

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO**

**DIVERSIDADE DE MINHOCAS E SUA RELAÇÃO COM
ECOSSISTEMAS NATURAIS E ALTERADOS NO
ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**

TESE DE DOUTORADO

Gerusa Pauli Kist Steffen

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

**DIVERSIDADE DE MINHOCAS E SUA RELAÇÃO COM
ECOSSISTEMAS NATURAIS E ALTERADOS NO ESTADO DO
RIO GRANDE DO SUL**

Gerusa Pauli Kist Steffen

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Área de Concentração em Biodinâmica e Manejo do solo, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciência do Solo.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Zaida Inês Antonioli

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo**

A Comissão Examinadora, abaixo-assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**DIVERSIDADE DE MINHOCAS E SUA RELAÇÃO COM
ECOSSISTEMAS NATURAIS E ALTERADOS NO ESTADO DO RIO
GRANDE DO SUL**

elaborada por
Gerusa Pauli Kist Steffen

como requisito para obtenção do grau de
Doutor em Ciência do Solo

COMISSÃO EXAMINADORA:

Zaida Inês Antonioli, Dr^a.
(Presidente/Orientadora)

Ana Cláudia Rodrigues de Lima, Dr^a. (UFPEl)

Marie Luise Carolina Bartz, Dr^a. (UDESC)

Andressa de Oliveira Silveira, Dr^a. (UFSM)

Rodrigo Ferreira da Silva, Dr. (UFSM-CESNORS)

Santa Maria, 22 de junho de 2012.

Aos meus pais, Gerônimo e Lúcia,
por todo amor, apoio, incentivo e
ensinamentos,

OFEREÇO

Ao meu esposo Ricardo, por todo
amor, dedicação, compreensão e
auxílio durante a realização deste
trabalho e ao nosso filho Nicolas,
alegria e razão de nossas vidas,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado, guiando meus passos e abençoando meu caminho.

Ao meu esposo Ricardo Bemfica Steffen, pelo seu amor, carinho, dedicação, companheirismo, compreensão e auxílio em todas as etapas desta jornada, pessoa maravilhosa que está sempre ao meu lado, apoiando e incentivando todos os meus passos. Ao nosso filho Nicolas, luz de nossas vidas, por nos proporcionar tanta alegria e ensinamentos nesta nova caminhada de pais. Amo muito vocês.

Aos meus pais Gerônimo Kist e Lúcia Maria Pauli Kist, por todo cuidado, amor, ensinamentos e oportunidades disponibilizadas a mim, mas principalmente, por sorrirem com minhas conquistas.

Às minhas irmãs Luana Carla Kist Poersch e Priscila Pauli Kist, por todos os anos de convivência, companheirismo e apoio para a realização deste trabalho.

Aos cunhados Flávio Schuh Poersch e Norton Franciscatto de Paula, pelo incentivo e aos sobrinhos Diogo e Douglas, “pequenos pesquisadores”, pela participação na coleta de minhocas.

A Bertilo Steffen, Nara Lúcia Steffen, Carolina Steffen e João Paulo Silveira Júnior, pessoas maravilhosas que sempre estiveram ao meu lado, apoiando e incentivando em todos os momentos. Um agradecimento especial à minha sogra Nara, por ter passado diversas tardes cuidando do Nicolas para que eu pudesse concluir este trabalho.

À professora Dr^a Zaida Inês Antonioli, pela orientação, amizade, confiança, compreensão e oportunidades durante todos os anos de realização deste trabalho.

Ao pesquisador Gustavo Schiedeck e ao professor Rodrigo Jacques, co-orientadores deste trabalho, pela amizade, orientação, disponibilidade e auxílio durante a realização deste estudo.

Às colegas e amigas do laboratório de Biologia do Solo e do Ambiente: Edicarla Trentin, Daiana Bortoluzzi, Andressa de Oliveira Silveira, Cristiane Loureiro e Manoeli Lupatini pelo grande auxílio nas análises moleculares. Aos amigos do laboratório: Antônio Carlos Bassaco, Daniel Pazzini, Marcos Leandro dos Santos, Natielo Santana,

Matheus Ponteli, Deisy Morales, Sabrina de Fátima Dahmer, Diogo Vendruscolo e Diego Amaro, pelo companheirismo, amizade e auxílio durante a realização deste trabalho.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, pelas horas de estudo, aprendizado, troca de idéias e descontração durante esta longa caminhada.

Ao Dr. George Gardner Brown (Embrapa Florestas, Colombo, Paraná), grande incentivador deste trabalho, pelas grandes oportunidades de aprendizado nos cursos e eventos ligados à taxonomia de minhocas. Aos taxonomistas de oligoquetas, Doutores Samuel Wooster James (University of Iowa, Estados Unidos) e Alexander Feijoo Martínez (Universidad Tecnológica de Pereira, Colômbia), pelos imensuráveis ensinamentos durante os cursos de taxonomia. À professora Dr^a Maria Raquel Santos Carvalho (Universidade Federal de Minas Gerais), pela atenção, amizade e ensinamentos na área de genética molecular de minhocas.

À Dr^a Marie Luise Carolina Bartz, pela amizade, incentivo e contribuições durante a realização deste trabalho. Obrigado pelo auxílio na identificação das minhocas e pela descrição das novas espécies coletadas neste trabalho.

A todos os amigos participantes dos cursos e encontros de taxonomia e ecologia de minhocas em Curitiba, principalmente às pesquisadoras Marie Luise Carolina Bartz, Greice Schiavon, Ana Cláudia Rodrigues Lima e Catarina Praxedes, pela parceria, incentivo, amizade e maravilhoso convívio durante os longos dias de cursos.

Um agradecimento especial à família de Aloísio Steffen, pela parceria, apoio e envolvimento neste trabalho, permitindo a “caça às minhocas” em sua propriedade em Santo Cristo.

A todas as pessoas que auxiliaram nas coletas de minhocas, seja pela disponibilização de áreas de sua propriedade, participação ou apoio para realização desta pesquisa.

Aos membros da comissão examinadora deste trabalho, pela leitura atenta, sugestões e contribuições realizadas.

Aos funcionários Flávio Vieira da Silva, Héverton Heinz, Carlos Vargas e Roseni dos Santos, pelo apoio e amizade.

À Universidade Federal de Santa Maria, ao Departamento de Solos e ao Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo pela oportunidade e pelo apoio durante o desenvolvimento da minha tese de doutorado.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A todos os familiares e amigos que torceram por esta conquista.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”
(Albert Einstein)

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo
Universidade Federal de Santa Maria

DIVERSIDADE DE MINHOCAS E SUA RELAÇÃO COM ECOSISTEMAS NATURAIS E ALTERADOS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

AUTORA: GERUSA PAULI KIST STEFFEN

ORIENTADORA: ZAIDA INÊS ANTONIOLLI

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 22 de junho de 2012.

O conhecimento sobre a diversidade de minhocas no Estado do Rio Grande do Sul (RS), assim como no Brasil, está muito aquém da diversidade estimada pelos taxonomistas. O trabalho teve como objetivos: 1) avaliar a diversidade de minhocas em ecossistemas de três regiões do Estado do RS; 2) caracterizar propriedades físicas e químicas do solo, tipo de vegetação e uso da terra; e 3) determinar o potencial de uso de uma solução atóxica para extração de minhocas do solo, como forma de reduzir os impactos ambientais sobre os ecossistemas avaliados. Realizou-se levantamento qualitativo de minhocas, através da retirada de monólitos e triagem manual, em 15 diferentes ecossistemas. As coletas foram realizadas em 29 municípios das regiões noroeste, central e sudoeste do Estado do RS, totalizando 77 locais amostrados. A identificação das espécies foi realizada com base em parâmetros morfológicos e/ou moleculares. Vinte e uma espécies de minhocas foram encontradas, pertencentes às famílias Glossoscolecidae (10), Ocnerodrilidae (4), Megascolecidae (4), Acanthodrilidae (1), Lumbricidae (1) e Criodrilidae (1). Destas, dez corresponderam a novos registros, pertencentes aos gêneros *Glossoscolex* (6), *Fimoscolex* (1), *Kerriana* (1), *Eukerria* (1) e uma nova espécie da família Criodrilidae. A ocorrência das espécies de minhocas apresentou relação com o tipo de ecossistema avaliado, sendo observada maior diversidade em áreas de fragmento de mata nativa e campo nativo. A maioria das espécies nativas (*Urobenus brasiliensis*, *Fimoscolex* n. sp. 1 e *Glossoscolex* sp.) predominou em ecossistemas pouco alterados pelo homem, enquanto que as espécies exóticas (*Amyntas gracilis*, *Amyntas rodericensis*, *Metaphire californica*, *Aporrectodea trapezoides*) e peregrina (*Pontoscolex corethrurus*) predominam em áreas com maior grau de antropização. O grau de perturbação dos ecossistemas e o uso do solo interferem na presença de minhocas, seguido pelas características físicas e químicas do solo. O gene nuclear 28S rDNA, assim como os genes mitocondriais 16S e subunidade I da citocromo c oxidase foram ferramentas importantes para caracterização molecular das minhocas. As avaliações do potencial do extrato de cebola como solução extratora de minhocas do solo demonstraram que a concentração de 175 g L⁻¹ de extrato apresenta capacidade semelhante à solução extratora padrão (formaldeído 0,5%) na extração de minhocas em solos de textura argilosa e arenosa. Os resultados obtidos neste trabalho evidenciaram que o Estado do Rio Grande do Sul apresenta diversidade de minhocas superior à conhecida atualmente, justificando a importância de estudos da diversidade de organismos do solo em ecossistemas.

Palavras-chave: Oligoquetas. Diversidade. Taxonomia. Biologia molecular. Método de extração.

ABSTRACT

Doctor Science Thesis
Graduate Program in Soil Science
Federal University of Santa Maria

DIVERSITY OF EARTHWORMS AND ITS RELATION TO NATURAL AND ALTERED ECOSYSTEMS IN THE STATE OF RIO GRANDE DO SUL

AUTHOR: GERUSA PAULI KIST STEFFEN

ADVISER: ZAIDA INÊS ANTONIOLLI

Date and Local: Santa Maria, June 2012

Knowledge on earthworms diversity in Rio Grande do Sul (RS) State, as well as in Brazil, is lower than the range estimated by taxonomists. The study aimed to: 1) evaluate the diversity of earthworms present in ecosystems of three regions of the RS State; 2) characterize the physical and chemical properties of soil, vegetation and land use; and 3) determine the potential use of a nontoxic solution to extract earthworms from the soil, in order to reduce the environmental impacts on ecosystems assessed. A qualitative survey of earthworms was conducted by the withdrawal of monoliths and manual screening in 15 different ecosystems. Samples were collected in 29 municipalities of the northwestern, central and southwestern regions of the RS State, comprising 77 sampling sites. Species identification was based on morphological parameters and / or molecular. Twenty-one species of earthworms were found, belonging to the families Glossoscolecidae (10), Ocnerodrilidae (4), Megascolecidae (4), Acanthodrilidae (1), Lumbricidae (1) and Criodrilidae (1). Ten correspond to new records, belonging to the genus *Glossoscolex* (6), *Fimoscolex* (1), *Kerriona* (1), *Eukerria* (1) and a new specie of the Criodrilidae family. The occurrence of earthworms species was correlated with the type of ecosystem. The highest diversity was observed in sites of native forest fragment and native grassland. Most native species (*Urobenus brasiliensis*, *Fimoscolex* n. sp. and *Glossoscolex* sp.) predominated in ecosystems altered by human activities, while the exotic species (*Amyntas gracilis*, *Amyntas rodericensis*, *Metaphire californica*, *Aporrectodea trapezoides*) and pilgrim (*Pontoscolex corethrurus*) predominate in sites with highest degree of human disturbance. The degree of disturbance of ecosystems and land use influence the presence of earthworms, followed by physical and chemical characteristics of soil. The nuclear gene 28S rDNA, as well as mitochondrial genes 16S and subunit I of cytochrome c oxidase were important tools for the molecular characterization of earthworms. Assessments of the potential of onion extract as the extraction solution for soil earthworms showed that the concentration of 175 g L⁻¹ extract shows capacity comparable to standard extraction solution (formaldehyde 0.5%) in the extraction of earthworms in clay and sandy soils. The results of this study indicated that the Rio Grande do Sul State has greater earthworms diversity than the currently known, justifying the importance of studies of the diversity of these soil organisms.

