. 915-926, 2012.
- JIMÉNEZ, J.-J. et al. Short-range spatial variability of soil physico-chemical variables related to earthworm clustering in a neotropical gallery forest. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 43, n. 5, p. 1071–1080, maio 2011.
- JOUQUET, P.; BLANCHART, E.; CAPOWIEZ, Y. Utilization of earthworms and termites for the restoration of ecosystem functioning. *Applied Soil Ecology*, v. 73, p. 34–40, 2014.
- JOUQUET, Pascal et al. Soil invertebrates as ecosystem engineers: intended and accidental effects on soil and feedback loops. *Applied Soil Ecology*, v. 32, n. 2, p. 153-164, 2006.
- KAMVAR, Z. N.; TABIMA, J. F.; GRÜNWARD, N. J. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*, v. 2, p. e281, 2014.
- KEENAN, K. et al. diveRsity: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. *Methods in Ecology and Evolution*, v. 4, n. 8, p. 782-788, 2013.

- KERR, K. C. et al. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Molecular ecology notes*, v. 7, n. 4, p. 535–543, 2007.
- KLUTE, A.; DINAUER, R. C. Physical and mineralogical methods. *Planning*, v. 8, p. 79, 1986.
- KRELL, F.-T. Parataxonomy vs. taxonomy in biodiversity studies – pitfalls and applicability of ‘morphospecies’ sorting. *Biodiversity & Conservation*, v. 13, n. 4, p. 795–812, 1 abr. 2004.
- KRESS, W. J. et al. DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. *Trends in ecology & evolution*, v. 30, n. 1, p. 25–35, 2015.
- KULIK, T.; BILSKA, K.; ŹELECHOWSKI, M. Promising Perspectives for Detection, Identification, and Quantification of Plant Pathogenic Fungi and Oomycetes through Targeting Mitochondrial DNA. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 7, p. 2645, jan. 2020.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.
- LALIBERTÉ, E.; LEGENDRE, P. A distance-based framework for measuring functional diversity from multiple traits. *Ecology*, v. 91, n. 1, p. 299–305, 2010.
- Lavelle, P. & Lapied, E. (2003) Endangered earthworms of Amazonia: an homage to Gilberto Righi. *Pedobiology*, 47, 419–427. <https://doi.org/10.1078/0031-4056-00207>
- LAVELLE, P. & SPAIN, A.V. *Soil Ecology*, ed 2. Amsterdam, Kluwer Scientific Publications, 2006.
- LAVELLE, P. Earthworms as Ecosystem Engineers. In: *Encyclopedia of Agrophysics*. [s.l.] Springer Netherlands, 2011. p. 233–235.
- LAVELLE, P. et al. Soil invertebrates and ecosystem services. *European Journal of Soil Biology*, v. 42, n. SUPPL. 1, p. S3–S15, 1 nov. 2006.
- LAVELLE, P.; SPAIN, A. V. *Soil ecology*. Dordrecht: Kluwer Academic, 2001.
- LAVOREL, S. et al. A novel framework for linking functional diversity of plants with other trophic levels for the quantification of ecosystem services. *Journal of Vegetation Science*, v. 24, n. 5, p. 942–948, 2013.
- LAVOREL, Sandra; GARNIER, Éric. Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. *Functional ecology*, v. 16, n. 5, p. 545–556, 2002.
- LEE, K. E. *Earthworms: Their Ecology and Relationships with Soils and Land Use*. Sydney: Academic Press, 1985a.
- LEE, K. E. *Earthworms: Their Ecology and Relationships with Soils and Land Use*. Sydney: Academic Press, 1985b.
- LEGENDRE, P.; GALLAGHER, E. D. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia*, v. 129, n. 2, p. 271–280, 2001.
- LIEBEKE, M. et al. Unique metabolites protect earthworms against plant polyphenols. *Nature communications*, v. 6, 2015.
- LIEBEKE, M. et al. Unique metabolites protect earthworms against plant polyphenols. *Nature Communications*, v. 6, 4 ago. 2015.
- LIJTMAYER, D. A. et al. DNA barcoding birds: from field collection to data analysis. In: *DNA Barcodes*. [s.l.] Springer, 2012. p. 127–152.
- LOBO, J. et al. Enhanced primers for amplification of DNA barcodes from a broad range of marine metazoans. *BMC Ecology*, v. 13, n. 1, p. 34, 10 set. 2013.
- LOSOS, J. B. Phylogenetic niche conservatism, phylogenetic signal and the relationship between phylogenetic relatedness and ecological similarity among species. *Ecology Letters*, v. 11, n. 10, p. 995–1003, 2008.

