



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

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

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

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

SÃO LUÍS - MA

Outubro 2023



FICHA CATALOGRÁFICA

Sobrenome, Prenome(s) Completos do(s) Discente
Título da Tese Título da Tese Título da Tese Título da Tese Título da Tese
Título da Tese / Nome Completo do Discente – Cidade: UF, ano da
publicação.
XX f.: il.
Orientador: Nome completo do orientador(es).
Tese (Doutorado) – Universidade XXXXXXXXXXXXXXXX, Programa de
Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede Bionorte,
ano de defesa
CDU xxx



ANDRÉ LUIZ RAPOSO BARROS

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

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

Aprovada em / / 2023

Banca examinadora

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

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

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

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

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



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 dessa trajetória me ofereceram.

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

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, consequentemente, 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 Açu 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 morfométricos, 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 Taxonômica 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. Concluimos 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.

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.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. OBJETIVOS.....	14
1.1.1 Objetivo Geral	14
1.1.2 Objetivos Específicos	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 <i>Oligoquetas</i>	16
2.2 <i>Taxonomia Classica e Limitações</i>	17
2.3 <i>Traços funcionais ecológicos dos oligoquetas</i>	18
2.5 <i>DNA Barcoding</i>	24
CAPÍTULO 1: Variability of earthworm's functional traits in eastern Amazon is more species-dependent than environment-pendent.....	28
CAPÍTULO 2: Diversidade filogenética de minhocas na Amazônia Oriental via códigos de barras de DNA	67
4. CONCLUSÃO.....	79
REFERÊNCIAS	79

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 (VIOLE, 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

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

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

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

89 **1.1. OBJETIVOS**

90 **1.1.1 Objetivo Geral**

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

93 **1.1.2 Objetivos Específicos**

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

96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108

109
110

2. REVISÃO DE LITERATURA

111 2.1 *Oligoquetas*

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

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

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

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

135 As minhocas, quando encontram condições ótimas de umidade e temperatura no solo,
136 ocupam principalmente as camadas superficiais, mas também podem se mover a profundidades de
137 30 a 50 cm (BROWN; JAMES, 2007). Nessas profundidades, elas desempenham um papel direto
138 ou indireto nas funções ecológicas do solo (HENDRIX; BOLHEN, 2002). O efeito físico no solo
139 causado pelos oligoquetas, juntamente com cupins, besouros e formigas, é considerado bastante
140 significativo, a ponto de serem chamados de "engenheiros do ecossistema" (LAVELLE, 2011;
141 WRIGHT; JONES, 2006).

142

143 2.2 *Taxonomia Classica e Limitações*

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

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

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

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

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

181 2.3 Traços funcionais ecológicos dos oligoquetas

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

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

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

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

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

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

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

224 A abordagem dos traços funcionais, que enfatiza as características funcionais dos
225 indivíduos, oferece respostas para o entendimento dos habitats e das funções do ecossistema
226 (LAVOREL et al., 2013; VERBERK; VAN NOORDWIJK; HILDREW, 2013). Os traços funcionais
227 de um organismo podem ser características morfológicas, fisiológicas, fenológicas ou alimentares,
228 que estão conectadas à sua história de vida e sua função ecológica no ecossistema, determinando
229 uma resposta individual às pressões e efeitos que precedem os processos ecológicos (DÍAZ et al.,
230 2013; MOUILLOT et al., 2013). Dessa forma, os traços funcionais podem ser usados como
231 indicadores de processos ecológicos específicos em escala local ou regional. Por exemplo, eles
232 podem ser utilizados para fazer previsões sobre mudanças na distribuição das populações, quando
233 uma dessas características é vista como um sinal de alerta precoce de distúrbios dentro da
234 comunidade (HARRINGTON et al., 2010; LALIBERTÉ; LEGENDRE, 2010; WAN HUSSIN et
235 al., 2012).

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

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

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

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

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

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

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

364 Até o ano 2015, aproximadamente 6.200 minhocas haviam sido descritas globalmente
 365 (CSUZDI; SZLÁVECZ, 2016), das quais se estima que 3.200 sejam realmente válidas (CSUZDI,
 366 2012). Os registros para o Brasil apresentam aproximadamente 336 espécies/subespécies de
 367 minhocas (BROWN et al., 2013), mas estima-se a presença de até 1.400 espécies. De fato, muitas
 368 novas espécies foram coletadas em território brasileiro nos últimos anos, as quais se encontram em
 369 coleções institucionais aguardando serem descritas.

370 Aproximadamente 85% das espécies de minhocas reportadas para o Brasil são nativas
 371 (BROWN; JAMES, 2007), as quais ao serem somadas as exóticas representam um total de nove
 372 famílias, algumas delas provenientes de diferentes continentes. A maioria das espécies nativas
 373 coletadas no Brasil pertence às famílias Glossoscolecidae (MICHAELSEN, 1900), Rhinodrilidae
 374 (BENHAM, 1890); Reclassificada por (JAMES, 2012), Ocnerodrilidae (BEDDARD, 1891),
 375 Acanthodrilidae (CLAUS, 1880), Almidae (DUBOSCQ, 1902) e Criodrilidae (VEJDOVSKY,
 376 1884).

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

378 Megascolecidae (11 espécies), algumas espécies pertencentes à família Criodrilidae (8 espécies)
 379 Ocnerodrilidae (7) e Acanthodrilidae (12) e Eudrilidae (2 espécies). Os gêneros que apresentam
 380 maior diversidade de espécies dentro da família Glossoscolecidae e Rhinodrilidae são: *Glossoscolex*
 381 (46 espécies/subespécies), *Righiodrilus* (30 espécies/subespécies) e *Rhinodrilus* (29
 382 espécies/subespécies), respectivamente.

383 Os principais estudos sobre diversidade de minhocas ocorreram no Sul do Brasil
 384 (BROWN; FRAGOSO, 2007; BARTZ et al. 2014; GERUSA et al. 2018), enquanto as regiões do
 385 norte e nordeste apresentam poucos relatos de levantamento de diversidade de oligoquetas
 386 (BROWN; FRAGOSO, 2007). Os primeiros estudos na região norte começaram com relatos de
 387 ocorrências e descrições de espécies novas (RIGHI, 1972, 1985; RIGHI; AYRES; BITTENCOURT,
 388 1978; ZICSI; CSUZDI, 1999) em pontos específicos dos estados do Pará e Maranhão. Na Amazônia
 389 oriental brasileira existem apenas três trabalhos com a estimação da diversidade de oligoquetas
 390 (CASTILHO et al., 2016; MARICHAL et al., 2010a; ROUSSEAU; SILVA; CARVALHO, 2010).
 391 Considerando as últimas publicações de espécies novas (HERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2018a,
 392 2018b, 2018c; SANTOS et al., 2017a) existem onze gêneros de minhocas reportados para a Área de
 393 Endemismo de Belém (AEB): *Pontoscolex*, *Dichogaster*, *Rhinodrilus*, *Glossodrilus*, *Urobenus*,
 394 *Atatina*, *Diaguita*, *Righiodrilus*, *Andiorrhinus*, *Holoscolex*, *Brasilisia*, *Arraia*, *Liodrilus* e
 395 *Hyperdrilus* incluídos em quatro famílias (Glossoscolecidae, Rhinodrilidae, Acanthodrilidae e
 396 Ocnerodrilidae) (SOUSA et. al 2020abc).

397 2.5 DNA Barcoding

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

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

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

426 A abordagem do DNA barcoding se baseia na premissa de que uma sequência
427 padronizada curta pode distinguir indivíduos de espécies, uma vez que a variação genética entre as
428 espécies é maior do que a variação dentro delas. Essa abordagem já foi bem descrita em estudos
429 envolvendo pássaros (KERR et al., 2007; LIJTMAER et al., 2012; TAVARES et al., 2011;
430 TAVARES & BAKER, 2008), peixes (SHOLIH et al., 2020; WARD, 2009), aranhas e lepidópteros
431 (ASHFAQ et al., 2017; BLAGOEV et al., 2009; LUONG et al., 2016). Além disso, o sistema de
432 DNA barcoding também tem sido relatado como eficaz em outros grupos, como plantas (HUSSAIN
433 et al., 2020; THONGKHAO et al., 2020; WANG et al., 2020), macroalgas (EVANS & MANN,
434 2009; FEI et al., 2020; ORTEGA et al., 2020; PAUL & UDHAYA, 2020), fungos, protistas (KULIK
435 et al., 2020; SINGH & SINGH, 2020; WANG et al., 2020) e bactérias (KRESS et al., 2015; Paul et
436 al., 2020; VALENTINI et al., 2009).

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

445 (BALLARD & WHITLOCK, 2004).

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

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

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

474 Como limitações dessa metodologia, temos a idade e a degradação do DNA, o tipo de
475 armazenamento ou a incapacidade de extrair material para análise do DNA sem prejudicar a amostra
476 total. No entanto, alguns pesquisadores já relatam métodos alternativos para analisar amostras de
477 DNA antigas ou menos conservadas provenientes de museus (Gilbert et al., 2007; Rohland; Siedel;
478 Hofreiter, 2004).

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

486 Quando se trabalha com qualquer espécie, geralmente ocorre uma formação implícita
487 de grupos pré-existentes por meio de características morfológicas (conhecidos como morfogrups)
488 ou unidades taxonômicas operacionais moleculares (UTOM) (KRELL, 2004; LALIBERTÉ;
489 LEGENDRE, 2010). O uso de índices clássicos de biodiversidade, como riqueza de espécies, índice
490 de Simpson e índice de Shannon (MAGURRAN, 2013), pode ser complementado por novos índices
491 desenvolvidos para explorar as informações contidas em conjuntos de sequências de DNA obtidas
492 de um único ambiente. Assim, a estimativa de índices de biodiversidade pode ser baseada em
493 UTOMs detectadas por meio do DNA barcode e incorporadas ao estudo de diversidade (BLAXTER
494 et al., 2005), onde as abundâncias relativas de cada tipo de sequência de DNA (UTOM) substituem
495 a abundância relativa clássica de cada espécie estimada a partir do número de indivíduos. Essa
496 abordagem é comum na microbiologia ambiental para estimar diferentes índices de diversidade,
497 como riqueza de espécies, índices de Shannon ou Simpson (por exemplo, Gomez-Alvarez; King;
498 Nüsslein, 2007; Herrera et al., 2007), mas apresenta algum viés quando o número de espécies é
499 muito grande (> 1000) (BLACKWOOD et al., 2007). O uso de UTOMs para estimar a
500 biodiversidade das minhocas já foi relatado (CHANG; ROUGERIE; CHEN, 2009; HUANG et al.,
501 2007b; SHEKHOVTSOV; SHEKHOVTSOVA; PELTEK, 2019).

502

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}

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

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

³Postgraduate 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;

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

*Corresponding author: andreluizraposo@gmail.com (A.L.R Barros), guilirous@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

546 1. INTRODUCTION

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

556 In 1959, Lee [8] used discrete categories to group Megascolecidae earthworms from New
 557 Zealand in three categories based on the soil horizon: litter, topsoil, and subsoil [8]. Later, in 1972,
 558 Bouché suggested classifying European lumbricids into three ecological categories (epigeic, anecic
 559 and endogeic) based, among other things, on feeding behavior and burrow construction [9].
 560 However, the original proposal did not include a relationship between earthworms and soil
 561 properties [9]. This is because the classifications combine several morphoanatomical conditions into
 562 a single definition (i.e., epigeic, endogeic, or anecic), some researchers have recommended
 563 measuring more accurate data related to the evolutionary history of species for functional studies
 564 [6]. According to Violle et al., [10] functional traits include morphological, physiological,
 565 phenological, or behavioral characteristics that are expressed in phenotypes of individual organisms
 566 and are relevant to understand the response of such organisms to the environment or their effects on
 567 ecosystem properties. Pey et al. [11] propose distinguishing between performance traits, which
 568 encompass growth, reproduction, and survival (fitness), and morphological, phenological, and
 569 physiological characteristics ("M-P-P" traits). Furthermore, traits that have a direct impact on
 570 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.