Keywords: Oligochaetes. Diversity. Taxonomy. Molecular biology. Extraction method.

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 2.1 – Famílias de oligoquetas e suas regiões de origem..... | 30 |
| Tabela 2.2 – Lista de famílias, gêneros e espécies de minhocas exóticas (EX), invasoras (IN), potencialmente invasoras (PI), nativas peregrinas (NP) ou nativas (N) encontradas no Estado do Rio Grande do Sul e sua distribuição..... | 35 |
| Tabela 2.3 – Categorias ecológicas, habitat, alimentação e características morfológicas das minhocas..... | 42 |
| Tabela 3.1 – Diversidade de minhocas exóticas (EX), invasoras (IN), nativas peregrinas (NP) ou nativas (N) em ecossistemas de diferentes municípios do Rio Grande do Sul..... | 75 |
| Tabela 3.2 – Riqueza de espécies (S) e índice de McIntosh (U) para os diferentes ecossistemas amostrados no Rio Grande do Sul..... | 89 |
| Tabela 4.1 – Ocorrência de minhocas em ecossistemas do Rio Grande do Sul.. | 111 |
| Tabela 4.2 – Frequência de ocorrência das espécies de minhocas em solos com diferentes valores de pH e conteúdos de matéria orgânica..... | 114 |
| Tabela 4.3 – Frequência de ocorrência das espécies de minhocas em solos com diferentes teores de fósforo e potássio..... | 115 |
| Tabela 4.4 – Frequência de ocorrência das espécies de minhocas em solos com diferentes teores de cálcio e magnésio..... | 116 |
| Tabela 4.5 – Frequência de ocorrência das espécies de minhocas em solos com diferentes valores de $CTC_{pH7,0}$ e $CTC_{efetiva}$ | 117 |
| Tabela 5.1 – Caracterização dos locais onde foram coletadas as espécies de minhocas..... | 137 |
| Tabela 5.2 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do DNA das minhocas..... | 139 |
| Tabela 5.3 – Relação de espécies e sequências obtidas nos bancos de dados <i>GenBank</i> e Global Mirror System of DNA Barcode Data para a construção de dendrogramas filogenéticos para os genes mtDNA COI, mtDNA 16S e rDNA 28S, com os respectivos números de acesso..... | 141 |
| Tabela 5.4 – Código de depósito no Global Mirror System of DNA Barcode Data (GMS-DBD) de sequências obtidas da região do gene mitocondrial da subunidade I da citocromo c oxidase (COI) de minhocas coletadas no Rio Grande do Sul..... | 148 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 6.1 – Comparison of characters of the new species (in bold) <i>Glossoscolex (Glossoscolex)</i> , the type species for each genus and subgenus and the species compared in the remarks. Genus, subgenus and species in bold are the new species described..... | 172 |
| Tabela 6.2 – Soil chemical and textural attributes from some areas where the new species of genus <i>Glossoscolex</i> occur..... | 173 |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1.1 – Sequência da realização do trabalho sobre a diversidade de minhocas no Estado do Rio Grande do Sul e sua relação com ecossistemas naturais e alterados..... | 23 |
| Figura 2.1 – Efeitos da invasão de espécies exóticas sobre espécies nativas em ecossistemas naturais e alterados..... | 33 |
| Figura 2.2 – Bioporo formado pela espécie <i>Amyntas gracilis</i> em solo arenoso (A) e coprólitos de uma espécie endogéica depositados na superfície de um campo nativo (B)..... | 45 |
| Figura 2.3 – Vantagens e desvantagens de alguns métodos de extração de minhocas do solo..... | 52 |
| Figura 3.1 – Localização dos municípios gaúchos onde foram realizadas amostragens qualitativas da ocorrência de minhocas em diferentes ecossistemas..... | 71 |
| Figura 3.2 – Representação gráfica da análise de componentes principais (PCA) relacionando as dimensões 1 e 2 referentes à amostragem de minhocas em diferentes ecossistemas do Rio Grande do Sul. (A) <i>Glossoscolex</i> sp., (B) <i>Glossoscolex</i> n. sp. 1, (C) <i>Glossoscolex</i> n. sp. 2, (D) <i>Glossoscolex</i> n. sp. 3, (E) <i>Glossoscolex</i> n. sp. 4, (F) <i>Glossoscolex</i> n. sp. 5, (G) <i>Glossoscolex</i> n. sp. 6, (H) <i>Glossoscolex uruguayensis</i> , (I) <i>Pontoscolex corethrurus</i> , (J) <i>Urobenus brasiliensis</i> , (K) Juvenis de Glossoscolecidae, (L) <i>Aporrectodea trapezoides</i> , (M) <i>Amyntas gracilis</i> , (N) <i>Amyntas corticis</i> , (O) <i>Metaphire californica</i> , (P) <i>Eukerria saltensis</i> , (Q) <i>Eukerria</i> n. sp. 1, (R) <i>Kerriona</i> n. sp. 1, (S) <i>Ocnerodrilus</i> sp, (T) Nova espécie de Criodrilidae..... | 80 |
| Figura 3.3 – Exemplar de <i>Urobenus brasiliensis</i> coletado em Santo Cristo, RS..... | 82 |
| Figura 3.4 – Nova espécie da Família Criodrilidae coletada no município de Santo Cristo, RS (A); detalhe da parte ventral da minhoca na região clitelar (B); exemplar após armazenamento em etanol 70% (C) e em formol 6% (D); locais alagados onde foram coletados exemplares desta espécie de minhoca aquática (E e F)..... | 87 |
| Figura 3.5 – Nova espécie de <i>Eukerria</i> sp. coletada em três diferentes ecossistemas do RS (A) e exemplar do gênero <i>Ocnerodrilus</i> coletado em pastagem cultivada no município de Santa Maria, RS (B)..... | 88 |

| | | |
|--------------|--|-----|
| Figura 4.1 – | Diversidade de minhocas de acordo com a classe textural do solo onde foram coletadas..... | 112 |
| Figura 5.1 – | Dendrograma filogenético baseado no algoritmo <i>Neighbor-joining</i> da região do gene mitocondrial subunidade I da citocromo c oxidase (COI) de espécies de minhocas coletadas no Estado do Rio Grande do Sul e de sequências de minhocas obtidas a partir do banco de dados <i>GenBank</i> e no Global Mirror System of DNA Barcode Data. O número acima ou abaixo das ramificações representa o valor de <i>bootstrap</i> com base em 1000 repetições. A espécie <i>Ctenocardia fornicata</i> e as espécies do gênero <i>Hirudo</i> foram inseridas como <i>outgroup</i> | 143 |
| Figura 5.2 – | Dendrograma filogenético baseado no algoritmo <i>Neighbor-joining</i> da região da subunidade 16S do mtDNA de espécies de minhocas coletadas no Estado do Rio Grande do Sul e de sequências de minhocas obtidas a partir do banco de dados <i>GenBank</i> . O número acima ou abaixo das ramificações representa o valor de <i>bootstrap</i> com base em 1000 repetições. As espécies do gênero <i>Enchytraeus</i> foram inseridas como <i>outgroup</i> | 145 |
| Figura 5.3 – | Dendrograma filogenético baseado no algoritmo <i>Neighbor-joining</i> da região da subunidade 28S do rDNA de espécies de minhocas coletadas no Estado do Rio Grande do Sul e de sequências de minhocas obtidas a partir do banco de dados <i>GenBank</i> . O número acima ou abaixo das ramificações representa o valor de <i>bootstrap</i> com base em 1000 repetições. As espécies do gênero <i>Hirudo</i> foram inseridas como <i>outgroup</i> ... | 146 |
| Figura 6.1 – | New species of <i>Glossoscolex</i> . a,b. <i>Glossoscolex (Glossoscolex) knapperae</i> n. sp. c,d. <i>Glossoscolex (Glossoscolex) pastivus</i> n. sp. e,f. <i>Glossoscolex (Glossoscolex) pampas</i> n. sp. FM = female pores; MP = male pores..... | 161 |
| Figura 6.2 – | New species of <i>Glossoscolex</i> . a,b. <i>Glossoscolex (Glossoscolex) riograndensis</i> n. sp. c,d. <i>Glossoscolex (Glossoscolex) nativus</i> n. sp. e,f. <i>Glossoscolex (Glossoscolex) parvus</i> n. sp. FM = female pores; MP = male pores..... | 167 |
| Figura 7.1 – | Locais onde foram conduzidos os experimentos. (A) Pomar de citros, município de Santa Maria, RS e (B) Lavoura de milho, município de Santo Cristo, RS e (B)..... | 179 |
| Figura 7.2 – | Anel metálico utilizado na extração de minhocas do solo..... | 181 |

| | | |
|--------------|---|-----|
| Figura 7.3 – | Número de minhocas adultas e jovens (ind. m ⁻²) extraídas de solo com textura argilosa pelo uso de formaldeído 0,5% e de soluções contendo extrato de cebola nas concentrações de 25, 75, 125 e 175 g de cebola por litro de solução. Média de seis repetições..... | 184 |
| Figura 7.4 – | Número total (ind. m ⁻²) e biomassa fresca (g m ⁻²) de minhocas extraídas de solo com textura argilosa pelo uso de formaldeído 0,5% e de soluções contendo extrato de cebola nas concentrações de 25, 75, 125 e 175 g de cebola por litro de solução. Média de seis repetições..... | 185 |
| Figura 7.5 – | Minhocas adultas (ind. m ⁻²) e correlação entre o número de minhocas adultas extraídas de solo arenoso pelo uso de formaldeído 0,5% e solução contendo extrato de cebola na concentração 175g de cebola por litro de solução. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Média de seis repetições..... | 186 |
| Figura 7.6 – | Número total (ind. m ⁻²) e correlação entre o número total de minhocas extraídas de solo arenoso pelo uso de formaldeído 0,5% e solução contendo extrato de cebola na concentração 175g de cebola por litro de solução. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Média de seis repetições..... | 187 |
| Figura 7.7 – | Biomassa fresca de minhocas (g m ⁻²) e correlação entre a biomassa fresca de minhocas extraídas de solo arenoso pelo uso de formaldeído 0,5% e solução contendo extrato de cebola na concentração 175g de cebola por litro de solução. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Média de seis repetições..... | 188 |