- LUONG P.T.H.; YAMASAKI T.; EGUCHI K. Conspicuity of *Phintella aequipeiformis* Zabka, 1985 and *P. lucai* Zabka, 1985 (Araneae: Salticidae) confirmed by DNA barcoding. *Revue suisse de Zoologie*, v. 123, n. 2, p. 283–290, 31 out. 2016.
- MADIGAN et al. *Microbiologia Brock*. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- MAGURRAN, A. E. *Measuring Biological Diversity*. [s.l.] John Wiley & Sons, 2013.
- MARCHÃO, R. L. et al. Impacto de sistemas agrícolas nos atributos físicos, químicos e macrofauna num latossolo do oeste baiano. *Embrapa Cerrados-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)*, 2008.
- MARICHAL, R. et al. Earthworm functional traits, landscape degradation and ecosystem services in the Brazilian Amazon deforestation arc. *European Journal of Soil Biology*, v. 83, p. 43–51, 1 nov. 2017.
- MARICHAL, R. et al. Invasion of *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae, Oligochaeta) in landscapes of the Amazonian deforestation arc. *Applied Soil Ecology*, [s. l.], v. 46, p. 443–449, 2010.
- MARICHAL, R. et al. Invasion of *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae, Oligochaeta) in landscapes of the Amazonian deforestation arc. *Applied Soil Ecology*, v. 46, p. 443–449, 2010a.
- MARICHAL, R. et al. Invasion of *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae, Oligochaeta) in landscapes of the Amazonian deforestation arc. *Applied Soil Ecology*, v. 46, n. 3, p. 443–449, 2010b.
- MARICHAL, Raphael et al. Earthworm functional traits, landscape degradation and ecosystem services in the Brazilian Amazon deforestation arc. *European Journal of Soil Biology*, v. 83, p. 43-51, 2017.
- MARKERT, B. A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H. G. *Bioindicators and biomonitors*. [s.l.] Elsevier, 2003.
- Marko J. Spasojevic¹, Benjamin L. Turner and Jonathan A. Myers.. When does intraspecific trait variation contribute to functional beta-diversity? *Journal of Ecology*, 104, 487–496, 2016
- MAYFIELD, M. M.; LEVINE, J. M. Opposing effects of competitive exclusion on the phylogenetic structure of communities. *Ecology Letters*, v. 13, n. 9, p. 1085–1093, 2010.
- MEDLIN, L. et al. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*, v. 71, n. 2, p. 491-499, 1988.
- MICHAELSEN, W. Zur Kenntnis der Geoscoleciden Südamerikas. *Zoologischer Anzeiger, Leipzig*, v. 23, p. 53–56, 1900.
- MONTEIRO, M. Science and Policies of Deforestation in the Amazon: Reflecting Ethnographically on Multidisciplinary Collaboration. In: (Ed.). *Intercultural Communication and Science and Technology Studies*: Springer, 2017. p.79-103.
- MOUILLOT, D. et al. Functional over-redundancy and high functional vulnerability in global fish faunas on tropical reefs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 111, n. 38, p. 13757-13762, 2014.
- MOUILLOT, D. et al. A functional approach reveals community responses to disturbances. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 28, n. 3, p. 167–177, 1 mar. 2013.
- Mouillot, D., W. Stubbs, M. Faure, O. Dumay, J. A. Tomasini, J. B. Wilson, and T. D. Chi. 2005. Niche overlap estimates based on quantitative functional traits: a new family of nonparametric indices. *Oecologia* 145:345–353.
- OKSANEN, J. et al. The vegan package. *Community ecology package*, v. 10, p. 631-637, 2007.
- ORGIAZZI, A., BARDGETT, R.D., BARRIOS, E., BEHAN-PELLETIER, V., BRIONES, M.J.I., CHOTTE, J-L., DE DEYN, G.B., EGGLETON, P., FIERER, N., FRASER, T., HEDLUND, K., JEFFERY, S., JOHNSON, N.C., JONES, A., KANDELER, E., KANEKO, N., LAVELLE, P., LEMANCEAU, P., M, D. H. *Global Soil Biodiversity Atlas*. [s.l: s.n.].