597

598 **2. MATERIAL AND METHODS**599 *2.1 Earthworm Sampling*

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

618

619 2.2 Functional Traits Characterization

620 To understand the drivers of functional trait variability, previous studies used categorical
 621 approaches to classify the traits of earthworms, such as pigmentation, gizzard size, and typhosole
 622 [22]. For example, gizzard size and typhlosole development have been measured as categorical data:
 623 absent, small/simple, medium/complex, large/very complex [23]. However, relying on categorical
 624 data presents a challenge to the standardization and reproducibility of the measurement due to its
 625 subjective nature, since the classification depends on individual observations. To overcome this
 626 limitation, in our study, we opted for quantitative approaches, using metric data instead of
 627 categorical or class-based measurements. This decision allowed for more accurate estimations and
 628 reduced the subjectivity associated with trait classification.

629 The functional traits proposed in this research were evaluated according to Guilherme et al.,
 630 [24] on adult/clitellate specimens. To select what functional traits to measure in our study we
 631 followed the criteria from BETSI database (<http://betsi.cesab.org/>) which aims to promote the use
 632 of trace-based approaches in soil invertebrate ecology in addition to providing a reference
 633 framework for archiving soil invertebrate trace data. The measured data of the earthworm traits with
 634 some modifications as expressed in Table 1. Hence, the traits measured in this study were body
 635 mass(g), body length (mm), body diameter (mm), gizzard development (diameter vs length, mm),
 636 gizzard muscle thickness (mm), septa thickness (mm), the occupancy of the typhlosole (%) and
 637 organic matter gut (%).

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

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

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

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

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

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

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

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

674

675 Clique ou toque aqui para inserir o texto..

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

Trait type	Characteristic features	Existing measurement unit	Proposed unit of measurement	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

677

678

2.3 Geographic and land use variability of earthworms

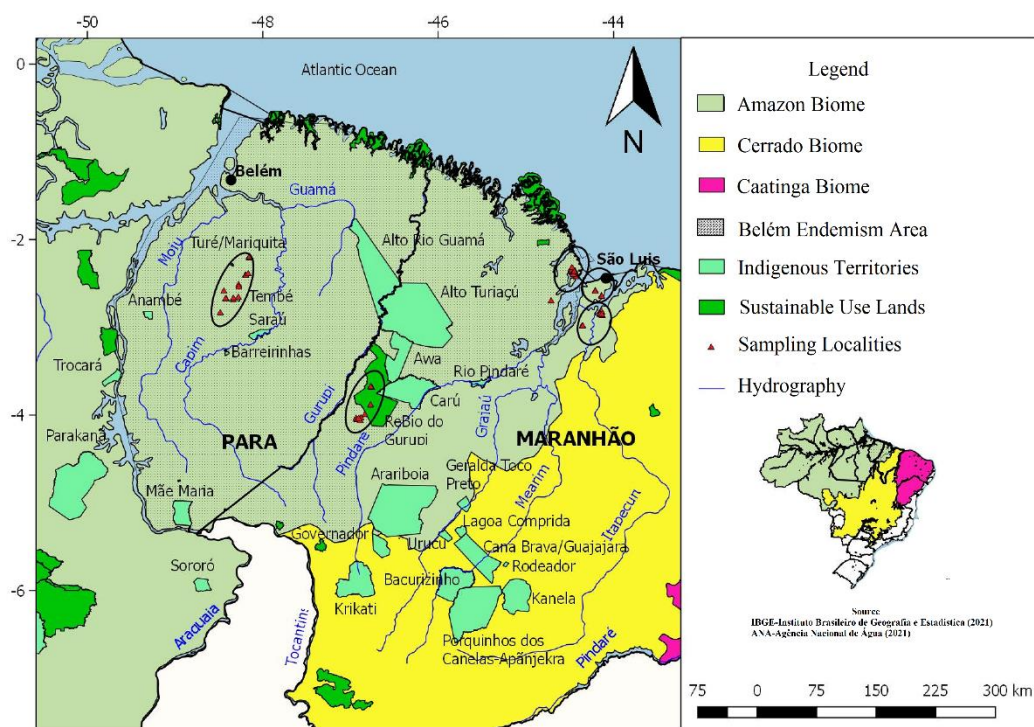
The selected individuals come from four different land use and were collected in 7 different locations, 6 in the State of Maranhão and Pará, Brazil were: Centro Novo do Maranhão and Itinga do Maranhão (3°46' S; 46°44' W) (samplings inside or near the Gurupi Biological Reserve), São Luís (2°34' S; 44°16'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

696



697

698 Figure 1. Sampling locations of total oligochaetes from the Soil Invertebrates Collection in
699 the Soil Biology Laboratory from Maranhão State University in the Eastern Amazon. Source:
700 IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2021) and ANA-Agência Nacional de Água
701 (2021).

702 2.4 Earthworm collection and sample preparation

703 The earthworms collected in the field were preserved in 96% alcohol at 1:3 biomass to
704 ethyl alcohol volume ratio. Alcohol was changed every 24 h for three days after collection,
705 followed by a final preservation stage with ethyl alcohol (99%). Clitellated species were not

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

2.5 Soil analysis

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

was calculated by dividing soil dry mass by cylinder volume. Samples collected at the same depth from each plot were combined to create composite samples, which were used to estimate physical-chemical parameters. Soil particle size was determined using the densitometry method after air-drying and sieving [44]. Each sample was analyzed for pH (using a 0.01 M CaCl_2 suspension with a soil/solution ratio of 1:2.5 v/v), P-availability (extracted using Amberlite IRA 400 resin), and exchangeable K (Mehlich I), Ca, Mg (KCl extraction), and H+Al (extracted using the SMP method) according to standard methods of the Agronomic Institute of Campinas [45]. Cation exchange capacity (CEC) was calculated as the sum of K, Ca, Mg, and (H+Al), while the sum of bases (BS) was calculated as the sum of K, Ca, and Mg. Base saturation percentage (V%) was calculated as $\text{BS}/\text{CEC} \times 100$.

2.6 Statistical Analysis

2.6.1 Functional traits

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

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

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

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

Since these are models based on Bayesian statistics, we use Markov chain simulations to estimate the regression and correlation coefficients of the potential interactions between the dependent variables and the covariates. Three models were used: the first model, called the null model, does not account for the influence of soil, land-uses and geographic distance on the variability of functional traits; the second model (model A) incorporates soil variables, and the

third model (model B) also includes geographic distance as an explanatory variable of the observed trait variability. Since not all species were present and selected in the different areas, we considered the geographical distance between the points as a variable in the hierarchical model. [49].

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

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

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

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

3.0 RESULTS

3.1 Bio-ecological aspects of earthworms

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

831 mainly in swampy soil in lowlands with medium to high organic matter, this species was absent in
832 the more conserved plots. [47–49] (Supplementary Table S2).

833

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

837

838

839

840 *3.2 Variability of functional traits in earthworm's species*

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

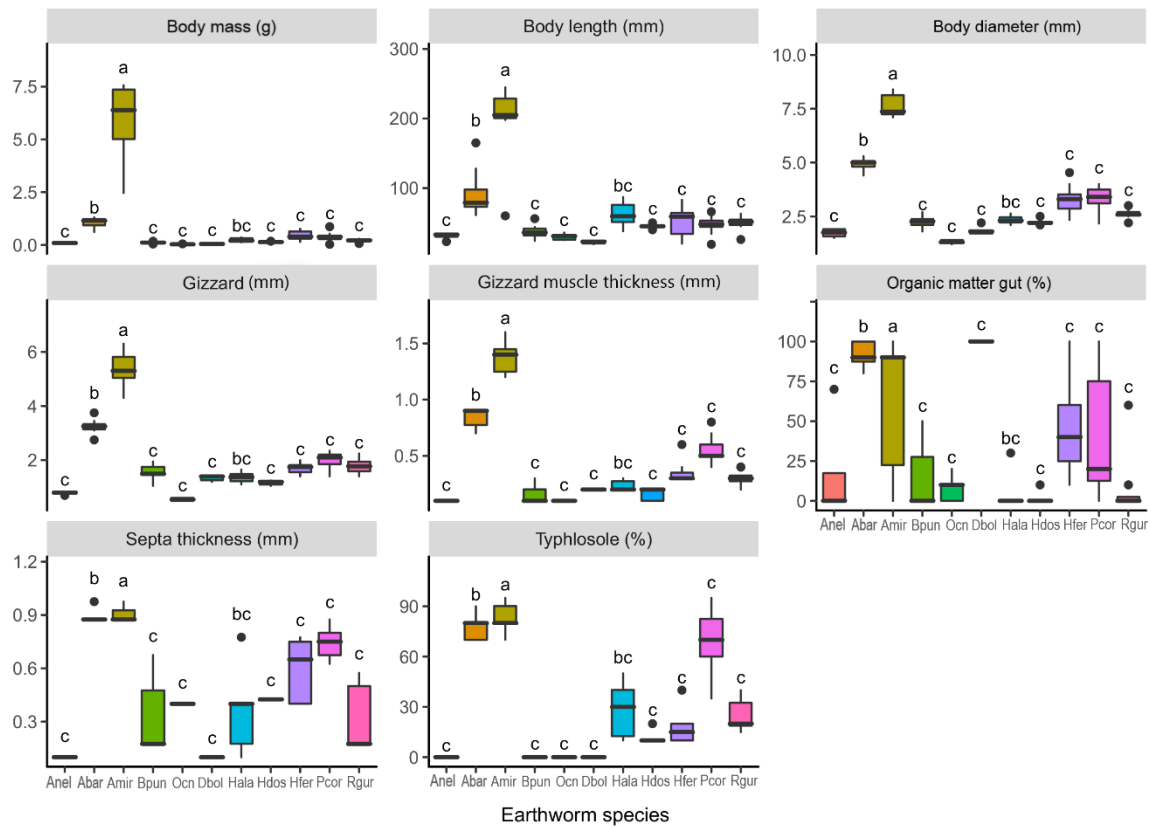


Figure 2. Differences in functional traits among oligochaete species. Simple linear model with adjustment for heterogeneity of variance (gamma distribution). Equal letters do not differ statistically according to Tukey's test. The linear model was adjusted for heterogeneity of variances at the 5% probability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

3.3 Variability of ecological preferences for different species

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

physico-chemical attributes, particularly clayey soils, fine sand, and even soils with higher Ca content (Figure 3), whereas in soils with coarse sand and low P value the variability is lower. *P. corethrurus* (Pcor) was found in almost all areas but was related to low areas (Supplementary Table S1 and S2). The earthworms in this study came from 4 different land uses with significant variability and, because of this, it is necessary to investigate which proportion of functional traits variability could be explained by soils properties. These effects were explored in detail through 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 $P \leq 0.05$.