LISTA DE REDUÇÕES

| | |
|-------|--|
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool |
| BSA | Albumina Sérica Bovina |
| cm | Centímetro(s) |
| COI | Citocromo c oxidase subunidade I |
| COII | Citocromo c oxidase subunidade II |
| CTC | Capacidade de troca de cátions em pH 7,0 |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| mtDNA | DNA mitocondrial |
| rDNA | DNA ribossomal |
| DNTP | Trifosfato de desoxinucleotídeo |
| Ds | Densidade do substrato em Kg m ⁻³ |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetracético |
| g | Gramas(s) |
| Kg | Quilograma(s) |
| L | Litro(s) |
| m | Metro(s) |
| mg | Miligrama(s) |
| mL | Mililitro(s) |
| mm | Milímetro(s) |
| n° | Número |
| NADH | Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo |
| NCBI | National Center for Biotechnology |
| pb | Pares de bases |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| pH | Potencial hidrogeniônico em água |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| rRNA | RNA ribossômico |
| SDS | Duodecil sulfato de sódio |
| Taq | <i>Thermophilus aquaticus</i> |
| TE | Tampão Tris-EDTA |
| °C | Grau(s) Celsius |
| µL | Microlitro(s) |
| % | Porcentagem |

LISTA DE APÊNDICES

- Apêndice A – Tabela contendo informações sobre a localização, o tipo de ecossistema, o valor de pH e as espécies de minhocas encontradas nos pontos amostrados no Estado do Rio Grande do Sul (Capítulos 1 e 2)..... 196
- Apêndice B – Tabela contendo informações sobre os percentuais de matéria orgânica (MO) e argila, textura, teores de fósforo (Mehlich), potássio, cálcio e magnésio, soma de bases, $CTC_{efetiva}$ e $CTC_{pH7,0}$ dos pontos amostrados no Estado do Rio Grande do Sul (Capítulos 1 e 2)..... 200
- Apêndice C – Sequências de nucleotídeos da região do gene mtDNA da subunidade I da citocromo c oxidase (COI) de novas espécies de minhocas coletadas no Estado do Rio Grande do Sul (Capítulo 3). 204

LISTA DE ANEXOS

| | |
|--|-----|
| Anexo A – Médias de temperatura mínima e máxima para o Estado do Rio Grande do Sul..... | 206 |
| Anexo B – Temperatura média anual e precipitação pluviométrica média para o Estado do Rio Grande do Sul..... | 207 |
| Anexo C – Médias de umidade relativa do ar e radiação solar anual para o Estado do Rio Grande do Sul..... | 208 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| 1 INTRODUÇÃO | 22 |
| 1.1 Referências bibliográficas | 25 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 27 |
| 2.1 Minhocas | 27 |
| 2.2 Diversidade de minhocas | 28 |
| 2.3 Categorias ecológicas | 41 |
| 2.4 Importância das minhocas para o solo | 44 |
| 2.5 Métodos de extração de minhocas do solo | 50 |
| 2.6 Caracterização e identificação de espécies | 53 |
| 2.7 Referências bibliográficas | 56 |
| 3 CAPÍTULO I – Levantamento da diversidade de minhocas em três regiões do Estado do Rio Grande do Sul | 68 |
| 3.1 Resumo | 69 |
| 3.2 Introdução | 69 |
| 3.3 Material e métodos | 71 |
| 3.3.1 Locais amostrados | 71 |
| 3.3.2 Coleta dos indivíduos | 72 |
| 3.3.3 Análise dos dados | 73 |
| 3.4 Resultados e discussão | 74 |
| 3.5 Conclusões | 93 |
| 3.6 Referências bibliográficas | 94 |
| 4 CAPÍTULO II – Comunidade de minhocas em ecossistemas no Rio Grande do Sul: caracterização ecológica e edáfica dos ambientes | 101 |
| 4.1 Resumo | 101 |
| 4.2 Introdução | 102 |
| 4.3 Material e métodos | 105 |
| 4.3.1 Locais amostrados | 105 |
| 4.3.2 Coleta dos indivíduos | 105 |
| 4.3.3 Caracterização dos solos e da vegetação das regiões amostradas | 106 |
| 4.3.4 Caracterização das condições climáticas das regiões amostradas | 108 |
| 4.4 Resultados e discussão | 110 |
| 4.5 Conclusões | 124 |
| 4.6 Referências bibliográficas | 125 |

| | |
|---|-----|
| 5 CAPÍTULO III – Identificação de minhocas utilizando genes do DNA mitocondrial (COI e 16S mtDNA) e nuclear (28S rDNA) | 133 |
| 5.1 Resumo | 133 |
| 5.2 Introdução | 134 |
| 5.3 Material e métodos | 137 |
| 5.3.1 Obtenção das espécies de minhocas | 137 |
| 5.3.2 Extração do DNA | 138 |
| 5.3.3 Amplificação de fragmentos por Reação da Cadeia de Polimerase | 139 |
| 5.3.4 Purificação, sequenciamento e análise das sequências de DNA | 140 |
| 5.4 Resultados e discussão | 142 |
| 5.5 Conclusões | 150 |
| 5.6 Referências bibliográficas | 151 |
| | |
| 6 CAPÍTULO IV – New species of <i>Glossoscolex</i> (Clitellata: Glossoscolecidae) from Rio Grande do Sul, Brazil | 155 |
| 6.1 Abstract | 155 |
| 6.2 Resumo | 155 |
| 6.3 Introduction | 156 |
| 6.4 Material and methods | 157 |
| 6.5 Descriptions | 158 |
| 6.5.1 Glossoscolecidae (MICHAELSEN, 1900) | 158 |
| 6.5.1.1 Genus <i>Glossoscolex</i> (LEUCKART, 1835) in Froriep (1835) | 158 |
| 6.5.1.1.1 Subgenus <i>Glossoscolex</i> (LEUCKART, 1835) in Froriep (1835) | 158 |
| 6.5.1.1.1.1 <i>Glossoscolex (Glossoscolex) knapperae</i> n. sp. Bartz & James | 158 |
| 6.5.1.1.1.2 <i>Glossoscolex (Glossoscolex) pastivus</i> n. sp. Bartz & James | 160 |
| 6.5.1.1.1.3 <i>Glossoscolex (Glossoscolex) pampas</i> n. sp. Bartz & James | 163 |
| 6.5.1.1.1.4 <i>Glossoscolex (Glossoscolex) riograndensis</i> n. sp. Bartz & James | 165 |
| 6.5.1.1.1.5 <i>Glossoscolex (Glossoscolex) nativus</i> n. sp. Bartz & James | 168 |
| 6.5.1.1.1.6 <i>Glossoscolex (Glossoscolex) parvus</i> n. sp. Bartz & James | 169 |
| 6.6 Conclusions | 174 |
| 6.7 References | 175 |
| | |
| 7 CAPÍTULO V – Extração de minhocas do solo com solução atóxica alternativa ao formaldeído | 177 |
| 7.1 Resumo | 177 |
| 7.2 Introdução | 178 |
| 7.3 Material e métodos | 179 |
| 7.4 Resultados e discussão | 183 |

| | |
|---|-----|
| 7.5 Conclusões | 190 |
| 7.6 Referências bibliográficas | 191 |
| 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS | 193 |
| APÊNDICES | 195 |
| Apêndice A – Tabela contendo informações sobre a localização, o tipo de ecossistema, o valor de pH e as espécies de minhocas encontradas nos pontos amostrados no Estado do Rio Grande do Sul | 196 |
| Apêndice B – Tabela contendo informações sobre os percentuais de matéria orgânica (MO) e argila, textura, teores de fósforo (Mehlich), potássio, cálcio e magnésio, soma de bases, CTC _{efetiva} e CTC _{pH7,0} dos pontos amostrados no Estado do Rio Grande do Sul | 200 |
| Apêndice C - Sequências de nucleotídeos da região do gene mtDNA da subunidade I da citocromo c oxidase (COI) de novas espécies de minhocas coletadas no Estado do Rio Grande do Sul | 204 |
| ANEXOS | 205 |
| Anexo A - Médias de temperatura mínima e máxima para o Estado do Rio Grande do Sul | 206 |
| Anexo B - Temperatura média anual e precipitação pluviométrica média para o Estado do Rio Grande do Sul | 207 |
| Anexo C - Médias de umidade relativa do ar e radiação solar anual para o Estado do Rio Grande do Sul | 208 |

1 INTRODUÇÃO

Em todo o mundo, esforços e recursos têm sido direcionados para a realização de avaliações da diversidade de oligoquetas. Devido à vasta extensão territorial e ao clima favorável à ocorrência de minhocas, acredita-se que o Brasil seja um dos países com maior diversidade destes organismos. No entanto, poucas regiões do Brasil foram avaliadas quanto à ocorrência de minhocas, além de, no momento, não haver um taxonomista de oligoquetas efetivo no país (BROWN; JAMES, 2007). Desta forma, é fundamental que haja continuidade nas pesquisas sobre a diversidade de minhocas em ecossistemas, antes que esta seja comprometida por alterações antrópicas.

Estudos sobre a ocorrência de espécies de minhocas no Estado do Rio Grande do Sul foram realizados por pesquisadores ainda nas décadas de 1960 e 1970 (KNÄPPER, 1972a, 1972b, 1976, 1977, 1979; KNÄPPER; HAUSER, 1969; KNÄPPER; PORTO, 1979) e mais recentemente, no sul do Estado (LIMA; RODRIGUEZ, 2007; SCHIAVON et al., 2009), inclusive com a descoberta de uma nova espécie da família Criodrilidae (LIMA; RODRIGUEZ, 2007). No entanto, os locais amostrados nestes estudos concentraram-se em algumas regiões do estado, e ainda existem diversas áreas e regiões que não foram estudadas.

Neste sentido, estudos relacionados à ocorrência e diversidade de minhocas no Rio Grande do Sul são de extrema importância taxonômica, econômica e ecológica, por possibilitarem a descoberta de espécies novas e contribuir para a ampliação do conhecimento sobre a diversidade brasileira de minhocas. Além disso, possibilitam relacionar a ocorrência de espécies de minhocas presentes em um determinado ecossistema com características e propriedades físicas e químicas do solo, tipo de vegetação e uso da terra.

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de caracterizar e relacionar a diversidade de espécies de minhocas ocorrentes em ecossistemas do Estado do Rio Grande do Sul com características e propriedades físicas e químicas do solo, tipo de vegetação e uso da terra. Objetivou-se também validar o uso de uma solução atóxica

para extração de minhocas do solo, como forma de reduzir os impactos ambientais sobre os ecossistemas avaliados (Figura 1.1).