- ORGIAZZI, A.; BARDGETT, R. D.; BARRIOS, E. Global soil biodiversity atlas. European Commission, 2016. ISBN 927948169X.
- ORTEGA, A. et al. A DNA mini-barcode for marine macrophytes. *Molecular Ecology Resources*, v. n/a, n. n/a, [s.d.].
- OSBORNE, M. R.; PRESNELL, B.; TURLACH, B. A. On the lasso and its dual. *Journal of Computational and Graphical statistics*, v. 9, n. 2, p. 319-337, 2000.
- PAUL, B. et al. Species-specific genomic sequences for classification of bacteria. *Computers in Biology and Medicine*, v. 123, p. 103874, 1 ago. 2020.
- PAUL, J. J. P.; UDHAYA, C. I. DNA Barcoding And Molecular Taxonomy Of *Gracilaria Fergusonii* J.Ag. Using *rbcl* Gene. p. 5, 2020.
- PAVOINE, S.; OLLIER, S.; DUFOUR, A.-B. Is the originality of a species measurable? *Ecology Letters*, v. 8, n. 6, p. 579–586, 2005.
- PÉRÈS, G. et al. Earthworm indicators as tools for soil monitoring, characterization and risk assessment. An example from the national Bioindicator programme (France). *Pedobiologia*, 9th International Symposium on Earthworm Ecology Xalapa, Veracruz, Mexico, 5th – 10th September 2010. v. 54, p. S77–S87, 29 dez. 2011.
- PERRONNE, R. et al. How to design trait-based analyses of community assembly mechanisms: Insights and guidelines from a literature review. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, v. 25, p. 29-44, 2017.
- Petchey, O. L., and K. J. Gaston. 2002. Functional diversity (FD), species richness and community composition. *Ecology Letters* 5:402–411.
- Petchey, O. L., and K. J. Gaston. 2006. Functional diversity: back to basics and looking forward. *Ecology Letters* 9:741– 758.
- PEY et al. A thesaurus for soil invertebrate trait-based approaches. *PloS one*, v. 9, n. 10, p. e108985, 2014.
- PEY, B. et al. Current use of and future needs for soil invertebrate functional traits in community ecology. *Basic and Applied Ecology*, v. 15, n. 3, p. 194-206, 2014.
- PEY, B. et al. Current use of and future needs for soil invertebrate functional traits in community ecology. *Basic and Applied Ecology*, 2014a.
- PEY, B. et al. Current use of and future needs for soil invertebrate functional traits in community ecology. *Basic and Applied Ecology*, 2014b.
- POTAPOV, A. M. et al. Functional losses in ground spider communities due to habitat structure degradation under tropical land-use change. *Ecology*, 2020.
- QUESADA, C. et al. Soils of Amazonia with particular reference to the RAINFOR sites. *Biogeosciences*, v. 8, n. 6, p. 1415, 2011.
- RICHARD, B. et al. Re-integrating earthworm juveniles into soil biodiversity studies: Species identification through DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, v. 10, p. 606–614, 2010.
- RIGHI, G. Colombian earthworms. 1996.
- RIGHI, G. Contribuição ao conhecimento dos Oligochaeta brasileiros. *Papeis avulsos de zoologia*, São Paulo, v. 25, n. 18, p. 149–166, 1972.
- RIGHI, G. Invertebrados: a minhoca. [s.l.] Instituto Brasileiro de Educação Ciência e Cultura, 1966.
- RIGHI, G. Sobre *Rhinodrilus* e *Urobenus* (Oligochaetas, Glossoscolecidade). *Papeis avulsos de zoologia*, São Paulo, v. 9, p. 231–257, 1985.
- RIGHI, G.; AYRES, I.; BITTENCOURT, E. C. R. Oligochaeta (Annelida) do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia. *Acta Amazonica*, v. 8, n. 3 (S1), p. 1–48, 1978.