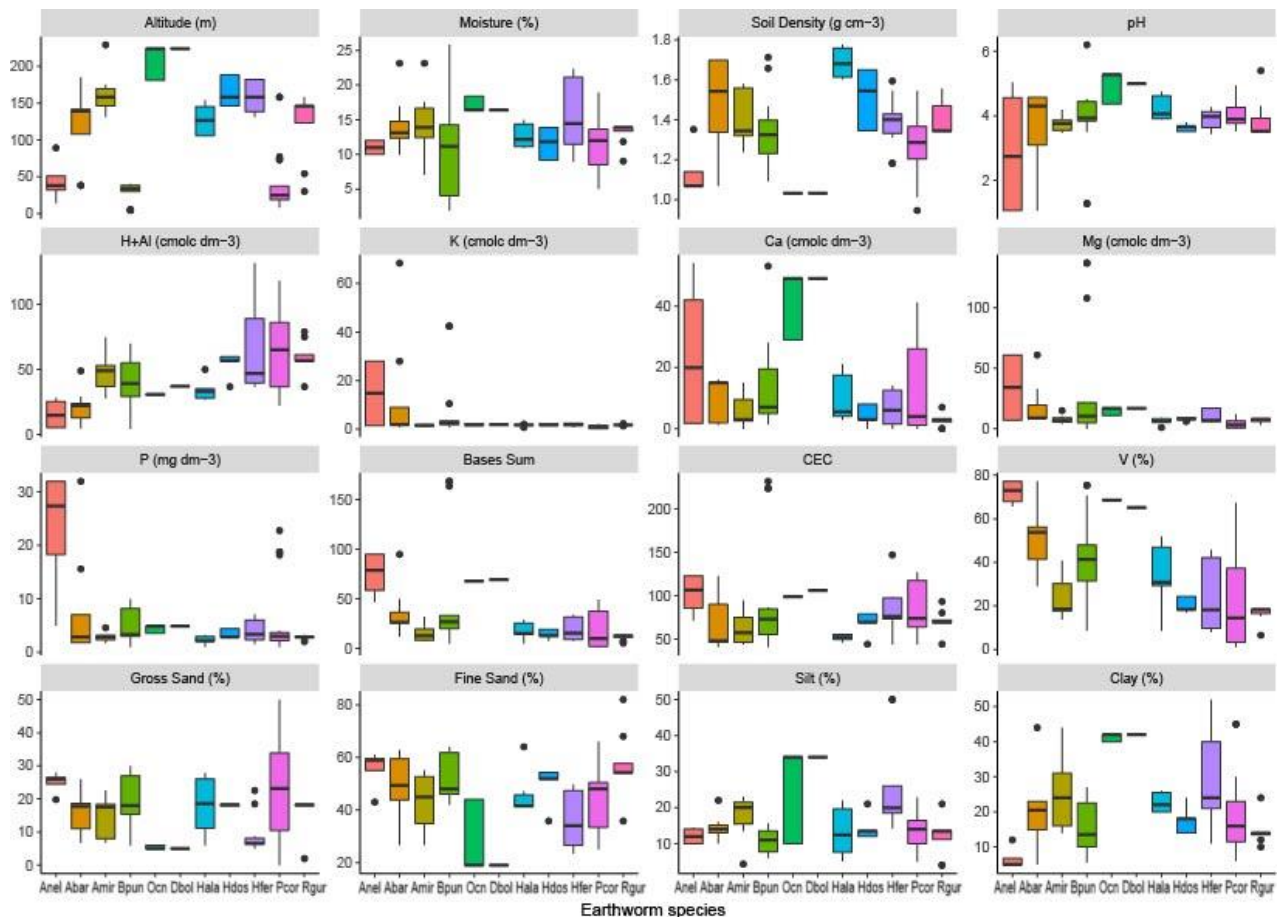


Figure 3. Ranges of soil attributes where earthworm species were sampled. Legend: AN - *Arraia nelmae*; ATB - *Andiorrhinus Turedrilus barrosoi*; ATM - *Andiorrhinus Turedrilus miricuri*; BP - *Brasilisia punki*; DA - *Dichogaster afinis*; DB - *Dichogaster bolai*; HA - *Holoscolex alatus*; HD - *Holoscolex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

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

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

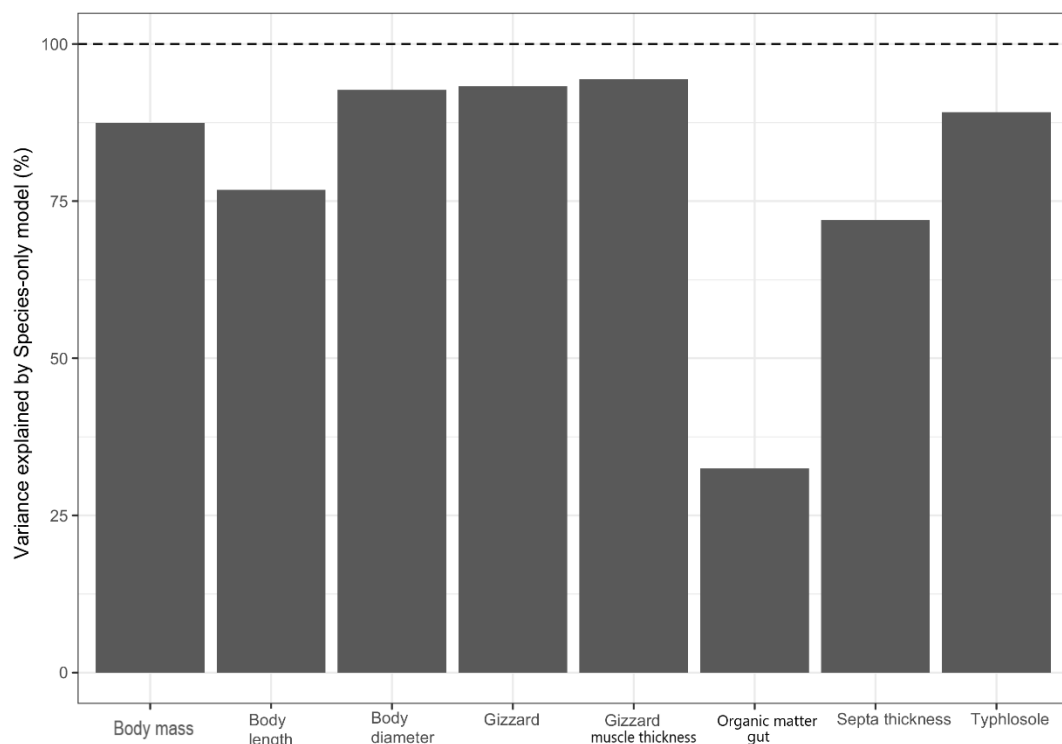


Figure 4 – Variation partitioning of the null model where the variability in earthworm traits is explained only by the species differences.

For the second model (model A), we noticed that accounting for the different land uses and

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

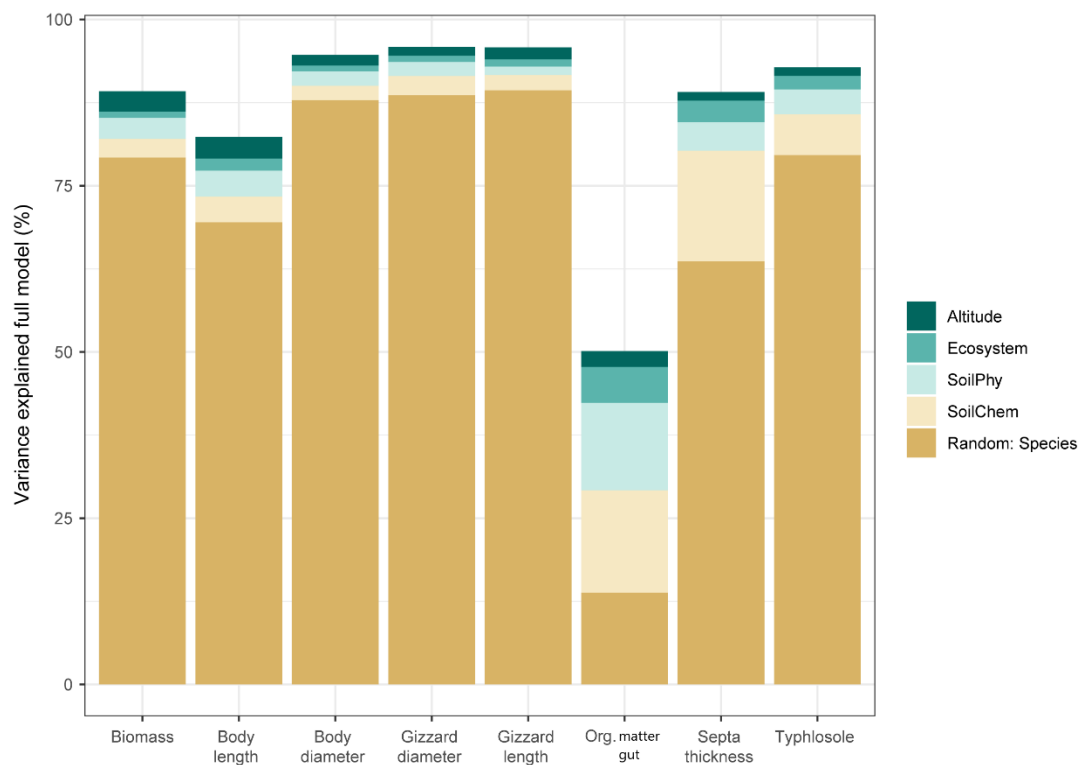


Figure 5 – Variation partitioning of model A with land use and soil factors as the predictors of the variance in earthworm traits (species considered a random effect).

Finally, for the third model (model B) the incorporation of geographic distances further enhanced the model's ability to capture the variance in earthworm traits (Figure 6). Now, all the predictors explained more the 90% of most of the variables, except for the organic matter content in earthworm gut, which also increased to 66.8% after accounting for the geographic distance.

Here again, we noticed a decreasing explanatory power of the species differences when including the environmental predictors and the geographic distance. For the organic matter in the earthworm gut, the contribution of species decreases from 27.5% in model A to 18.3% in model B, and the inclusion of geographic distances explained 29.8% of the variability in the gut's organic matter of earthworms.

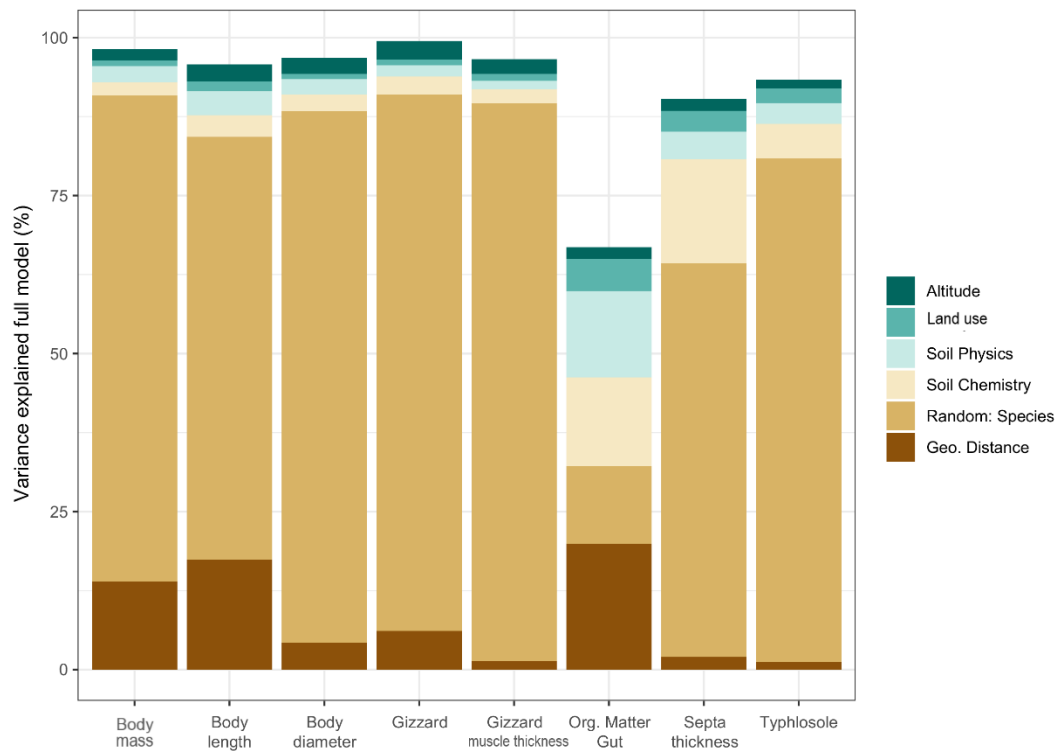


Figure 6. Partition of Variance. Effect of taxonomic differences and altitude, land use, soil physicochemical properties, and geographical distance on the variability of earthworm functional traits. Application of Hierarchical Modeling of Species Communities (HMSC). Model B.