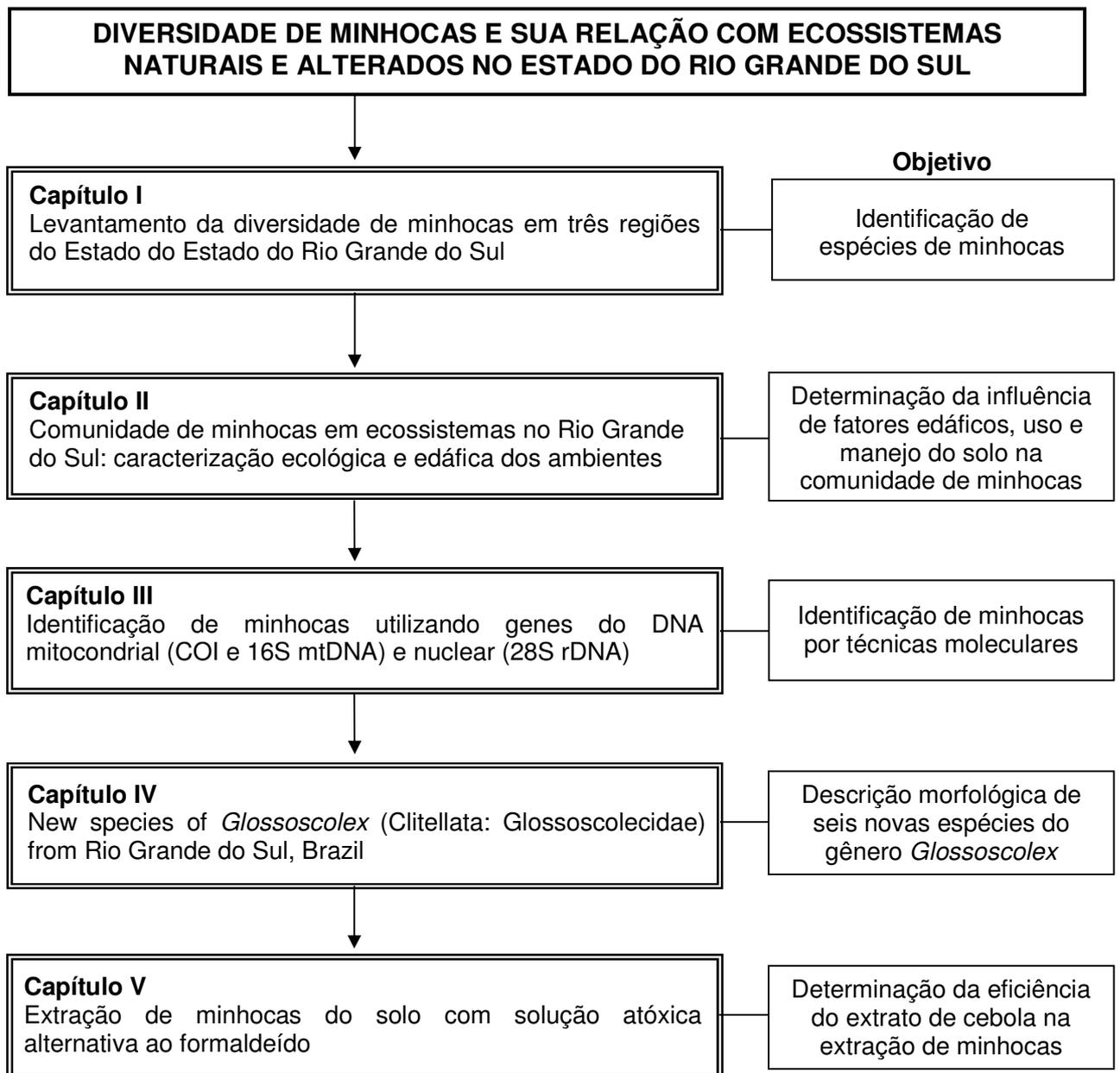


Figura 1.1 - Sequência da realização do trabalho sobre a diversidade de minhocas no Estado do Rio Grande do Sul e sua relação com ecossistemas naturais e alterados.

As hipóteses do trabalho foram:

- a) O Estado do Rio Grande do Sul apresenta diversidade de espécies de minhocas superior à conhecida atualmente;
- b) A ocorrência de espécies de minhocas nativas, exóticas e peregrinas em ecossistemas é influenciada pelo uso, manejo e pelas características físicas e químicas do solo;
- c) A solução à base de extrato de cebola é eficiente para extração de minhocas do solo.

1.1 Referências bibliográficas

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.

KNÄPPER, C. F. U. Dominanzverhältnisse der verschiedenen arten der gattung Pheretima in kulturböden von Rio Grande do Sul. **Pedobiologia**, Berlin, v. 12, p. 23-25, 1972a.

KNÄPPER, C. F. U. Oligoquetas terrestres - uma moderna avaliação. **Publicação do Instituto André Voisin**, Porto Alegre, n. 1, p.11-19, 1972b.

KNÄPPER, C. F. U. Preliminar considerations on the occurrence of Oligochaetes in the Estuary of the Guaíba RS. **Estudos Leopoldenses**, São Leopoldo, v. 38, p. 39-41, 1976.

KNÄPPER, C. F. U. Ecological niches of *P. diffringens* (Baird, 1869) and *E. lucens* (Waga, 1857) at São Francisco de Paula. **Estudos Leopoldenses**, São Leopoldo, v. 42, p.194-196, 1977.

KNÄPPER, C. F. U. Velhos habitats de *P. corethrurus* (Fr. Müller, 1857). **Estudos Leopoldenses**, São Leopoldo, v.16, p. 39-50, 1979.

KNÄPPER, C. F. U.; HAUSER, J. Eine anomalie bei "*Allolobophora caliginosa*" (Savigny, 1826) (Oligochaeta). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 29, v. 411-412, 1969.

KNÄPPER, C. F. U.; PORTO, R. P. Ocorrência de Oligoquetas nos solos do Rio Grande do Sul. **Acta Biologica Leopoldensia**, São Leopoldo, v.1, p.137-166, 1979.

LIMA, A. C. R. de; RODRÍGUEZ, C. Earthworm diversity from Rio Grande do Sul, Brazil, with a new native Criodrilid genus and species (Oligochaeta: Criodrilidae). **Megadrilologica**, Canadá, v. 11, n. 2, p. 9-18, 2007.

SCHIAVON, G. de A. et al. **Biodiversidade de Minhocas do Solo na Estação Experimental Cascata, Embrapa Clima Temperado**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Minhocas

As minhocas são importantes organismos do solo, que pertencem ao Domínio Eukarya, Reino Animalia, Filo Annelida, Classe Clitellata, Subclasse Oligochaeta (RUPPERT, 2005; MADIGAN et al., 2010). Apresentam corpo alongado e segmentado em forma de anéis, o que originou o nome do Filo (RUPPERT, 2005). Em muitos idiomas, o termo que designa minhoca está relacionado ao seu ambiente natural, o solo, e à sua semelhança com os vermes¹ (SCHIEDECK et al., 2010). A grande maioria destes organismos essencialmente edáficos habita as camadas superficiais, geralmente até profundidades de 30 a 50 cm no perfil do solo (BROWN; JAMES, 2007), onde desempenham importantes funções ecológicas e ambientais. Segundo Hendrix e Bohlen (2002), as minhocas são os organismos mais conhecidos e, muitas vezes, os mais importantes que influenciam o funcionamento do sistema solo.

Devido à intensa movimentação de solo que promovem no sistema edáfico, as minhocas, juntamente com cupins, besouros e formigas, foram denominadas “engenheiros do ecossistema” (LAVELLE, 1988; JOUQUET et al., 2006; BROWN; DOMÍNGUEZ, 2010). Os horizontes orgânicos e organo-minerais do solo são repletos de excrementos da meso e da macrofauna², o que demonstra a importância destes

¹ Por exemplo, em inglês, minhoca é “earthworm” (verme da terra), em francês é “ver de terre” (verme da terra), em espanhol é “lombriz de tierra” (lombriga da terra), em italiano é “lombrico” (lombriga) e em alemão é “regenwurm” (verme das chuvas). No entanto, ao contrário das principais línguas ocidentais, a língua portuguesa, aparentemente, não vincula o nome genérico atribuído aos representantes da Classe Oligochaeta à morfologia vermiforme ou ao solo, sendo a real origem da palavra minhoca considerada controversa (SCHIEDECK et al., 2010).

² De acordo com o tamanho que apresentam, os organismos que vivem no solo são classificados em microfauna (menores do que 0,2 mm), mesofauna (entre 0,2 e 2,0 mm) e macrofauna (maiores do que 2,0 mm) (SWIFT et al., 1979). A microfauna edáfica compreende os invertebrados aquáticos que vivem no filme de água do solo, como protozoários e nematóides, enquanto que a mesofauna é representada por um grupo diverso de organismos, tais como ácaros, colêmbolos e enquitreídeos (LAVELLE, 1997). A macrofauna do solo é composta por minhocas, cupins, coleópteros e diplópodos, organismos que possuem habilidade para cavar e criar estruturas específicas que permitem a sua movimentação e

organismos na transformação e movimentação de materiais orgânicos no solo (DAVIDSON; GRIEVE, 2006).

Acredita-se que as minhocas tenham surgido na Terra há 570 milhões de anos, no período Edicariano (Era Paleozóica), estando entre os primeiros organismos a surgir no planeta (BOUCHÉ, 1983). Do oceano migraram para a crosta terrestre, há aproximadamente, 225 milhões de anos, adaptando-se à vida no solo (BROWN; JAMES, 2007). Após um longo período de adaptação e diversificação, as minhocas migraram para as mais distintas regiões do planeta, sendo atualmente encontradas em praticamente todos habitats terrestres, com exceção dos glaciais, desertos, solos muito ácidos ou salgados (LEE, 1985; REYNOLDS; WETZEL, 2007). No entanto, existem muitas regiões da crosta terrestre que ainda não foram avaliadas quanto à diversidade de minhocas.

2.2 Diversidade de minhocas

A diversidade ecológica pode ser definida como a variedade de espécies existente em uma comunidade de organismos de uma região, sendo reflexo das complexas interações que ocorrem no ecossistema (ODUM, 2004; ARAUJO, 2007). Segundo Odum (2004), o conceito de diversidade de espécies possui dois componentes: (1) **riqueza**, também chamada de densidade de espécies, baseada no número total de espécies presentes, e (2) **uniformidade**, baseada na abundância relativa de espécies e no grau de sua dominância ou falta desta. Para Araujo (2007), a diversidade de um determinado local apresenta três componentes principais: os genes, as espécies e os ecossistemas.

No mundo, são conhecidas em torno de 8.800 espécies de minhocas, embora seja estimada uma diversidade superior (REYNOLDS; WETZEL, 2007). Existem registros da presença de, aproximadamente, 310 espécies/subespécies de minhocas

sobrevivência no solo, tais como ninhos, galerias, montículos e câmaras, além da deposição de excrementos resultantes da sua atividade alimentar (STORK; EGGLETON, 1992).

catalogadas no Brasil. No entanto, inúmeras novas espécies foram coletadas em território brasileiro nos últimos anos, as quais encontram-se em coleções institucionais aguardando para serem descritas.

Estima-se a existência de mais de 1.400 espécies ainda desconhecidas no Brasil, devido à enorme extensão territorial, ao reduzido número de locais amostrados e também pelo país possibilitar clima favorável à presença destes organismos, tornando o território brasileiro quase inteiramente habitável por minhocas (BROWN; JAMES, 2007). Desse modo, há muito ainda a ser feito na área de levantamento e identificação de minhocas, visando aumentar os conhecimentos sobre a diversidade de espécies presentes no país. Dentre as espécies encontradas no Brasil, 85% correspondem a nativas e apenas 15% representam espécies exóticas (BROWN; JAMES, 2007).