- ROHLAND, N.; SIEDEL, H.; HOFREITER, M. Nondestructive DNA extraction method for mitochondrial DNA analyses of museum specimens. *BioTechniques*, v. 36, n. 5, p. 814–821, 1 maio 2004.
- RÖMBKE, J.; JÄNSCH, S.; DIDDEN, W. The use of earthworms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 62, n. 2, p. 249–265, 2005.
- RÖMBKE, J.; SCHMIDT, P.; HÖFER, H. The earthworm fauna of regenerating forests and anthropogenic habitats in the coastal region of Paraná. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 44, n. 8, p. 1040–1049, 2009.
- ROSSI, J.-P. et al. Decreasing fallow duration in tropical slash-and-burn agriculture alters soil macroinvertebrate diversity: a case study in southern French Guiana. *Agriculture, ecosystems & environment*, v. 135, n. 1–2, p. 148–154, 2010.
- ROSSI, Jean-Pierre et al. Decreasing fallow duration in tropical slash-and-burn agriculture alters soil macroinvertebrate diversity: a case study in southern French Guiana. *Agriculture, ecosystems & environment*, v. 135, n. 1-2, p. 148-154, 2010.
- ROUGERIE, R. et al. DNA barcodes for soil animal taxonomy. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 44, n. 8, p. 789-802, 2009.
- ROUGERIE, R. et al. Código de barras de DNA para a taxonomia de animais do solo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 44, n. 8, p. 789–801, 18 nov. 2010.
- ROUGERIE, R. et al. DNA barcodes for soil animal taxonomy. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2009a.
- ROUGERIE, R. et al. DNA barcodes for soil animal taxonomy. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2009b.
- ROUSSEAU, G. X. et al. Macrofauna do solo em uma cronosequência de capoeiras, florestas e pastos no Centro de Endemismo Belém, Amazônia Oriental. *Acta amazônica*, v. 44, n. 4, p. 499–512, 2014.
- ROUSSEAU, G. X.; SILVA, P. R. D. S.; DE CARVALHO, C. J. R. Earthworms, ants and other arthropods as soil health indicators in traditional and no-fire agro-ecosystems from Eastern Brazilian Amazonia. *ACTA ZOOLOGICA MEXICANA (NS)*, v. 26, n. 2, 2010.
- ROUSSEAU, G. X.; SILVA, P. R. DOS S.; CARVALHO, C. J. R. DE. Earthworm ants and other arthropods as soil health indicators in traditional and no fire agro-ecosystems from Eastern Brazilian Amazonia. *Acta Zoologica Mexicana*, v. 2, p. 117–134, 2010.
- RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. *Zoologia dos Invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva*. 7. ed. São Paulo: Roca: [s.n.].
- RUTGERS, M. et al. Mapping earthworm communities in Europe. *Applied Soil Ecology*, v. 97, p. 98–111, jan. 2016.
- SAGE, R. F. *Global change biology: A primer*. *Global change biology*, v. 26, n. 1, p. 3–30, 2020.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.
- SANDRINE PAVOINE, MICHEL BAGUETTE, VIRGINIE M. STEVENS, MATHEW A. LEIBOLD, CAMILLE TURLURE, AND MICHAEL B. BONSALL 2014. Life history traits, but not phylogeny, drive compositional patterns in a butterfly metacommunity. *Ecology*, 95(12), 3304–3313.
- SANTOS, B. T. S. et al. New earthworm species of Righiodrilus (Clitellata, Glossoscolecidae) from eastern Amazonia. *Zootaxa*, v. 4242, n. 2, p. 392–400, 2017a.
- SANTOS, D. P. et al. Soil macrofauna in a Cerrado/Caatinga ecotone under different crops in Southwestern Piauí State, Brazil. *Ciência Rural*, v. 47, n. 10, 2017b.
- SCHIEDECK, G. et al. Aspectos culturais associados às minhocas no Brasil. *Acta Zoologica Mexicana*, v. 26, n. 2, p. 19–33, 2010a.
- SCHIEDECK, G. et al. Aspectos culturais associados às minhocas no Brasil. *Acta Zoologica Mexicana*, v. 26, n. 2, p. 19–33, 2010b.