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

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

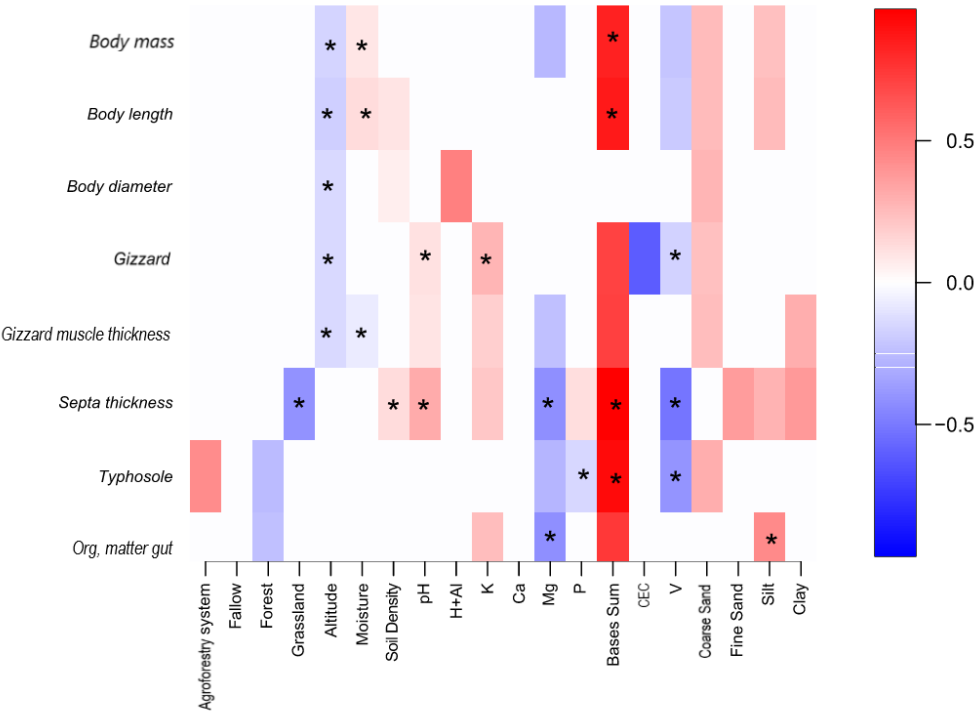


Figure 7: Effect of environmental factors (land use, soil physicochemical properties, and geographic distance) on the functional traits of oligochaetes as suggested by model B (gamma distribution). Red and blue colors represent the positive and negative values for the regression coefficient if the bounds 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.

3.5 Model performance in prediction of earthworm traits

As the models became more complex and their explanatory power improved, the cross-

validation allowed to assess the predictive performance of them (Table 2). The cross validation showed that the predictive performance (R^2 and RMSE) of organic matter in earthworm gut is better for the model A. Thus, knowing the soil conditions is relevant for better predicting the percentage of organic matter in the earthworm gut. For all the other traits (biomass, body length and diameter, gizzard diameter and length, and typhlosole), knowing the species is already enough to obtain a reliable estimate of the earthworm traits (Table 2).

Table 2 - 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 measure of how close the predictions are to the data.

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

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

973 4.0 DISCUSSION

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5.0 CONCLUSION

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

ACKNOWLEDGEMENTS

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

1100 REFERENCE

- 1101 [1] M. Hedde, F. van Oort, I. Lamy, Functional traits of soil invertebrates as indicators for
1102 exposure to soil disturbance, *Environmental Pollution*. 164 (2012) 59–65.
1103 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.01.017>.
- 1104 [2] R. Lal, Effects of macrofauna on soil properties in tropical ecosystems, *Agric Ecosyst*
1105 *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).
- 1106 [3] J.W. van Groenigen, I.M. Lubbers, H.M.J. Vos, G.G. Brown, G.B. de Deyn, K.J. van
1107 Groenigen, Earthworms increase plant production: a meta-analysis, *Sci Rep.* 4 (2014) 1–7.
- 1108 [4] E. Blanchart, A. Albrecht, J. Alegre, A. Duboisset, C. Gilot, B. Pashanasi, P. Lavelle, L.
1109 Brussaard, Effects of earthworms on soil structure and physical properties, CAB International,
1110 Wallingford, UK, 1999.
- 1111 [5] E. Garnier, M.L. Navas, A trait-based approach to comparative functional plant ecology:
1112 concepts, methods and applications for agroecology. A review, *Agronomy for Sustainable*
1113 *Development* 2011 32:2. 32 (2011) 365–399. <https://doi.org/10.1007/S13593-011-0036-Y>.
- 1114 [6] B. Pey, J. Nahmani, A. Auclerc, Y. Capowiez, D. Cluzeau, J. Cortet, T. Decaens, L.
1115 Deharveng, F. Dubs, S. Joimel, C. Briard, F. Grumiaux, M.-A. Laporte, A. Pasquet, C. Pelosi, C.
1116 Pernin, J.-F. Ponge, S. Salmon, L. Santorufo, M. Hedde, Current use of and future needs for soil
1117 invertebrate functional traits in community ecology, *Basic Appl Ecol.* 15 (2014) 194–206.
1118 <https://doi.org/10.1016/j.baee.2014.03.007>.
- 1119 [7] B. Fournier, E. Samaritani, J. Shrestha, E.A.D. Mitchell, R.C. Le Bayon, Patterns of
1120 earthworm communities and species traits in relation to the perturbation gradient of a restored
1121 floodplain, *Applied Soil Ecology*. 59 (2012) 87–95.
1122 <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2012.03.015>.
- 1123 [8] K.E. Lee, A key for the identification of New Zealand earthworms, Soil Bureau,
1124 Department of Scientific and Industrial Research, 1959.
- 1125 [9] M.B. Bouché, Lombriciens de France - écologie et systématique, Institut National de
1126 Recherche en Agriculture, Alimentation et Environnement, Paris, 1972.
- 1127 [10] C. Violle, M.L. Navas, D. Vile, E. Kazakou, C. Fortunel, I. Hummel, E. Garnier, Let the
1128 concept of trait be functional!, *Oikos*. 116 (2007) 882–892. <https://doi.org/10.1111/J.0030-1299.2007.15559.X>.
- 1130 [11] B. Pey, M.A. Laporte, J. Nahmani, A. Auclerc, Y. Capowiez, G. Caro, D. Cluzeau, J. Cortet,
1131 T. Decaens, F. Dubs, S. Joimel, M. Guernion, C. Briard, F. Grumiaux, B. Laporte, A. Pasquet, C.
1132 Pelosi, C. Pernin, J.F. Ponge, S. Salmon, L. Santorufo, M. Hedde, A thesaurus for soil invertebrate
1133 trait-based approaches, *PLoS One*. 9 (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108985>.
- 1134 [12] N.M. Fountain-Jones, S.C. Baker, G.J. Jordan, Moving beyond the guild concept:
1135 Developing a practical functional trait framework for terrestrial beetles, *Ecol Entomol.* 40 (2015)
1136 1–13. <https://doi.org/10.1111/EEN.12158>.
- 1137 [13] M. Vandewalle, F. de Bello, M.P. Berg, T. Bolger, S. Dolédec, F. Dubs, C.K. Feld, R.
1138 Harrington, P.A. Harrison, S. Lavorel, P.M. da Silva, M. Moretti, J. Niemelä, P. Santos, T. Sattler,
1139 J.P. Sousa, M.T. Sykes, A.J. Vanbergen, B.A. Woodcock, Functional traits as indicators of

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

- 1182 <https://doi.org/10.24199/j.mvsr.2002.03>.
- 1183 [26] M.A. Little, Evolutionary Strategies for Body Size, *Front Endocrinol (Lausanne)*. 11
1184 (2020) 107. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2020.00107/BIBTEX>.
- 1185 [27] M.J.I. Briones, R. Álvarez-Otero, Body wall thickness as a potential functional trait for
1186 assigning earthworm species to ecological categories, *Pedobiologia (Jena)*. 67 (2018) 26–34.
1187 <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2018.02.001>.
- 1188 [28] W.U. Blanckenhorn, The quarterly review of biology: The evolution of body size: What
1189 keeps organisms small?, *Quarterly Review of Biology*. 75 (2000) 385–407.
1190 <https://doi.org/10.1086/393620>.
- 1191 [29] B.S.-W.P.S. Journal, undefined 2011, The gizzard: function, influence of diet structure and
1192 effects on nutrient availability, Cambridge.Org. (n.d.).
1193 [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)
1194 [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)
1195 [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).
- 1196 [30] C.A. Alvares, J.L. Stape, P.C. Sentelhas, J.L. de Moraes Gonçalves, G. Sparovek, Köppen's
1197 climate classification map for Brazil, *Meteorologische Zeitschrift*. 22 (2013) 711–728.
1198 <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>.
- 1199 [31] POWER Project's, The data was obtained from the National Aeronautics and Space
1200 Administration (NASA) Langley Research Center (LaRC) Prediction of Worldwide Energy
1201 Resource (POWER) Project funded through the NASA Earth Science/Applied Science Program.,
1202 (2022). <https://power.larc.nasa.gov/docs/> (accessed August 16, 2022).
- 1203 [32] C.A.A. Peixoto Neto, G.P. Lima, L.P.F.A. Chaves, R.A. Silva, G.M. Siqueira,
1204 BIOGEOGRAPHY OF THE CENTRAL MESOREGION OF MARANHÃO (BRAZIL), *Journal*
1205 *of Geospatial Modelling*. 1 (2016) 33. <https://doi.org/10.22615/JGM-1.1-5812>.
- 1206 [33] IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, (2010).
1207 <https://www.ibge.gov.br/pt/inicio.html> (accessed December 16, 2022).
- 1208 [34] L.S. Lima, M.T. Coe, B.S. Soares Filho, S. v. Cuadra, L.C.P. Dias, M.H. Costa, L.S. Lima,
1209 H.O. Rodrigues, Feedbacks between deforestation, climate, and hydrology in the Southwestern
1210 Amazon: implications for the provision of ecosystem services, *Landscape Ecology* 2013 29:2.
1211 29 (2013) 261–274. <https://doi.org/10.1007/S10980-013-9962-1>.
- 1212 [35] G.G. Brown, S.W. James, *Ecologia, biodiversidade e biogeografia das minhocas no Brasil*,
1213 in: G.G. Brown, C. Fragoso (Eds.), *Minhocas Na América Latina: Biodiversidade e Ecologia*,
1214 Embrapa Soja, Londrina, 2007: pp. 297–381.
- 1215 [36] L. Cunha, G.G. Brown, D.W.G. Stanton, E. da Silva, F.A. Hansel, G. Jorge, D. McKey, P.
1216 Vidal-Torrado, R.S. Macedo, E. Velasquez, S.W. James, P. Lavelle, P. Kille, Soil animals and
1217 pedogenesis: The role of earthworms in anthropogenic soils, *Soil Sci*. 181 (2016) 110–125.
1218 <https://doi.org/10.1097/SS.0000000000000144>.
- 1219 [37] B.T.S. dos Santos, M.L.C. Bartz, L.M. Hernández-García, G.X. Rousseau, M.B. Martins,
1220 S.W. James, New earthworm species of Righiodrilus (Clitellata, Glossoscolecidae) from eastern
1221 Amazonia, *Zootaxa*. 4242 (2017) 392–400. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4242.2.11>.
- 1222 [38] L.M. Hernández-García, J.E. Burgos-Guerrero, G.X. Rousseau, S.W. James, *Brasilisia* n.