No Brasil, foram encontradas minhocas pertencentes a nove famílias oriundas das mais diversas regiões do mundo (Tabela 2.1). As famílias mais diversificadas são a Glossoscolecidae (Michaelsen, 1900), com 201 espécies/subespécies (todas nativas do Brasil) agrupadas em 24 gêneros, a Ocnerodrilidae (Beddard, 1891), com 46 espécies/subespécies (39 nativas) agrupadas em 15 gêneros e a Acanthodrilidae (Claus, 1880), com 24 espécies/subespécies (12 nativas) pertencentes a sete gêneros. As demais famílias são Lumbricidae (13 espécies), Megascolecidae (11 espécies), Almidae e Criodrilidae (7 espécies), Eudrilidae (2 espécies) e Sparganophilidae (1 espécie). Dentro da família Glossoscolecidae, a mais diversificada do Brasil, os gêneros que apresentam maior diversidade de espécies são: *Glossoscolex* (54 espécies/subespécies), *Rhinodrilus* (31 espécies/subespécies) e *Righiodrilus* (21 espécies/subespécies) (BROWN; JAMES, 2007).

Inúmeros pesquisadores estudaram a diversidade de minhocas no Brasil e contribuíram para a identificação das espécies/subespécies conhecidas atualmente. Em revisão publicada por Brown e James (2007), os autores descreveram um histórico da taxonomia de minhocas no Brasil, onde destacaram os pesquisadores e suas contribuições mais relevantes para a identificação da diversidade de minhocas no país. Segundo os autores, o alemão Friedrich Sigismund Leuckart descreveu a primeira minhoca brasileira em 1835 e, no ano seguinte, descreveu a espécie *Glossoscolex giganteus*, um minhocoçu com mais de um metro de comprimento. Em 1857, o

naturalista alemão Fritz Müller descreveu a espécie *Pontoscolex corethrurus*, a minhoca mais comum e abundante no Brasil (MÜLLER, 1857) e no mundo (GONZÁLEZ et al., 2006).

Tabela 2.1 – Famílias de oligoquetas e suas regiões de origem.

| Família | Regiões de origem |
|------------------|---|
| Acanthodrilidae | África, América do Sul, América do Norte, Austrália e Nova Zelândia |
| Almidae | Europa, África, América do Sul, Ásia |
| Criodrilidae | África |
| Eudrilidae | África |
| Glossoscolecidae | América do Sul e América Central |
| Lumbricidae | América do Norte e Europa |
| Megascolecidae | América do Norte, América Central, América do Sul, Oceania, Ásia, África e Madagascar |
| Ocnerodrilidae | América do Sul, América Central, África, Ásia e Madagascar |
| Sparganophilidae | América do Norte e Europa |

Fonte: Extraída e modificada de Hendrix e Bohlen (2002).

Nativa do Platô ou Planalto Guianense, acredita-se que *P. corethrurus* tenha se dispersado do seu local de origem com o auxílio de grupos indígenas que transportavam materiais contendo casulos e pequenos indivíduos (RIGHI, 1990). No entanto, devido à sua ampla distribuição e ao elevado potencial de estabelecimento em novos ecossistemas, embora seja nativa do Brasil, esta espécie pode ser considerada como invasora peregrina na maior parte do país (BROWN; JAMES, 2007). Indivíduos de *P. corethrurus* podem ser encontrados em todas as regiões úmidas de mais de 56 países de clima tropical do mundo (FRAGOSO et al., 1999).

No final do século XIX, inúmeras espécies de minhocas, inclusive espécies novas, foram coletadas no Rio de Janeiro e em estados do sul do Brasil por pesquisadores europeus que realizavam pesquisas biológicas. A maior parte dos

exemplares coletados foi enviada a especialistas na Alemanha (Michaelsen, Ude, Horst, Kinberg), Itália (Cognetti, Rosa), Inglaterra (Benham) e França (Perrier), onde permanecem até hoje depositados em coleções (BROWN; JAMES, 2007). Em 1867, Kinberg descreveu a espécie *Amyntas gracilis* (sinônimos: *Pheretima hawayana* (Rosa, 1891) e *Amyntas hawayanus* (Beddard, 1900)), que corresponde à espécie exótica mais amplamente distribuída no Brasil e no mundo (BROWN et al., 2006).

De acordo com Fragoso et al. (2003), o conhecimento atual sobre a diversidade de minhocas no Brasil foi construído, principalmente, pelo esforço de dois taxonomistas: Johann Wilhelm Michaelsen e Gilberto Righi, os quais descreveram, aproximadamente, 60% das minhocas conhecidas no país.

No final do século XIX até o início do século XX, Michaelsen descreveu mais de 34 espécies brasileiras. O pesquisador brasileiro Righi, professor da Universidade de São Paulo, juntamente com seus alunos, descreveram 144 espécies/subespécies de minhocas brasileiras no período de 1960 até 1999, quando faleceu. Contribuições importantes também foram dadas pelo pesquisador Cernosvitov, o qual descreveu 12 espécies nativas brasileiras coletadas em expedições de europeus no Brasil, e por Ergasto Cordero, que descreveu três novas espécies de minhocas da família Glossoscolecidae encontradas no estado do Ceará (BROWN; JAMES, 2007).

Mais recentemente, Zicsi e Csuzdi identificaram minhocas coletadas em diversas regiões do Brasil, descrevendo um novo gênero, *Righiodrilus* (ZICSI, 1995), com 21 espécies/subespécies brasileiras e uma nova espécie, *Cirodrilus righii* (ZICSI et al., 2001). No ano de 2011, em diversos sistemas de uso do solo no Estado do Paraná, Marie L. C. Bartz coletou e descreveu dez novas espécies, sendo nove do gênero *Glossoscolex* e uma do gênero *Fimoscolex* do norte do estado do Paraná: *Glossoscolex (Praedrillus) lutocolous* n. sp. (Bartz; James, 2011), *Glossoscolex (Praedrillus) uliginosus* (Bartz; James, 2011), *Glossoscolex (Praedrillus) itaguajei* (Bartz; James, 2011); *Glossoscolex (Glossoscolex) palus* (Bartz; James, 2011), *Glossoscolex (Glossoscolex) primaensis* (Bartz; James, 2011), *Glossoscolex (Glossoscolex) mariae* (Bartz; James, 2011), *Glossoscolex (Glossoscolex) sanpedroensis* (Bartz; James, 2011), *Glossoscolex (Glossoscolex) terraopimus* (Bartz; James, 2011), *Glossoscolex (Glossoscolex) giocondoi* e *Fimoscolex bartzi* (Bartz; James, 2011) (BARTZ, 2011).

A ocorrência de espécies de minhocas nativas ou exóticas em um determinado local, possibilita ao pesquisador inferir sobre o grau de alterações às quais o ambiente foi submetido. De acordo com Fragoso et al. (1999), as espécies nativas apenas persistem onde a influência antrópica não é significativa e a vegetação nativa não foi substituída. Segundo Brown et al. (2006), o homem tem transportado minhocas exóticas em todo o mundo e, em algumas situações, estes organismos podem se tornar invasores, modificando populações nativas de minhocas, propriedades e processos do solo de forma significativa, bem como influenciando positiva ou negativamente o crescimento das plantas.

É provável que as invasões de minhocas exóticas em agroecossistemas tenham se intensificado com o comércio global da agricultura e com práticas relacionadas à gestão de resíduos e à biorremediação. Existem evidências de que minhocas invasoras têm provocado mudanças significativas no ambiente edáfico, na dinâmica da matéria orgânica e de nutrientes, e nas comunidades de plantas e organismos do solo. No entanto, não está claro se esses efeitos são comuns em ecossistemas habitados por minhocas nativas, especialmente em solos perturbados (HENDRIX et al., 2006).

Segundo Hendrix et al. (2006), comunidades de minhocas nativas e as características de seu habitat podem resistir à invasão por minhocas exóticas, reduzindo, conseqüentemente, o impacto de espécies exóticas sobre o ambiente. Após análise de diversos dados e estudos de caso, os autores concluíram que: 1) minhocas exóticas invadem ecossistemas habitados por minhocas nativas, mesmo na ausência de perturbação evidente, 2) a exclusão de minhocas nativas por competição com espécies exóticas não é demonstrada facilmente, 3) a co-existência de espécies nativas e exóticas tem sido frequentemente observada, mesmo que transitória, e 4) nos casos em que há resistência a invasões de minhocas exóticas em ambientes, o fato pode estar mais relacionado às características físicas e químicas do habitat, do que às interações biológicas entre minhocas nativas e exóticas.

O estabelecimento de minhocas exóticas em um novo ambiente pode ocorrer em duas situações: (1) em ecossistema preservado, quando há competição com espécies nativas ou (2) após colonização em ambientes alterados, provocando a eliminação ou a redução de espécies nativas (Figura 2.1) (GONZÁLEZ et al., 2006).

Em ecossistemas inalterados, minhocas nativas podem impedir a invasão de espécies exóticas, por estarem mais adaptadas ao ambiente original. No entanto, alterações no ecossistema, sejam elas provocadas pelo homem ou por eventos naturais, podem resultar na eliminação ou redução das populações nativas, devido a alterações bruscas na estrutura do solo, na ciclagem de nutrientes e no microclima. Estas mudanças no ecossistema podem prejudicar e reduzir as populações de minhocas nativas, favorecendo a invasão de espécies exóticas (LAVELLE et al., 1999; GONZÁLEZ et al., 2006) (Figura 2.1).

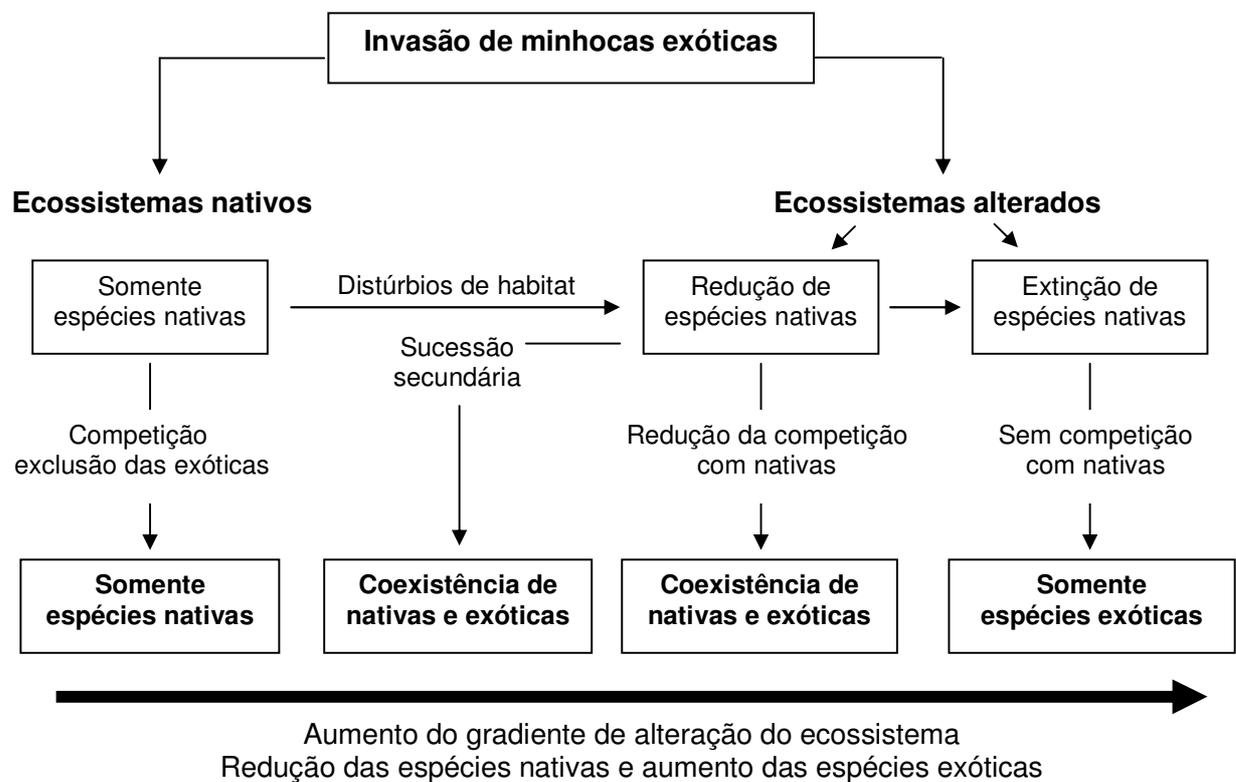


Figura 2.1 – Efeitos da invasão de espécies exóticas sobre espécies nativas em ecossistemas naturais e alterados. Extraído e modificado de González et al. (2006).