- SCHLOSS, P. D. et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, v. 75, n. 23, p. 7537-7541, 2009.
- SCHWARZ, G. Estimating the dimension of a model. *The annals of statistics*, v. 6, n. 2, p. 461-464, 1978.
- SHEKHOVTSOV, S. V.; SHEKHOVTSOVA, I. N.; PELTEK, S. E. DNA Barcoding: Methods and Approaches. *Biology Bulletin Reviews*, v. 9, n. 6, p. 475–483, 1 nov. 2019.
- SHEPHERD, G. et al. *Visual Soil Assessment—Field guide for wheat*. 2008.
- SHOLIAH, A. et al. Disentangling the taxonomy of the subfamily Rasborinae (Cypriniformes, Danionidae) in Sundaland using DNA barcodes. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 2818, 18 fev. 2020.
- SILVA, A. C. et al. A spatio-temporal Bayesian Network approach for deforestation prediction in an Amazon rainforest expansion frontier. *Spatial Statistics*, v. 35, p. 100393, 2020.
- SILVA, R. F. DA et al. Macrofauna invertebrada do solo sob diferentes sistemas de produção em Latossolo da Região do Cerrado. *Pesquisa agropecuária brasileira*, v. 41, n. 4, p. 697–704, 2006.
- SIMS, R. W.; GERARD, B. M. *Earthworms: Keys and Notes for the Identification and Study of the Species*. [s.l.] Brill Archive, 1985.
- SINGH, M.; SINGH, N. DNA Barcoding for Species Identification in Genetically Engineered Fungi. In: HESHAM, A. E.-L. et al. (Eds.). *Fungal Biotechnology and Bioengineering. Fungal Biology*. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 371–396.
- SMITH, M. A.; HALLWACHS, W.; JANZEN, D. H. Diversity and phylogenetic community structure of ants along a Costa Rican elevational gradient. *Ecography*, v. 37, n. 8, p. 720–731, 2014.
- SOMERO, G. N. Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits, and costs of living. *Integrative and comparative biology*, v. 42, n. 4, p. 780–789, 2002.
- SOUSA, S. C.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, L. M.; CHRISTOFFERSEN, M. L. From 1900 to 2000: History of Earthworm taxonomy in the North and Northeast of Brazil and its current distribution in Brazilian Biomes. *Arquivos de Zoologia*, v. 51, n. 3, p. 21–29, 5 jun. 2020.
- SRIVATHSAN, A.; MEIER, R. On the inappropriate use of Kimura-2-parameter (K2P) divergences in the DNA-barcoding literature. *Cladistics*, v. 28, n. 2, p. 190-194, 2012.
- STAMATAKIS, A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, v. 22, n. 21, p. 2688-2690, 2006.
- STOCKDALE, E.; WATSON, C. Managing soil biota to deliver ecosystem services. *Natural England Commissioned Reports*, v. 141, 2012.
- STRAUBE, D.; JUEN, A. Storage and shipping of tissue samples for DNA analyses: A case study on earthworms. *European journal of soil biology*, v. 57, p. 13-18, 2013.
- SWENSON, N. G. The assembly of tropical tree communities – the advances and shortcomings of phylogenetic and functional trait analyses. *Ecography*, v. 36, n. 3, p. 264–276, 2013.
- TANCK, B. C. B.; SANTOS, H. R.; DIONÍSIO, J. A. Influência de diferentes sistemas de uso e manejo do solo sobre a flutuação populacional do *Oligochaeta* edáfico *Amyntas* spp. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 24, p. 409–415, 2000.
- TAVARES, E. S. et al. DNA barcode detects high genetic structure within neotropical bird species. *PLoS One*, v. 6, n. 12, p. e28543, 2011.
- TAVARES, E. S.; BAKER, A. J. Single mitochondrial gene barcodes reliably identify sister-species in diverse clades of birds. *BMC evolutionary biology*, v. 8, n. 1, p. 81, 2008.
- TEDESCO, M. J. et al. *Análises de solo, plantas e outros materiais*. Ufrgs Porto Alegre, 1995.