- 1223 gen. and Arraia n. gen., two new genera of Ocnerodrilidae (Annelida, Clitellata, Oligochaeta)
 1224 from Eastern Amazonia, Brazil, Zootaxa. 4496 (2018) 472–480.
 1225 <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4496.1.36>.
- 1226 [39] L.M. Hernández-García, J.E. Burgos-Guerrero, B.T. Silva Dos Santos, G.X. Rousseau,
 1227 S.W. James, Three new species of Holoscolex (Clitellata, Glossoscolecidae) from the Gurupi
 1228 Biological Reserve, last forest remnant of the Belém Endemism Area, Eastern Amazon, Zootaxa.
 1229 4496 (2018) 459–471. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4496.1.35>.
- 1230 [40] L.M. Hernández-García, M.L. Bartz, J.E. Burgos-Guerrero, S.C. Sousa, G.X. Rousseau,
 1231 S.W. James, Additions to Andiorrhinus (Turedrilus) (Rhinodrilidae, Clitellata) from Eastern
 1232 Amazonia, Zootaxa. 4496 (2018) 481–491. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4496.1.37>.
- 1233 [41] L.M. Hernández-García, S.C. Souza, J.E.B. Guerrero, G.X. Rousseau, MINHOCAS DA
 1234 AMAZÔNIA MARANHENSE, PRIMEIRO LEVANTAMENTO DE UM PATRIMÔNIO
 1235 BIOLÓGICO RICO E AMEAÇADO, in: Régia Maria Reis Gualter, Ana Roberta Lima de
 1236 Miranda (Eds.), A Ciência Do Solo No Progresso Técnico-Científico e Sustentável Do Maranhão:
 1237 Um Panorama Das Pesquisas Em Seus Agroecossistemas, 1ª, Acadêmica Editorial, Parnaíba PI,
 1238 2021: pp. 52–71.
- 1239 [42] S.C. Sousa, A.M. de Sousa, L.M. Hernández-García, R.M.R. Gualter, G.X. Rousseau, A
 1240 new earthworm species of the genus Rhinodrilus (Rhinodrilidae, Clitellata) and new records of
 1241 earthworms species from the Amazon-Cerrado-Caatinga transition in the State of Maranhão,
 1242 Brazil, Zootaxa. 4810 (2020) 169–174. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4810.1.11>.
- 1243 [43] S.C. Sousa, L.M. Hernandez-Garcia, G.X. Rousseau, A new species of Pontoscolex
 1244 earthworm (Rhinodrilidae, Clitellata) from the Gurupi Biological Reserve, along with records of
 1245 earthworm species from the Amazon region of Maranhão, Brazil, Zootaxa. 4801 (2020) 105–
 1246 114. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4801.1.4>.
- 1247 [44] M.E.C. CLAESSEN, M.E.C. Claessen, Manual de métodos de análise de solo., Rio de
 1248 Janeiro: EMBRAPA-CNPq, 1997., 1997.
- 1249 [45] E. Bernardo, R. João, C. De Andrade, H. Cantarella, J.A. Quaggio, B. Raij, J.C. Van;
 1250 Andrade, H.; De; Cantarella, J.A. Quaggio, Análise química para avaliação da fertilidade de solos
 1251 tropicais, (2001). http://lab.iac.sp.gov.br/Publicacao/Raij_et_al_2001_Metod_Anal_IAC.pdf
 1252 (accessed March 30, 2023).
- 1253 [46] F. Cribari-Neto, W.B. da Silva, A new heteroskedasticity-consistent covariance matrix
 1254 estimator for the linear regression model, AStA Advances in Statistical Analysis. 95 (2011) 129–
 1255 146. <https://doi.org/10.1007/S10182-010-0141-2>.
- 1256 [47] G. Tikhonov, Ø.H. Opedal, N. Abrego, A. Lehtikainen, M.M.J. de Jonge, J. Oksanen, O.
 1257 Ovaskainen, Joint species distribution modelling with the r-package Hmsc, Methods Ecol. Evol.
 1258 11 (2020) 442–447. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13345>.
- 1259 [48] Ø.H. Opedal, S.J. Hegland, Using hierarchical joint models to study reproductive
 1260 interactions in plant communities, Journal of Ecology. 108 (2020) 485–495.
 1261 <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13301>.
- 1262 [49] O. Ovaskainen, G. Tikhonov, A. Norberg, F. Guillaume Blanchet, L. Duan, D. Dunson, T.
 1263 Roslin, N. Abrego, How to make more out of community data? A conceptual framework and its
 1264 implementation as models and software, (2017). <https://doi.org/10.1111/ele.12757>.

- 1265 [50] S. Muff, E.B. Nilsen, R.B. O'Hara, C.R. Nater, Rewriting results sections in the language
1266 of evidence, *Trends Ecol Evol.* 37 (2022) 203–210.
1267 [https://doi.org/10.1016/J.TREE.2021.10.009/ATTACHMENT/EBFC6F62-753D-4E53-A08C-](https://doi.org/10.1016/J.TREE.2021.10.009/ATTACHMENT/EBFC6F62-753D-4E53-A08C-1334AB7A9958/MMC1.ZIP)
1268 1334AB7A9958/MMC1.ZIP.
- 1269 [51] S. Müller, J. Scealy, A.W.-S. Science, undefined 2013, Model selection in linear mixed
1270 models, *Projecteuclid.Org.* 28 (2013) 135–167. <https://doi.org/10.1214/12-STS410>.
- 1271 [52] D.J. Barr, R. Levy, C. Scheepers, H.J. Tily, Random effects structure for confirmatory
1272 hypothesis testing: Keep it maximal, *J Mem Lang.* 68 (2013) 255–278.
1273 <https://doi.org/10.1016/J.JML.2012.11.001>.
- 1274 [53] P.J. Bohlen, S. Scheu, C.M. Hale, M.A. McLean, S. Migge, P.M. Groffman, D. Parkinson,
1275 Non-Native Invasive Earthworms as Agents of Change in Northern Temperate Forests, *Front*
1276 *Ecol Environ.* 2 (2004) 427. <https://doi.org/10.2307/3868431>.
- 1277 [54] S.W. James, Re-erection of *Rhinodrilidae* Benham, 1890, a senior synonym of
1278 *Pontoscolecidae* James, 2012 (Annelida: Clitellata), *Zootaxa.* 3540 (2012) 67–68–67–68.
1279 <https://doi.org/10.11646/ZOOTAXA.3540.1.6>.
- 1280 [55] C.A. Edwards', K.E. Fletcher, Interactions between Earthworms and Micro-organisms in
1281 Organic-matter Breakdown, 1988.
- 1282 [56] E.K. Cameron, T. Decaëns, E. Lapied, D. Porco, N. Eisenhauer, Earthworm databases and
1283 ecological theory: Synthesis of current initiatives and main research directions, *Applied Soil*
1284 *Ecology.* 104 (2016) 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.11.012>.
- 1285 [57] D. De Vleeschauwer, R.L.-S. Sci, undefined 1981, Properties of worm casts under
1286 secondary tropical forest regrowth, *Biblio.Iita.Org.* 132 (1981).
1287 [https://biblio.iita.org/documents/S81ArtDevleeschauwerPropertiesInthomNodev.PDF-](https://biblio.iita.org/documents/S81ArtDevleeschauwerPropertiesInthomNodev.PDF-23add42c42541085dd61ed8012c45f05.pdf)
1288 23add42c42541085dd61ed8012c45f05.pdf (accessed March 30, 2023).
- 1289 [58] R.T. Corlett, Tropical Forest Ecosystem Ecology: Water, Energy, Carbon, and Nutrients,
1290 in: L. Pancel, M. Köhl (Eds.), *Tropical Forestry Handbook*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin,
1291 Heidelberg, 2016: pp. 491–501. https://doi.org/10.1007/978-3-642-54601-3_53.
- 1292 [59] T. Li, J. Zhang, X. Wang, I. Hartley, J. Zhang, Y.Z.-A.S. Ecology, undefined 2022, Fungal
1293 necromass contributes more to soil organic carbon and more sensitive to land use intensity than
1294 bacterial necromass, *Elsevier.* (n.d.).
1295 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929139322001081> (accessed March 30,
1296 2023).
- 1297 [60] P. Lavelle, F. Charpentier, C. Villenave, J.-P. Rossi, L. Derouard, B. Pashanasi, J. André,
1298 J.-F. Ponge, N. Bernier, Effects of earthworms on soil organic matter and nutrient dynamics at a
1299 landscape scale over decades, in: *Earthworm Ecology*, CRC Press Boca Raton, 2004: pp. 145–
1300 160.
- 1301 [61] P. Lavelle, A. Martin, Small-scale and large-scale effects of endogeic earthworms on soil
1302 organic matter dynamics in soils of the humid tropics, *Soil Biol Biochem.* 24 (1992) 1491–1498.
1303 [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(92\)90138-N](https://doi.org/10.1016/0038-0717(92)90138-N).
- 1304 [62] M. Blouin, M.E. Hodson, E.A. Delgado, G. Baker, L. Brussaard, K.R. Butt, J. Dai, L.
1305 Dendooven, G. Peres, J.E. Tondoh, D. Cluzeau, J.J. Brun, A review of earthworm impact on soil
1306 function and ecosystem services, *Eur J Soil Sci.* 64 (2013) 161–182.

- 1307 <https://doi.org/10.1111/EJSS.12025>.
- 1308 [63] C.H.L. Silva Junior, D. Celentano, G.X. Rousseau, E.G. de Moura, I. van D. Varga, C.
 1309 Martinez, M.B. Martins, Amazon forest on the edge of collapse in the Maranhão State, Brazil,
 1310 Land Use Policy. 97 (2020) 104806. <https://doi.org/10.1016/J.LANDUSEPOL.2020.104806>.
- 1311 [64] A. Chauvel, M. Grimaldi, E. Barros, E. Blanchart, T. Desjardins, M. Sarrazin, P. Lavelle,
 1312 Pasture damage by an Amazonian earthworm, Nature. 398 (1999) 32–33.
 1313 <https://doi.org/10.1038/17946>.
- 1314 [65] N.H. Barton, P.D. Keightley, Understanding quantitative genetic variation, Nature Reviews
 1315 Genetics 2001 3:1. 3 (2002) 11–21. <https://doi.org/10.1038/nrg700>.
- 1316 [66] K. Böhning-Gaese, T. Caprano, K. van Ewijk, M. Veith, Range Size: Disentangling Current
 1317 Traits and Phylogenetic and Biogeographic Factors, <https://doi.org/10.1086/501078>. 167
 1318 (2015) 555–567. <https://doi.org/10.1086/501078>.
- 1319 [67] J. Mathieu, EGrowth: A global database on intraspecific body growth variability in
 1320 earthworm, Soil Biol Biochem. 122 (2018) 71–80.
 1321 <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2018.04.004>.
- 1322 [68] F. de Bello, S. Lavorel, C.H. Albert, W. Thuiller, K. Grigulis, J. Dolezal, Š. Janeček, J.
 1323 Lepš, Quantifying the relevance of intraspecific trait variability for functional diversity, Methods
 1324 Ecol Evol. 2 (2011) 163–174. <https://doi.org/10.1111/J.2041-210X.2010.00071.X>.
- 1325 [69] O.L. Petchey, K.L. Evans, I.S. Fishburn, K.J. Gaston, Low functional diversity and no
 1326 redundancy in British avian assemblages, Journal of Animal Ecology. (2007) 977–985.
- 1327 [70] M.B. Bouché, Strategies lombriciennes, Ecological Bulletins. (1977) 122–132.
 1328
 1329

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

Resumo

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 Taxônomic 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 região de interesse 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 na amplificação e sequenciamento das amostras. 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.