A disseminação de minhocas exóticas em ecossistemas naturais e antropizados é um fato observado em diversos países do mundo. Pesquisas já demonstraram que a

invasão de minhocas em ambientes naturais pode resultar em modificações importantes na superfície do solo, nos processos do ecossistema, na cadeia alimentar dos organismos que vivem no solo e acima dele e na comunidade de plantas (GUNDALE et al., 2005; CALLAHAM et al., 2006; HENDRIX, 2006). No entanto, os impactos diretos e indiretos provocados por invasões de minhocas em outros organismos têm sido ignorados (MIGGE-KLEIAN et al., 2006).

Em virtude de evidências sobre os impactos negativos da invasão de minhocas sobre ecossistemas nativos, pesquisas vêm sendo realizadas para avaliar, compreender e buscar alternativas para solucionar essa questão (CALLAHAM et al., 2009; GUNDALE et al., 2005; MIGGE-KLEIAN et al., 2006; DIDHAM et al., 2007; CAMERON et al., 2008; ADDISON, 2009; LEÓN; JOHNSON-MAYNARD, 2009). Callaham et al. (2006) discutiram políticas de gestão para reduzir e, se possível, evitar a introdução de espécies exóticas em áreas naturais habitadas exclusivamente por espécies nativas na América do Norte, as quais podem ser aplicadas em outros países do mundo.

De acordo com McNeely et al. (2001), geralmente espécies invasoras (exóticas) tendem a estar associadas com impactos negativos em ecossistemas naturais, alterando a comunidade de organismos e plantas, bem como propriedades, processos e funções do ecossistema. No entanto, é importante ressaltar que, em áreas antropizadas, como são os casos de áreas agrícolas e silvipastoris, a introdução de espécies de minhocas exóticas pode promover a melhoria de algumas propriedades químicas, físicas e biológicas do solo.

Dentre os estados brasileiros que necessitam ser melhor amostrados em relação à diversidade de minhocas encontra-se o Rio Grande do Sul (RS), o qual possivelmente, abrigue grande riqueza de espécies ainda desconhecidas. Levantamentos realizados no estado do RS, desde a década de 1920 até o ano de 2010, apontaram a existência de, pelo menos, 44 espécies de minhocas já descritas, sendo 15 nativas e 29 exóticas. As espécies estão agrupadas em seis famílias, sendo que a maior parte delas pertence às famílias Lumbricidae (12 espécies) e Glossoscolecidae (11 espécies) (Tabela 2.2).

(continua)

Tabela 2.2 - Lista de famílias, gêneros e espécies de minhocas exóticas (EX), invasoras (IN), potencialmente invasoras (PI), nativas peregrinas (NP) ou nativas (N) encontradas no Estado do Rio Grande do Sul e sua distribuição.

| Família Gênero e espécie | Localização no RS | Classificação | Referências |
|--|---|----------------------|---|
| Acanthodrilidae | | | |
| <i>Dichogaster annae</i> Horst (1893) | Diversos locais do estado do RS | EX, PI | Luederwaldt (1927), Righi (1968, 1984a, 1984b, 1999); Righi; Ayres (1975) |
| <i>Dichogaster saliens</i> Beddard (1892) | Fontoura Xavier, Ibirubá | EX, IN | Knäpper; Porto (1979) |
| <i>Eodrilus doellojuradoi</i> Cordero (1942) | Porto Alegre | EX | Knäpper (1976) |
| <i>Eodrilus magellanicus</i> Beddard (1895) | Porto Alegre | EX | Knäpper (1976) |
| <i>Microscolex dubius</i> Fletcher (1887) | Camaquã, Canguçu, Guaíba, Jaguarão, Pedro Osório, Pelotas, Pinheiro Machado, Piratini, Porto Alegre, Santana do Livramento, Taquara | EX | Knäpper (1976); Schiavon et al. (2009); Lima; Rodríguez (2007) |
| <i>Microscolex michaelsoni</i> Beddard (1895) | Porto Alegre | EX | Knäpper (1976) |
| <i>Microscolex phosphoreus</i> Dugès (1837) | Guaíba e outros locais inespecíficos do Estado do RS | EX | Moreira (1903); Martiis (1905); Michaelson (1927); Knäpper (1976) |
| Criodrilidae | | | |
| <i>Criodrilus lacuum</i> Hoffmeister (1845) | Porto Alegre, Triunfo | EX | Knäpper; Porto (1979) |
| <i>Guarani camaqua</i> Lima e Rodríguez (2007) | Camaquã | N | Lima; Rodríguez (2007) |

(continuação)

Tabela 2.2 - Lista de famílias, gêneros e espécies de minhocas exóticas (EX), invasoras (IN), potencialmente invasoras (PI), nativas peregrinas (NP) ou nativas (N) encontradas no Estado do Rio Grande do Sul e sua distribuição.

| Família Gênero e espécie | Localização no RS | Classificação | Referências |
|---|---|----------------------|--|
| Glossoscolecidae | | | |
| <i>Alexidrilus icomi</i> Righi (1971) | Porto Alegre | N | Knäpper (1976) |
| <i>Alexidrilus littoralis</i> Ljungstrom (1972) | Canela, Guaíba, São Leopoldo, Tenente Portela | N | Knäpper (1976, 1977); Knäpper (registro pessoal) |
| <i>Alexidrilus lourdesae</i> Righi (1971) | Estrela | N | Righi (1971) |
| <i>Glossodrilus parecis</i> Righi; Ayres (1975) | Parecis | N | Righi; Ayres (1975) |
| <i>Glossoscolex catharinensis</i> Michaelsen (1918) | São Sebastião do Caí | N | Righi (1974) |
| <i>Glossoscolex grandis</i> Michaelsen (1892) | Passo Fundo | N | Michaelsen (1892, 1918) |
| <i>Glossoscolex truncatus</i> Rosa (1895) | Uruguaiana | N | Luederwaldt (1927) |
| <i>Glossoscolex uruguayensis uruguayensis</i> Cordero (1943) = <i>Glossoscolex uruguayensis</i> Cordero (1943) | São Leopoldo | N | Righi (1974) |
| <i>Glossoscolex wiengreeni</i> Michaelsen (1897) | Guaíba, Porto Alegre, Santa Maria | N | Knäpper; Porto (1979) |
| <i>Pontoscolex corethrurus</i> Müller (1857) | Alegria, Charqueadas, Chuí, General Câmara, Guaíba, Ilha da Pintada (Porto Alegre), Rolante, São Leopoldo, São Luiz Gonzaga, Sapucaia do Sul, Tramandaí | IN, NP | Knäpper (1972b, 1976, 1979); Knäpper; Porto (1979) |
| <i>Urobenus brasiliensis</i> Benham (1887) = <i>Rhinodrilus papillifer</i> Michaelsen (1892) | Itaqui, Pelotas, Porto Alegre, Taquara, Turuçu | N | Righi (1971), Schiavon et al. (2009) |

(continuação)

Tabela 2.2 - Lista de famílias, gêneros e espécies de minhocas exóticas (EX), invasoras (IN), potencialmente invasoras (PI), nativas peregrinas (NP) ou nativas (N) encontradas no Estado do Rio Grande do Sul e sua distribuição.

| Família Gênero e espécie | Localização no RS | Classificação | Referências |
|--|--|----------------------|---|
| Lumbricidae | | | |
| <i>Aporrectodea trapezoides</i> Dugès (1828) | Porto Alegre | EX | Michaelsen (1892); Knäpper (1976) |
| <i>Aporrectodea caliginosa</i> Savigny (1826) | Canela, Canguçu, Charqueadas, Estrela, Guaíba, Herval, Mariluz, Nova Petrópolis, Novo Hamburgo, Pelotas, Pinheiro Machado, Piratini, Porto Alegre, Rolante, Santa Cruz do Sul, São Francisco de Paula, São Leopoldo, Sapucaia do Sul, Sobradinho, Viamão | EX, PI | Righi (1967); Knäpper; Hauser (1969); Knäpper (1976); Knäpper; Porto (1979); Knäpper (registro pessoal) |
| <i>Aporrectodea rosea</i> Savigny (1826) | Porto Alegre | EX | Michaelsen (1892) |
| <i>Bimastos parvus</i> Eisen (1874) | Camaquã, Nova Teutônia | EX | J&B ^a ; Lima; Rodríguez (2007) |
| <i>Dendrobaena veneta</i> Rosa (1886) | Porto Alegre | EX | Knäpper; Porto (1979) |
| <i>Eisenia andrei</i> Bouché (1972) | Santa Maria, Pelotas | EX | Steffen (2010); Schiedeck et al. (2009b) |
| <i>Eisenia fetida</i> Savigny (1826) | Barra do Ribeiro, Gramado, Guaíba, Ilha Grande dos Marinheiros (Porto Alegre), Ivoti, Lajeado, Mariluz, Novo Hamburgo, Pelotas, Piratini, São Leopoldo, Sapucaia do Sul, Tramandaí, Viamão | EX | Michaelsen (1892); Knäpper; Porto (1979); Righi (1967); Knäpper (1972a, 1976) |
| <i>Eisenia lucens</i> Waga (1857) | Fontoura Xavier, Porto Alegre, Santo Ângelo, São Francisco de Paula | EX | Knäpper (1976); Knäpper; Porto (1979) |
| <i>Eiseniella tetraedra pupa</i> Eisen (1874) | Porto Alegre | EX | Knäpper (1976) |
| <i>Eiseniella tetraedra tetraedra</i> Savigny (1826) | Diversos municípios do estado do RS | EX | Pacheco et al. (1992) |

(continuação)

Tabela 2.2 - Lista de famílias, gêneros e espécies de minhocas exóticas (EX), invasoras (IN), potencialmente invasoras (PI), nativas peregrinas (NP) ou nativas (N) encontradas no Estado do Rio Grande do Sul e sua distribuição.