- THONGKHAO, K. et al. The use of plant DNA barcoding coupled with HRM analysis to differentiate edible vegetables from poisonous plants for food safety. *Food Control*, v. 109, p. 106896, 1 mar. 2020.
- TIKHONOV, G. et al. Joint species distribution modelling with the r-package Hmsc. *Methods in Ecology and Evolution*, v. 11, n. 3, p. 442–447, 2020.
- ULRICH, W.; GOTELLI, N. J. Null model analysis of species nestedness patterns. *Ecology*, v. 88, n. 7, p. 1824–1831, 2007.
- VALENTINI, A.; POMPANON, F.; TABERLET, P. DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 24, n. 2, p. 110–117, fev. 2009.
- VARGAS, S. et al. Barcoding Sponges: An Overview Based on Comprehensive Sampling. *PLOS ONE*, v. 7, n. 7, p. e39345, 3 jul. 2012.
- VEJDOVSKY, F. System und morphologie der Oligochaeten. Prag: Franz Řivnác, 1884.
- VERBERK, W. C. E. P.; VAN NOORDWIJK, C. G. E.; HILDREW, A. G. Delivering on a promise: integrating species traits to transform descriptive community ecology into a predictive science. *Freshwater Science*, v. 32, n. 2, p. 531–547, 1 jun. 2013.
- VERDE, M. et al. A new earthworm trace fossil from paleosols: Aestivation chambers from the Late Pleistocene Sopas Formation of Uruguay. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, v. 233, n. 3–4, p. 339–347, 2007.
- VILLÉGER, S.; GRENOUILLET, G.; BROSSE, S. Decomposing functional β -diversity reveals that low functional β -diversity is driven by low functional turnover in European fish assemblages. *Global Ecology and Biogeography*, v. 22, n. 6, p. 671–681, 2013.
- VILLÉGER, S.; NOVACK-GOTTSHALL, P. M.; MOUILLOT, D. The multidimensionality of the niche reveals functional diversity changes in benthic marine biotas across geological time. *Ecology Letters*, v. 14, n. 6, p. 561–568, 2011.
- VIOLLE, Cyrille et al. Let the concept of trait be functional!. *Oikos*, v. 116, n. 5, p. 882–892, 2007.
- WALKLEY, A.; BLACK, I. A. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil science*, v. 37, n. 1, p. 29–38, 1934.
- WAN HUSSIN, W. M. R. et al. Impacts of physical disturbance on the recovery of a macrofaunal community: A comparative analysis using traditional and novel approaches. *Ecological Indicators, Marine Benthic Indicators*. v. 12, n. 1, p. 37–45, 1 jan. 2012.
- WANG, C.; ZHANG, Y.; HAN, S. Its2vec: Fungal Species Identification Using Sequence Embedding and Random Forest Classification. *BioMed Research International*, v. 2020, p. 2468789, 29 maio 2020.
- WANG, X. et al. DNA barcodes for the identification of *Stephania* (Menispermaceae) species. *Molecular Biology Reports*, v. 47, n. 3, p. 2197–2203, 1 mar. 2020.
- WARD, R. D. DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. *Molecular ecology resources*, v. 9, n. 4, p. 1077–1085, 2009.
- WEBB, C. O. Exploring the Phylogenetic Structure of Ecological Communities: An Example for Rain Forest Trees. *The American Naturalist*, v. 156, n. 2, p. 145–155, 1 ago. 2000.
- WIENS, J. J. et al. Niche conservatism as an emerging principle in ecology and conservation biology. *Ecology Letters*, v. 13, n. 10, p. 1310–1324, 2010.
- WRIGHT, J. P.; JONES, C. G. The Concept of Organisms as Ecosystem Engineers Ten Years On: Progress, Limitations, and Challenges. *BioScience*, v. 56, n. 3, p. 203–209, 2006.
- YOO, H. S. et al. DNA barcoding Korean birds. 2006.
- ZICSI, A.; CSUZDI, C. Neue und bekannte Regenwürmer aus verschiedenen Tieren Südamerikas. *Senckenbergiana biologica*, v. 78, n. 1–2, p. 123–134, 1999.

ZUCKERKANDL, E.; PAULING, L. Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of Theoretical Biology*, v. 8, n. 2, p. 357–366, 1 mar. 1965.

ANEXOS

Comprovantes de submissão e/ou aceitação dos artigos.