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

1.1 Objetivo Geral

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

1.1.1 Objetivos Específicos

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

2. MATERIAL E MÉTODOS

1396 *Coleção de minhocas e prepare das amostras*

1397 Os anelídeos coletados no campo foram preservados em 96% de álcool à razão de 1:3 de
 1398 biomassa para volume de álcool, para garantir a integridade do material. O álcool era trocado a
 1399 cada 24 h por três dias após a coleta, seguido de uma etapa final de conservação com álcool etílico
 1400 PA (99%). Um total de 56 indivíduos de minhocas pertencentes a 10 espécies: *Andiorrhinus*
 1401 (*Turedrilus*) *barrosoi*; *Andiorrhinus* (*Turedrilus*) *awa*; *Andiorrhinus* (*Turedrilus*) *miricuri*;
 1402 *Brasilisia punki*; *Ocnereus* *NG*; *Holoscolex alatus*; *Holoscolex dossantosi*; *Holoscolex fernandoi*;
 1403 *Pontoscolex corethrurus*; *Righiodrilus gurupi*, foram obtidos da coleção de invertebrados do
 1404 Laboratório de Artrópodes e Microbiologia do Solo da Universidade Estadual do Maranhão. As
 1405 minhocas foram descritas de acordo com as características anatômicas em estudos realizados por
 1406 (DOS SANTOS et al., 2017; HERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2018a, 2018b, 2018c, 2021; SOUSA;
 1407 HERNANDEZ-GARCIA; ROUSSEAU, 2020).

1408 *Extração do DNA das Oligoquetas*

1409 O DNA foi obtido através do uso de Kits comerciais Wizard® Genomic DNA Purification
 1410 Kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA) para extração de DNA. As etapas de extração de
 1411 DNA foram seguidas de acordo com o protocolo do fabricante. A presença de DNA foi verificada
 1412 por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8% e quantificado por espectrometria (Biodrop,
 1413 UK).

1414 *Amplificação do DNA*

1415 A região COI - citocromo C oxidase subunidade I (COI), correspondente à região do DNA
 1416 barcode (Hebert et al., 2003), seguindo protocolo Internacional Barcode of Life project
 1417 (<http://ibol.org/>) Através do uso dos iniciadores LCO1490/HCO2198 (James et al., 2012; Folmer et
 1418 al., 1994; Hebert et al., 2003).

1419 Forward (LCO1490) 5' – GGTCGAACAAATCATAAAGATATTGG – 3'

1420 Reverse (HCO2198) 5' – TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA – 3'

1421 As condições de PCR consistirão na desnaturação inicial em 94°C por dois minutos, seguido
 1422 de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento à 47°C por 60 segundos, e
 1423 alongação a 72°C por 90 segundos. O último ciclo, uma incubação a 72°C por sete minutos para
 1424 completar quaisquer fitas parcialmente não sintetizadas (JAMES et al., 2012) com algumas

1425 modificações. Amostras de DNA amplificado foram armazenadas em freezer -14 °C

1426 *Sequenciamento de DNA*

1427 As reações de sequenciamentos foram realizadas separadamente para cada iniciador sendo
 1428 utilizado 3uL de DNA amplificado e purificado, 0,5uL do primer, 1uL do kit de sequenciamento
 1429 Big Dye Terminator v.3.0, 3uL de tampão Save Money e 2,5uL de água ultra-pura. A reação de
 1430 sequenciamento será realizada em um termociclador, em que os ciclos: inicial a 96°C por 1 minuto,
 1431 e submetida a 30 ciclos de desnaturação a 96°C por 15 segundos, anelamento a 47°C por 5
 1432 segundos e elongação a 60°C por 4 minutos, após retiradas do termociclador serão adicionados as
 1433 amostras 2 uL de acetato de amônio, 66 uL de etanol absoluto e 10uL de água ultrapura e após
 1434 centrifugadas durante 50 minutos a 13.000 rpm o líquido será inteiramente desprezado e em
 1435 seguida adicionando-se 100 uL de etanol 70% as amostras serão levadas novamente à centrifuga
 1436 durante 15 minutos a 13.000 rpm novamente o líquido será desprezado, os tubos serão deixados
 1437 secar durante 24h. O sequenciamento se dará em sequenciadores do tipo Sanger de 96 capilares
 1438 Applied Biosystems ABI3500xl (Hitachi Termofisher).

1439 *Análise estatística*

1440 As sequências de DNA foram editadas no Bioedit v.5.0.6 (Hall, 2001) em seguida,
 1441 analisadas as distâncias no MEGA v.7 (Kumar et al., 2016), utilizando um algoritmo de vizinhança
 1442 mais próxima (Saitou et al., 1987) com o modelo de evolução selecionado a partir das análises no
 1443 programa ModelTest v.3.6 (Darriba et al., 2012) foram usado para seleção do modelo evolução
 1444 usando Critério de informação Akaike (CIA) (Akaike, 1973) e inferência Bayesiana (Schwarz,
 1445 1978) para estimar distâncias genéticas. As sequências no formato .ab1 foram editadas usando o
 1446 pacote sangeranalyseR na versão de software R com um Phred Score de 40. As sequências foram
 1447 comparadas com os bancos de dados filogenéticos de minhocas: *Boldsystem*, *Genbank*.

1448

1449 **3. RESULTADOS**

1450 Foram processadas a extração do DNA de 1.014 amostras de oligoquetas das regiões do
 1451 Gurupi Norte e Sul (Centro Novo e Itinga), Alcântara, Rosário, Tomé Açu e São Luís. Do total
 1452 foram amplificados 236 indivíduos, contudo, apenas 56 amostras foram para sequenciamento. Esta
 1453 seleção ocorreu devido prioridades inerentes a espécies já descritas morfologicamente. Podemos

notar que na figura 1, consta relatório de controle de PCR das amostras com presenças de bandas e com as especificações de ladder. Este mesmo relatório controle também foram feito para extração do DNA.

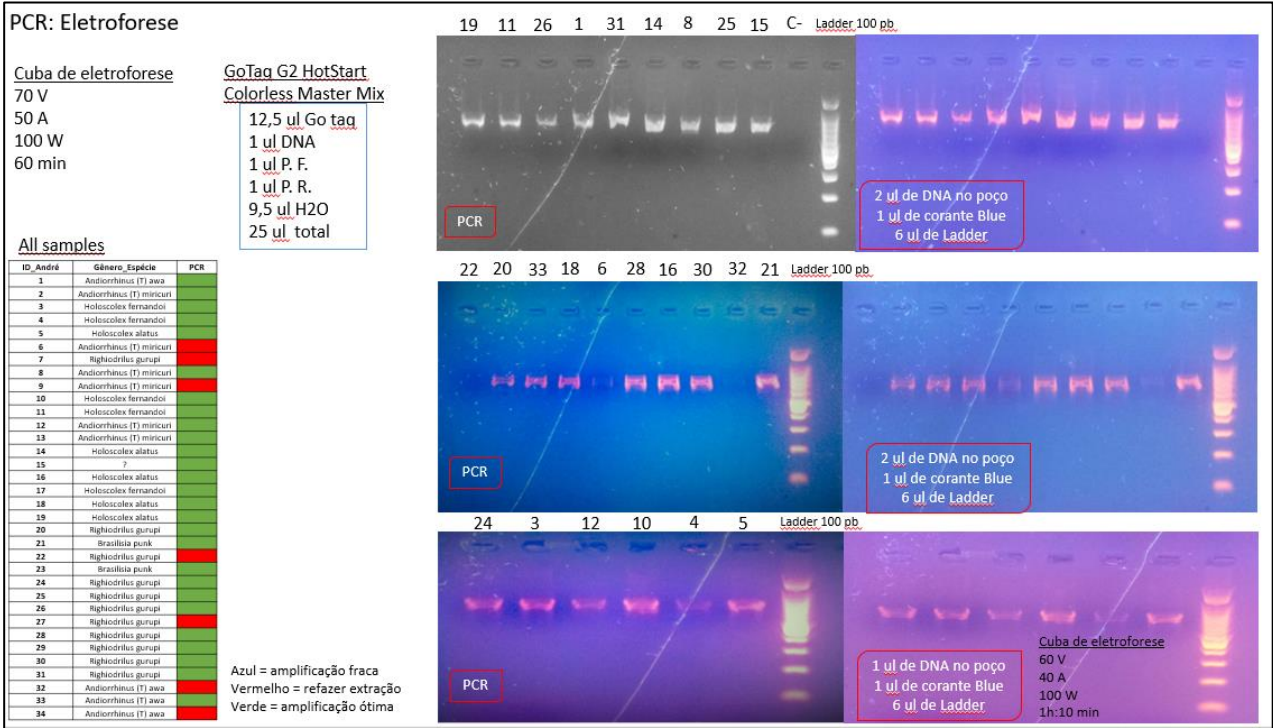


Figura 1. Amostra do controle de sequências DNA em gel de eletroforese

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

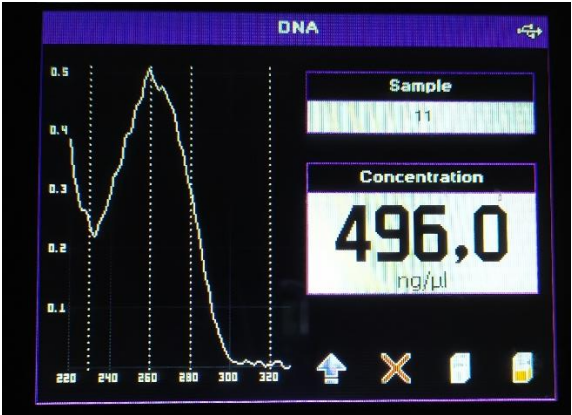


Figura 2. Leitura da concentração de DNA no picodrop

O eletroferograma do sequenciamento de DNA das minhocas demonstrou presença de sobreposições de nucleotídeos dificultando assim a edição e correção das bases tanto no *forward* quanto no *reverse*. Na figura 3 podemos observa a presença de sobreposição de nucleotídeos. As sequências no formato .abi foram editadas usando o pacote sangeranalyseR na versão de software R com um Phred Score de 40 ou superior.

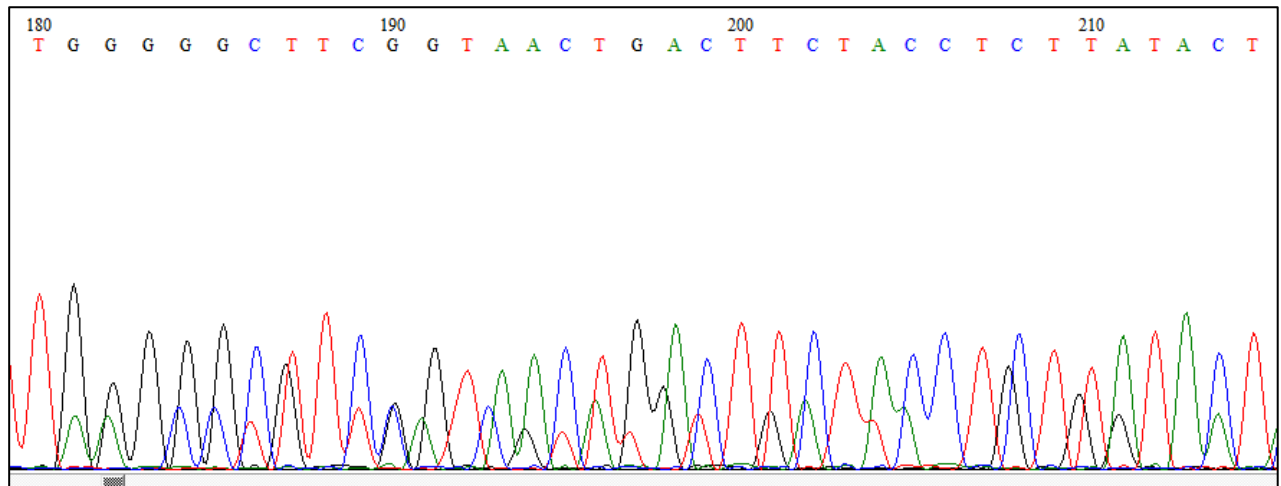


Figura 3. Eletroferograma de sequenciamento da fita forward entre as sequencia 180-215 pb.