| Família Gênero e espécie | Localização no RS | Classificação | Referências |
|---|--|----------------------|---|
| <i>Octolasion cyaneum</i> Savigny (1826) | Gramado, Pelotas, Porto Alegre, São Leopoldo | EX | Righi (1967); Knäpper (1976) |
| <i>Octolasion lacteum</i> Hoffmeister (1845) | Porto Alegre | EX | Knäpper (1976) |
| Megascolecidae | | | |
| <i>Amyntas corticis</i> Kinberg (1867) = <i>Pheretima deffringens</i> Baird (1869) | Barra do Ribeiro, Caí, Canela, Canoas, Caxias do Sul, Cruz Alta, Dois Irmãos, Dom Pedrito, Erval, Estância Velha, Estrela, Gramado, Guaíba, Harmonia, Ilópolis, Itaimbezinho, Ivoti, Lajeado, Lavras do Sul, Montenegro, Nova Petrópolis, Novo Hamburgo, Roca Sales, Paim Filho, Passo Fundo, Picada Café, Piratini, Portão, Porto Alegre, Salvador do Sul, Santa Cruz do Sul, Santa Maria, São Francisco de Paula, São Leopoldo, Sapucaia do Sul, Taquara, Teutônia, Uruguaiana, Viamão | EX, IN | Knäpper (registro pessoal); Krabbe et al. (1993) |
| <i>Amyntas morrissi</i> Beddard (1892) = <i>Pheretima morrissi</i> Beddard (1892) | Alvorada, Arroio Grande, Barra do Ribeiro, Cachoeirinha, Camaquã, Canoas, Caxias do Sul, Charqueadas, Cruz Alta, Cruzeiro do Sul, Dois Irmãos, Erval, Estância Velha, Esteio, Estrela, Gramado, Gravataí, Guaíba, Harmonia, Herval, Itaquí, Ivoti, Lajeado, Mariluz, Montenegro, Morro Reuter, Nova Petrópolis, Novo Hamburgo, Pedro Osório, Pelotas, Portão, Porto Alegre, Rolante, Rosário do Sul, Santa Cruz do Sul, São Leopoldo, Sapiranga, Sapucaia do Sul, Taquara, Teutônia, Tramandaí, Viamão | EX, PI | Knäpper (1972a, 1972b); Knäpper; Porto (1979); Krabbe et al. (1993); Lima; Rodríguez (2007); Knäpper (registro pessoal) |

(continuação)

Tabela 2.2 - Lista de famílias, gêneros e espécies de minhocas exóticas (EX), invasoras (IN), potencialmente invasoras (PI), nativas peregrinas (NP) ou nativas (N) encontradas no Estado do Rio Grande do Sul e sua distribuição.

| Família Gênero e espécie | Localização no RS | Classificação | Referências |
|---|--|---------------|---|
| <i>Amyntas gracilis</i> Kinberg (1867) = <i>Amyntas hawayanus</i> Rosa (1891) = <i>Pheretima hawayana</i> Rosa (1891) | Arroio Grande, Barra do Ribeiro, Cachoeirinha, Camaquã, Canoas, Caxias do Sul, Charqueadas, Chuí, Cruz Alta, Cruzeiro do Sul, Dom Pedrito, Encantado, Estância Velha, Esteio, Estrela, Feliz, General Câmara, Gramado, Gravataí, Guaíba, Herval, Harmonia, Ilha da Pintada e Ilha do Pavão (Porto Alegre), Ivoti, Lajeado, Lavras da Sul, Mariluz, Montenegro, Nova Petrópolis, Novo Hamburgo, Paim Filho, Pedro Osório, Pelotas, Pinheiro Machado, Piratini, Portão, Quaraí, Roca Sales, Rolante, Rosário do Sul, Salvador do Sul, Santa Cruz do Sul, Santa Maria, Santa Vitória do Palmar, Santo Ângelo, São Borja, São Leopoldo, São Lourenço do Sul, Sapiranga, Sapucaia do Sul, Tapes, Taquara, Teutônia, Tramandaí, Uruguaiana, Viamão | EX, IN | Knäpper (1972a, 1972b, 1976); Knäpper; Porto (1979); Knäpper (registro pessoal); Krabbe et al. (1993); Lima; Rodríguez (2007); Schiavon et al. (2009) |
| <i>Metaphire californica</i> Kinberg (1867) = <i>Pheretima californica</i> Michaelsen (1900) | Alvorada, Arroio Grande, Cachoeirinha, Canguçu, Canoas, Charqueadas, Cruz Alta, Cruzeiro do Sul, Dois Irmãos, Estância Velha, Esteio, Estrela, Guaíba, Jaguarão, Lajeado, Mariluz, Montenegro, Nova Petrópolis, Novo Hamburgo, Osório, Pedro Osório, Pelotas, Piratini, Portão, Porto Alegre, Rolante, Rosário do Sul, Santa Cruz do Sul, Santa Maria, Santana do Livramento, São Leopoldo, São Luiz Gonzaga, Sapucaia do Sul, Taquara, Teutônia, Torres, Tramandaí, Venâncio Aires | EX, PI | Knäpper (registro pessoal); Krabbe et al. (1993) |

(conclusão)

Tabela 2.2 - Lista de famílias, gêneros e espécies de minhocas exóticas (EX), invasoras (IN), potencialmente invasoras (PI), nativas peregrinas (NP) ou nativas (N) encontradas no Estado do Rio Grande do Sul e sua distribuição.

| Família Gênero e espécie | Localização no RS | Classificação | Referências |
|---|--|----------------------|--|
| <i>Metaphire schmardae</i> Horst (1883) = <i>Pheretima schmardae</i> Horst (1883) = <i>Amyntas schmardae</i> Beddard (1900) | Arroio Grande, Bagé, Barra do Ribeiro, Camaquã, Charqueadas, Cruz Alta, Dois Irmãos, Estância Velha, Esteio, General Câmara, Gramado, Guaíba, Harmonia, Herval, Ijuí, Mariluz, Montenegro, Novo Hamburgo, Pelotas, Portão, Porto Alegre, Quaraí, Santa Maria, São Leopoldo, Sapiranga, Sapucaia do Sul, Taquara, Tramandaí, Viamão, São Leopoldo | EX, PI | Michaelsen (1927); Knäpper (1972a, 1972b); Knäpper; Porto (1979); Knäpper (registro pessoal) |
| <i>Pheretima darnleiensis</i> Fletcher (1886) | 15 municípios do estado do RS | EX, PI | Righi; Knäpper (1965, 1966); Knäpper (1972a, 1972b) |
| <i>Polypheretima taprobanae</i> Beddard (1892) | Gramado, Nova Petrópolis, Porto Alegre, Santa Cruz do Sul, São Leopoldo, Viamão | EX, PI | Knäpper (1976); Knäpper (registro pessoal) |
| <i>Pontodrilus litoralis</i> Grubbe (1855) | Vários locais ao longo do litoral | EX, PI | Righi (1968) |
| Ocnerodrilidae | | | |
| <i>Eukerria eiseniana</i> Rosa (1895) | Camaquã | N? | Lima; Rodríguez (2007) |
| <i>Eukerria garmani argentinae</i> Jamieson (1970) | Camaquã, Estrela | N? | Righi; Ayres (1975); Lima; Rodríguez (2007) |
| <i>Eukerria saltensis</i> Beddard (1895) | Camaquã | EX | Lima; Rodríguez (2007) |
| <i>Eukerria stagnalis</i> Kinberg (1867) | Camaquã, Estrela, Porto Alegre | N? | Righi; Ayres (1975); Lima; Rodríguez (2007) |

^a Observações pessoais de Samuel Wooster James e George Gardner Brown.
Fonte: Extraída e modificada de Brown et al. (2006) e James e Brown (2006).

2.3 Categorias ecológicas

De acordo com a atividade e a estratégia alimentar, as minhocas podem ser classificadas em diferentes categorias ecológicas, as quais caracterizam o comportamento destes organismos nos ecossistemas. As minhocas são onívoras e se alimentam de resíduos vegetais em diferentes graus de decomposição, juntamente com organismos decompositores acompanhantes, tais como fungos, bactérias, protozoários e nematóides. Também podem ingerir seus próprios excrementos, bem como fezes de outros organismos. As minhocas são capazes de selecionar seu alimento ingerindo, preferencialmente, as partes macias das folhas, bem como resíduos contendo teores elevados de nitrogênio e cálcio (RIGHI, 1999).

Em relação à categoria nutricional ou estratégia alimentar, as minhocas são divididas em dois grandes grupos: detritívoras e geófagas. As detritívoras são aquelas que se alimentam próximo à superfície do solo ingerindo, principalmente serrapilheira³, raízes de plantas mortas e outros resíduos vegetais. As minhocas geófagas alimentam-se no subsolo, ingerindo restos orgânicos sem estrutura celular reconhecível, dispersos entre as partículas minerais do solo (LEE, 1985; RIGHI, 1999).

Tanto as espécies detritívoras como as geófagas alimentam-se de material orgânico e mineral. No entanto, as detritívoras consomem, preferencialmente, resíduos orgânicos, havendo predominância de matéria orgânica no seu trato digestivo, enquanto que no trato digestivo das geófagas, a maior proporção dos materiais ingeridos corresponde a partículas minerais (LEE, 1985).

As diferentes espécies de minhocas foram classificadas em três grupos funcionais ou categorias ecológicas, relativas à estratificação vertical: epigéicas, endogéicas e anécicas (BOUCHÉ, 1977; LEE, 1985; JAMES, 2000) (Tabela 2.3).

As espécies epigéicas ou epígeas vivem na superfície dos solos, podendo habitar tanto a serrapilheira, quanto os solos suspensos sobre galhos, axilas de folhas de palmeiras e bromélias (BROWN; JAMES, 2007; DOMÍNGUEZ et al., 2009).

³ Serrapilheira ou serapilheira é a camada de resíduos orgânicos em diferentes estágios de decomposição, que se acumula na superfície do solo. Nos ecossistemas, sua composição varia de acordo com o tipo de vegetação. A serrapilheira pode ser composta por resíduos vegetais, como folhas, caules, ramos, frutos, flores e sementes, bem como por resíduos animais, tais como excrementos e restos de animais mortos (LAVELLE et al., 1997).

Normalmente, são pigmentadas, apresentam comprimento menor do que as espécies endogéicas e anécicas, possuem altas taxas de reprodução e expectativa de vida curta (JAMES, 2000). Alimentam-se de matéria orgânica em etapas primárias ou intermediárias de decomposição, o que torna seus coprólitos⁴ essencialmente orgânicos (BROWN; JAMES, 2007).