12/06/2024, 17:54

Gmail - Article tracking [EJSOBI_103535] - Printed journal dispatched to subscribers



André Luiz Raposo Barros <andreluizraposo@gmail.com>

Article tracking [EJSOBI_103535] - Printed journal dispatched to subscribers

1 mensagem

Elsevier - Article Status <Article_Status@elsevier.com>
Para: andreluizraposo@gmail.com

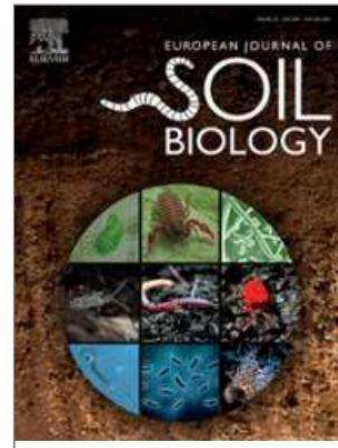
5 de outubro de 2023 às 11:25

ELSEVIER**Journals dispatch**

Dear Barros, A Raposo Barros,

The printed journal issue which includes your article titled *Variability of earthworm's functional traits in eastern Amazon is more species-dependent than environment-dependent* in the journal *European Journal of Soil Biology*, will be dispatched to subscribers on 05-OCTOBER-2023

Kind regards,
Elsevier Author Support

**Have questions or need assistance?**

Please do not reply to this automated message.

For further assistance, please visit our [Elsevier Support Center](#) where you can search for solutions on a range of topics and find answers to frequently asked questions.

From here you can also contact our Researcher Support team via 24/7 live chat, email or phone support.

© 2023 Elsevier Ltd | [Privacy Policy](http://www.elsevier.com/privacypolicy) <http://www.elsevier.com/privacypolicy>Elsevier Limited, The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford, OX5 1GB, United Kingdom, Registration No. 1982084. This e-mail has been sent to you from Elsevier Ltd. To ensure delivery to your inbox (not bulk or junk folders), please add Article_Status@elsevier.com to your address book or safe senders list.

12/06/2024, 17:54

Gmail - Rights and Access form completed for your article [EJSOBI_103535]



André Luiz Raposo Barros <andreluizraposo@gmail.com>

Rights and Access form completed for your article [EJSOBI_103535]

2 mensagens

Elsevier - Author Forms <oasupport@elsevier.com>
 Para: andreluizraposo@gmail.com

13 de agosto de 2023 às 10:55

ELSEVIER

Dear Barros, A Raposo Barros,

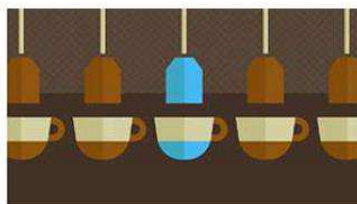
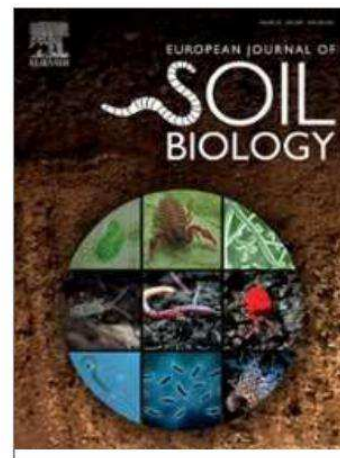
Thank you for completing the Rights and Access Form for your article *Variability of earthworm's functional traits in eastern Amazon is more species-dependent than environment-dependent* on August 13, 2023.

The Order Summary is attached to this email.

If you have any questions, please do not hesitate to contact us. To help us assist you, please quote our article reference EJSOBI_103535 in all correspondence.

Now that your article has been accepted, you will want to maximize the impact of your work. Elsevier facilitates and encourages authors to share their article responsibly. To learn about the many ways in which you can share your article whilst respecting copyright, visit: www.elsevier.com/sharing-articles.

Kind regards,
 Elsevier Researcher Support



Seven strategies for you to create a brand and promote your research

Learn how to give your research the visibility it deserves with these seven strategies.

> [Access module now](#)

Have questions or need assistance?

Please do not reply to this automated message.

For further assistance, please visit our [Elsevier Support Center](#) where you can search for solutions on a range of topics and find answers to frequently asked questions.

From here you can also contact our Researcher Support team via 24/7 live chat, email or phone support.

© 2023 Elsevier Ltd | [Privacy Policy](http://www.elsevier.com/privacypolicy) <http://www.elsevier.com/privacypolicy>

Elsevier Limited, The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford, OX5 1GB, United Kingdom, Registration No. 1982084. This e-mail has been sent to you from Elsevier Ltd. To ensure delivery to your inbox (not bulk or junk folders), please add oasupport@elsevier.com to your address book or safe senders list.

Order Confirmation.html

12K