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

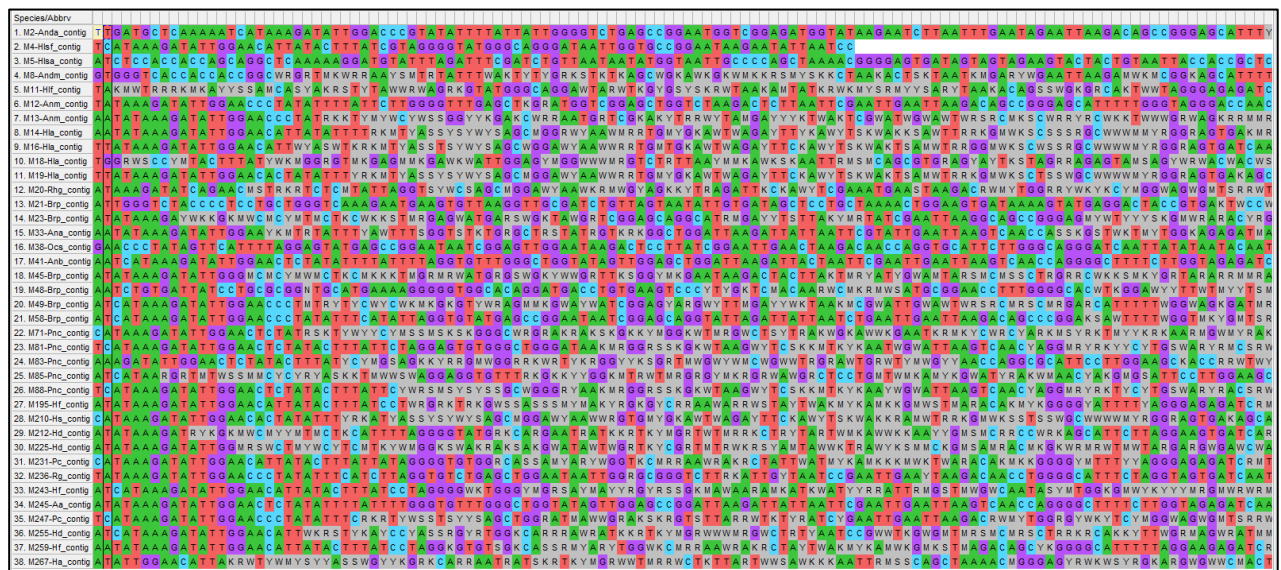


Figura 4. Todas as sequencias foram alinhadas usando *muscle* algoritmo no software MEGA

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

Apenas uma espécie de minhoca com qualidade parcialmente satisfatória foi possível criar árvore filogenética (Figura 6) representada pelas amostras de *Pontoscolex corethrurus* que apresentou similaridade de 99,75% com banco de dados *Boldsystems*. No entanto, os demais

1485 morfogrupos alinhados pela similaridade não demonstraram concatenação com as bases de dados
1486 existente.

1487 Podemos notar na figura 7 e 8 que os indivíduos de *Andiorrhinus* e *Holoscolex* fazem
1488 formação grupos externos quando comparados com indivíduos *Glossodrilus* e *Righiodrilus*
1489 (*Boldysystem*).

1490 Tabela 1. Espécies de minhocas usadas no sequenciamento e respectivas legendas usadas nas árvores
1491 filogenética

Espécies	Legendas
<i>Andiorrhinus (Turedrilus) barrosoi</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

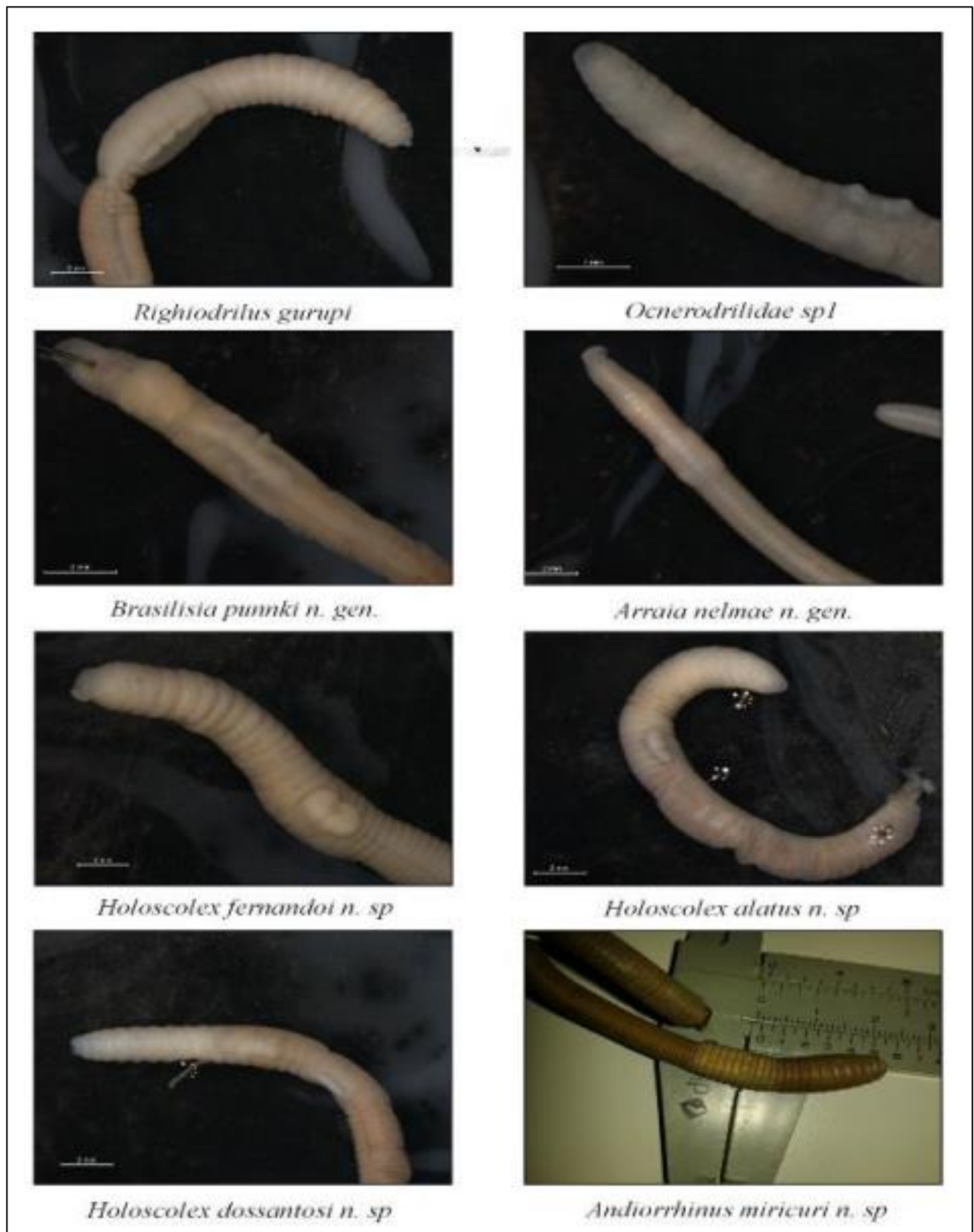


Figura 5. Ilustração de exemplares de espécies novas usadas no estudo de filogenético. Fonte: Hernandez-Garcia et., 2021

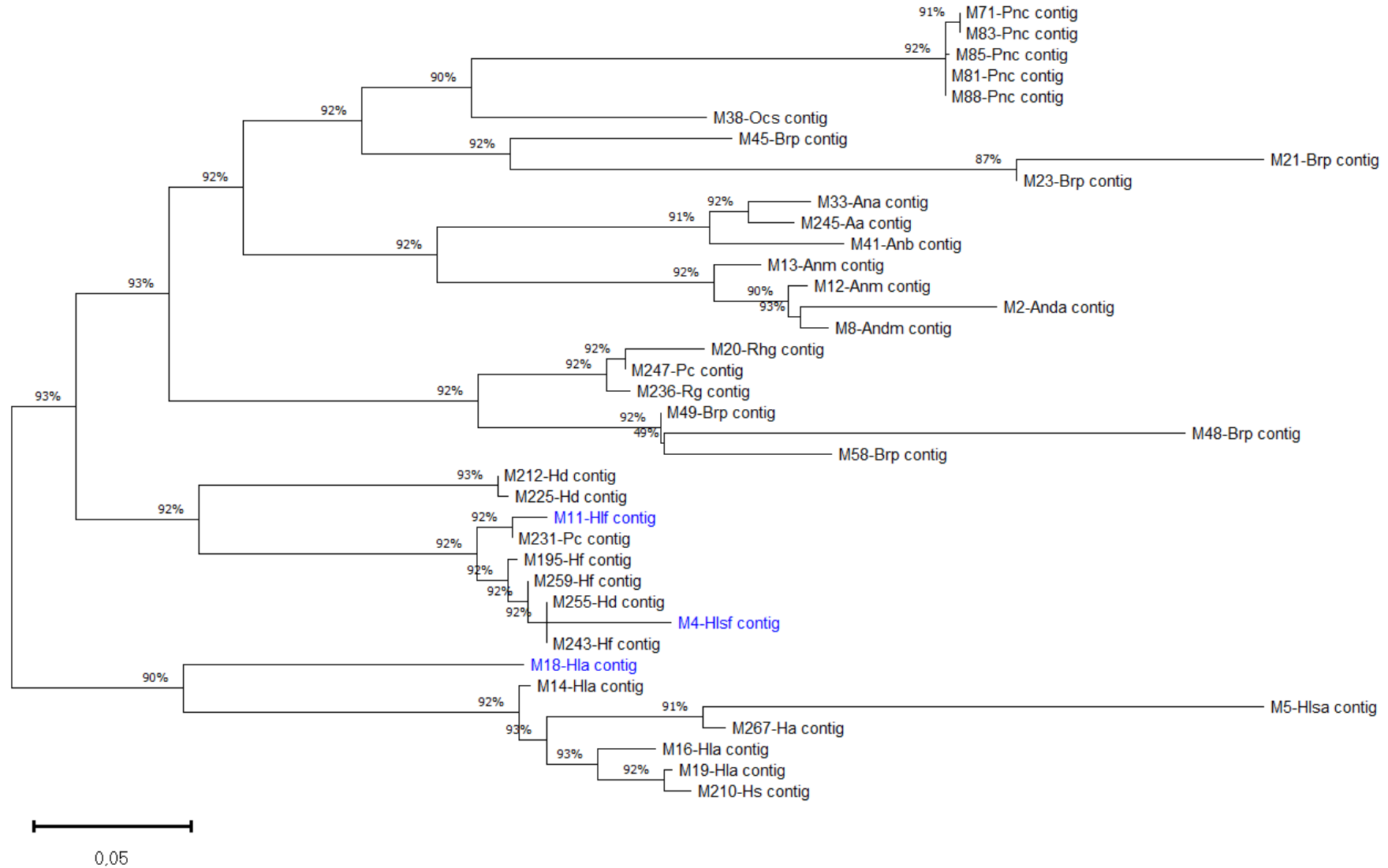


Figura 5. Árvore filogenética de máxima verossimilhança do gene COI exibindo todas amostras de minhocas.

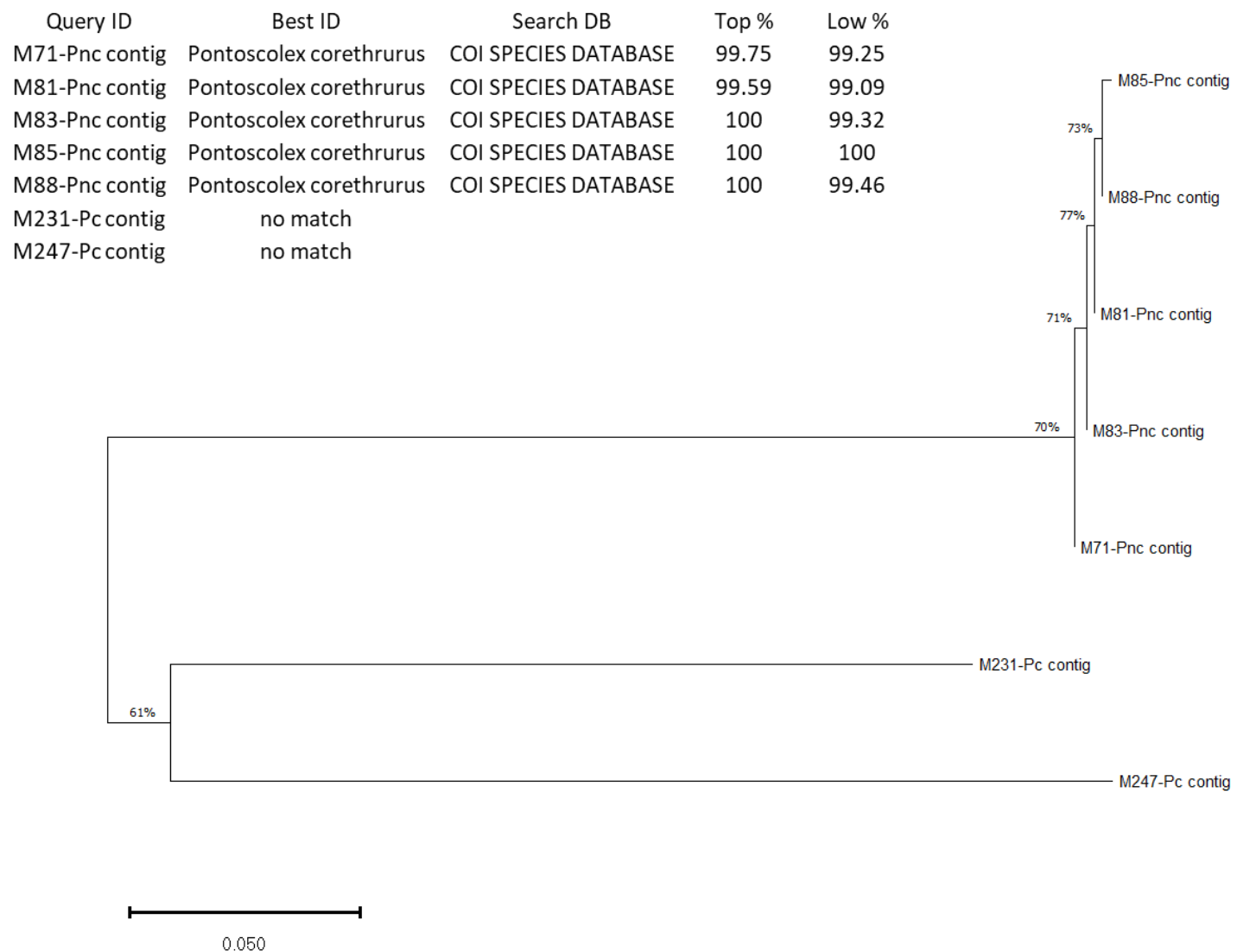


Figura 6. Árvore filogenética de máximo verossimilhança do gene COI das amostras de *Pontoscolex corethrurus* exibindo formação de dois grupos.

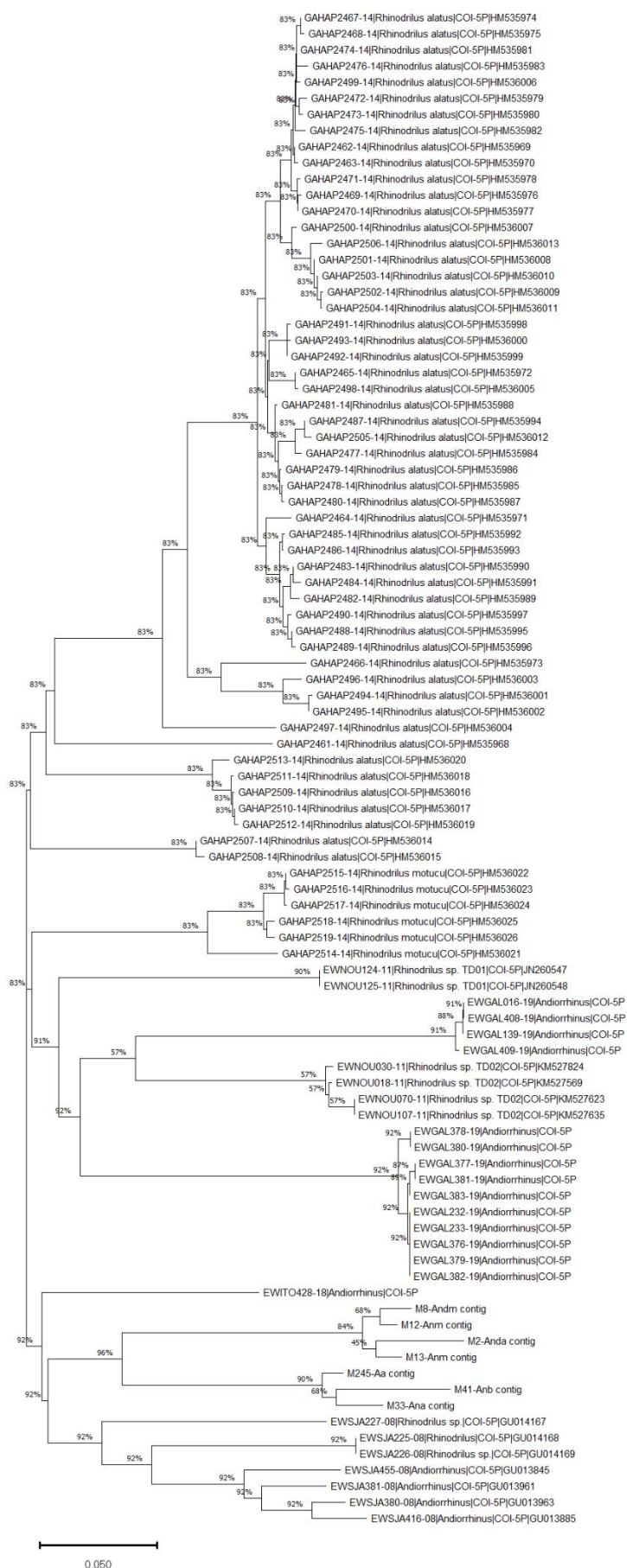


Figura 7. Árvore filogenética de máxima verossimilhança do gene COI das amostras de *Andiorrhinus* e todos os isolados do *Boldysystem* dos gêneros *Rhinodrilus* e *Andiorrhinus*.

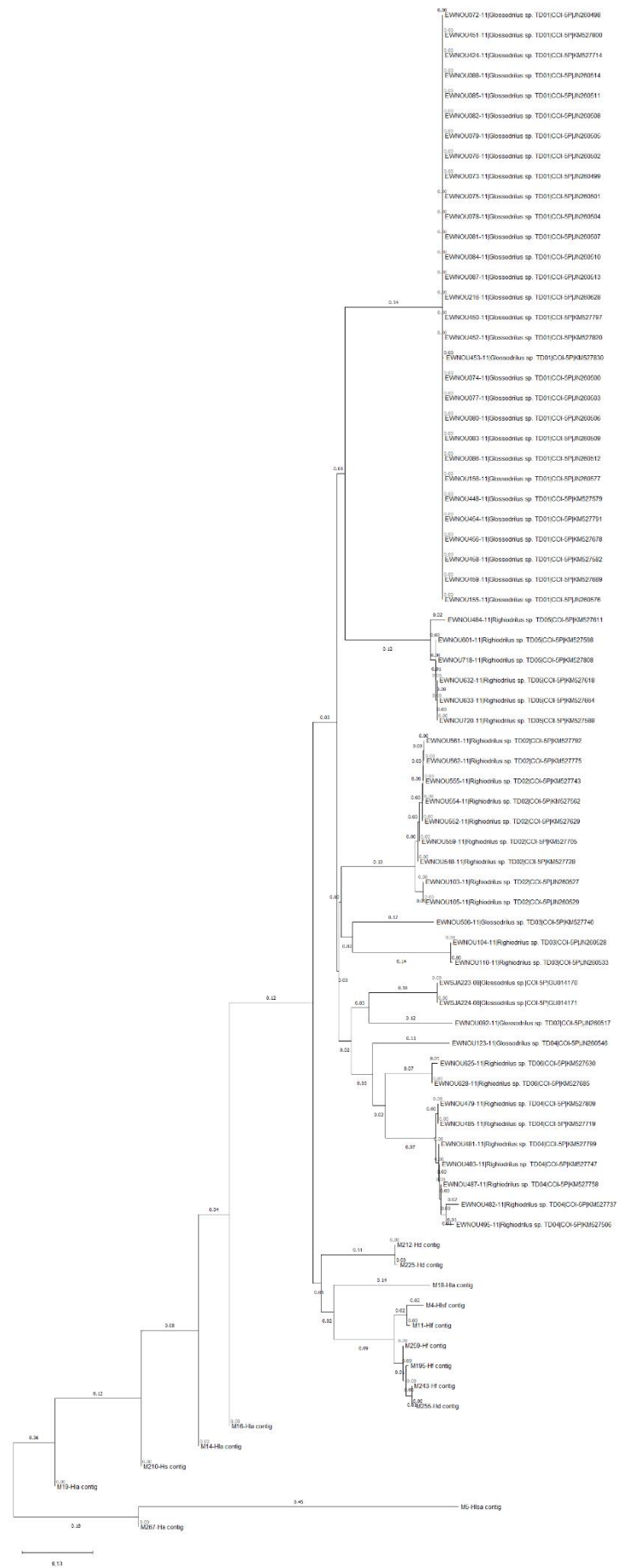


Figura 8. Árvore filogenética de máxima verossimilhança do gene COI das amostras de *Holoscolex* e todos os isolados do *Boldysystem* dos gêneros *Glossodrilus* e *Righiodrilus*.

4. CONCLUSÃO

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, tiflosole 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 sequências, mesmo com qualidade ruim, demostram 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.

- ARAUJO, 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 *Ocnerodrilus* (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. Strategies lombriciennes. Ecological Bulletins, v. 25, p. 122- 132., 1977.
- BOUCHÉ, M. B. Strategies 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. Strategies 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- Capitulo 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.; SZLÁVEZ, 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.
- Diaz, S., and M. Cabido. 2001. Vive la différence: 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*: *Crassiclitellata*) 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*: *Crassiclitellata*) 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.; GRÜNWALD, 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.; ŻELECHOWSKI, 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. Conspecificity 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 *Pontosclex 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 *Pontosclex 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 *Pontosclex 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 Agropecuaria 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 Agropecuaria 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 Agropecuaria Brasileira*, 2009a.
- ROUGERIE, R. et al. DNA barcodes for soil animal taxonomy. *Pesquisa Agropecuaria 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 ZOOLÓGICA 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 Řivnáč, 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.