Tabela 2.3 – Categorias ecológicas, habitat, alimentação e características morfológicas das minhocas.

| Categoria | Subcategoria | Habitat | Alimento | Tamanho e Pigmentação |
|------------------|-------------------------------|---|--|-----------------------------------|
| EPIGÉICA | Epigéica | liteira | serrapilheira, micróbios | < 10 cm, altamente pigmentada |
| | Epi-anécica/ Epi-endogéica | superfície do solo | serrapilheira, microrganismos | 10-15 cm, parcialmente pigmentada |
| ANÉCICA | Anécica | galerias (> 40 cm) | liteira e solo | > 15 cm, pigmentação anterodorsal |
| ENDOGÉICA | Polihúmica | superfície do solo e rizosfera | solo com alto teor de matéria orgânica | < 15 cm, filiforme, despigmentada |
| | Mesohúmica | 0-20 cm do solo | camada de solo de 0–10 cm | 10-20 cm, despigmentada |
| | Endo-anécica | 0-50 cm do solo, algumas fazem galerias | camada de solo de 0–10 cm | > 20 cm, despigmentada |
| | Oligohúmica | 15-80 cm do solo | camada de solo de 20–40 cm | > 20 cm, despigmentada |

Fonte: Extraída e modificada de Hendrix e Bohlen (2002).

As espécies endogéicas habitam os horizontes minerais do solo, onde constroem galerias semipermanentes e permanentes. Em comparação às espécies epigéicas, as endogéicas são maiores, menos pigmentadas, possuem maior expectativa de vida e taxa reprodutiva menor. Em função do tipo de alimentação, formam coprólitos minerais, frequentemente enriquecidos com matéria orgânica e partículas de argila (JAMES, 2000). A maior parte das espécies de minhocas pertence a esta categoria ecológica (BROWN; JAMES, 2007), sendo consideradas

⁴ Coprólitos são os excrementos das minhocas, ou seja, corresponde ao produto final da transformação de resíduos orgânicos e matéria mineral que passou pelo trato digestivo das minhocas e foi eliminado após ter sofrido ação física (minhoca), química (enzimas e hormônios) e biológica (microrganismos existentes nos órgãos do aparelho digestivo das minhocas) (LAVELLE et al., 1997).

os agentes responsáveis pela agregação e estabilização da matéria orgânica do solo (LAVELLE; SPAIN, 2001).

As espécies anécicas são, geralmente, grandes e vivem em galerias essencialmente verticais e permanentes que podem ultrapassar 40 cm de profundidade. Durante a noite, alimentam-se de material orgânico em estágios intermediários de decomposição na superfície do solo, o qual frequentemente é enterrado para acelerar a decomposição e aumentar a palatabilidade (JAMES, 2000; BROWN; JAMES, 2007; DOMÍNGUEZ et al., 2009).

Reunindo as duas classificações, pode-se afirmar que as minhocas epigéicas e anécicas agrupam as espécies detritívoras e que as endogéicas incluem as espécies geófagas. De acordo com a preferência alimentar, Lavelle (1983) propôs a divisão das espécies de minhocas da categoria endogéica em oligohúmicas, mesohúmicas e polihúmicas, as quais dependem, respectivamente, de quantidades pequenas, moderadas e altas de matéria orgânica humificada (húmus) vinculada ao solo mineral ingerido (Tabela 2.3).

As minhocas podem ainda ser divididas entre engenheiras do ecossistema e decompositoras ou transformadoras da serrapilheira. As engenheiras do ecossistema são aquelas minhocas que vivem dentro do solo (endogéicas e anécicas), que constróem galerias e produzem estruturas organominerais altamente resistentes, que persistem no solo (meses a anos) afetando o ambiente e os organismos menores que vivem nele. Estas minhocas interagem com a microbiota edáfica, desenvolvendo relação mutualística com os organismos que vivem em seu trato digestivo (intestino) e nas estruturas que constróem. As transformadoras da serrapilheira ou decompositoras são as minhocas epigéicas que vivem e se alimentam da serrapilheira, produzindo estruturas puramente orgânicas que são menos persistentes no ambiente (GILLER et al., 1997; LAVELLE, 1997).

Cabe ressaltar ainda que, em função do menor valor energético do material mineral em relação ao orgânico, as minhocas endogéicas necessitam ingerir maior quantidade de alimento, quando comparadas às minhocas epigéicas e anécicas, para poder atender suas exigências energéticas. Assim, as minhocas endogéicas produzem maior quantidade de excrementos, os quais são liberados na superfície e, mais frequentemente, no interior do solo (LEE, 1985; JAMES, 2000).

Os padrões ecológicos de vida dos diferentes tipos de minhocas presentes no solo, refletem em distintos papéis funcionais e efeitos ambientais das espécies sobre o ecossistema (JAMES, 2000). Assim, o conhecimento da diversidade de minhocas em um determinado ambiente possibilita a compreensão dos efeitos e alterações que a atividade destes organismos provoca no solo.

2.4 Importância das minhocas para o solo

As minhocas são importantes para o funcionamento do solo e a manutenção da sustentabilidade dos ecossistemas. Esses organismos contribuem para a melhoria da estrutura e qualidade física do solo, através da movimentação de partículas dentro e entre os horizontes, da formação de agregados e consequente aumento da resistência do solo à erosão, além do aumento da porosidade, aeração, infiltração e retenção de água no solo (BLANCHART et al., 1999; LAVELLE et al., 2006). Através da formação de bioporos (Figura 2.2 A), facilitam a aeração, infiltração de água e a formação de macroagregados estáveis no solo. Participam da decomposição de matéria orgânica, da mineralização e disponibilização de nutrientes para as plantas (LAVELLE et al., 2006), sendo por isso, sua presença considerada indicativo de solo fértil e saudável pelos agricultores (SCHIEDECK et al., 2009a; LIMA; BRUSSAARD, 2010). Domínguez et al. (2010) relatam ainda efeito benéfico das minhocas sobre a germinação e distribuição de sementes no solo.

A atividade das minhocas no solo, mais especificamente a movimentação e ingestão de partículas minerais e orgânicas, forma uma ampla rede de galerias, tanto na direção vertical como na horizontal, que contribui para os processos físicos e para a manutenção da vida no solo. A abertura de galerias no perfil do solo, além de contribuir para a infiltração de água e troca de gases, quando não mais utilizadas pelas minhocas, servem de abrigo a outros organismos (BROWN et al., 2004; BROWN; JAMES, 2007).

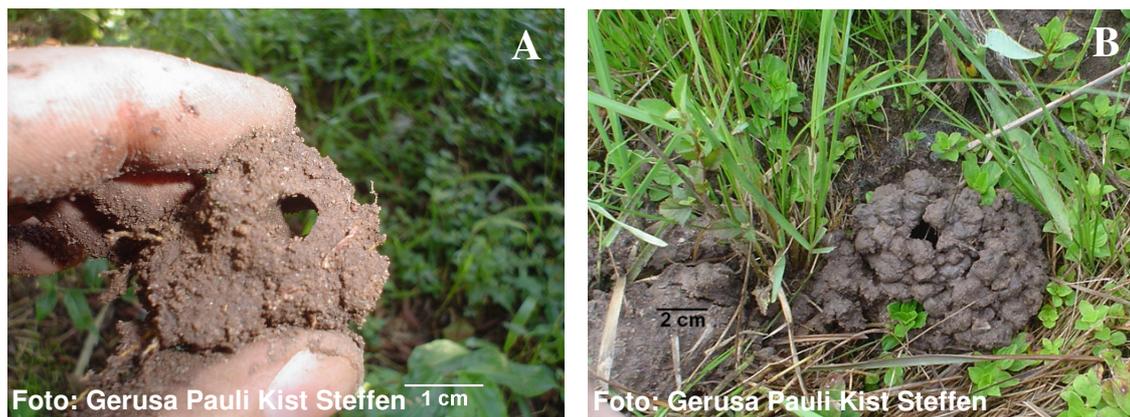


Figura 2.2 – Bioporo formado pela espécie *Amyntas gracilis* em solo arenoso (A) e coprólitos de uma espécie endogéica depositados na superfície de um campo nativo (B).

A atividade constante das minhocas no perfil do solo resulta na formação de um ambiente característico, denominado de drilosfera. De acordo com Beare et al. (1995), a drilosfera corresponde à zona do solo influenciada pela ação das minhocas, que se estende da serrapilheira ao volume de solo ao redor das suas galerias e câmaras. Normalmente, o ambiente edáfico influenciado por minhocas é caracterizado não apenas pela presença de amplas redes de galerias, mas também pela deposição de excrementos (Figura 2.2 B), também denominados de coprólitos ou estruturas biogênicas⁵ (ROSSI et al., 2006), os quais têm papel importante no funcionamento do ecossistema. Barois et al. (1999) ressaltam que, quando secas, além de concentrarem carbono orgânico e nutrientes, estas estruturas conferem ao solo maior resistência ao processo erosivo devido à sua elevada estabilidade. Segundo Lafont et al. (2007) a construção de galerias e a produção de coprólitos, resultado da ingestão de resíduos orgânicos e minerais, estão entre as atividades das minhocas que causam alterações significativas nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo.

Em agrossistemas sob diferentes usos da terra, as minhocas representam um dos principais grupos de macroinvertebrados edáficos presentes. Conforme Fragozo et al. (1999), as minhocas correspondem entre 40% a 90% da biomassa da macrofauna na maioria dos ecossistemas tropicais, onde contribuem para a manutenção da fertilidade do solo por meio de três ações principais: (1) constróem e

⁵ Estruturas biogênicas são aquelas produzidas pela atividade biológica de algum organismo (LAVELLE, 1996). No caso das minhocas, estas estruturas são túneis, galerias e coprólitos.

mantêm a estrutura do solo, baseada em macroagregados resistentes; (2) liberam os nutrientes contidos na matéria orgânica do solo; e (3) protegem fisicamente a matéria orgânica no interior de coprólitos compactos (LAVELLE et al., 1997; LAVELLE et al., 2006). Também promovem a fragmentação e redistribuição da matéria orgânica no solo, contribuindo com a ciclagem e liberação de nutrientes contidos nesse material (KENNETTE et al., 2002). As minhocas promovem uma redistribuição da serrapilheira tanto vertical quanto horizontalmente no solo, criando sítios (*patches*) de matéria orgânica que são, ao mesmo tempo, substrato e refúgio para microrganismos e demais organismos da fauna edáfica (JAMES, 2000; LAVELLE et al., 2006).

Considerando a densidade populacional, a biomassa e as funções que desempenham no solo, as minhocas são consideradas organismos chave na conservação da estrutura do ambiente e no controle da dinâmica dos nutrientes no solo (EDWARDS; BOHLEN, 1996).

A presença de minhocas no ecossistema provoca alterações nas propriedades químicas do solo, tais como valor de pH e disponibilidade de nutrientes como cálcio, magnésio, fósforo, potássio e nitrogênio; nas propriedades físicas, tais como aumento da capacidade de retenção e infiltração de água, aeração e formação da estrutura do solo; além de alterações na atividade e população de microrganismos existentes no ambiente, devido à elevada diversidade de microrganismos que habitam o trato digestivo das minhocas (LEE, 1985; BROWN; JAMES, 2007). Segundo Brito-Veja e Espinosa-Victoria (2009), dentre os microrganismos que habitam o trato digestivo das minhocas, destacam-se os fixadores de nitrogênio, produtores de hormônios de crescimento vegetal e solubilizadores de fosfato, os quais estão envolvidos em importantes processos no solo.

Além de representarem um meio de incubação de microrganismos benéficos para a sustentabilidade dos ecossistemas, as minhocas atuam na dispersão destes microrganismos através da constante deposição de coprólitos (BRITO-VEGA; ESPINOSA-VICTORIA, 2009). Os excrementos frescos das minhocas apresentam maior concentração e atividade de microrganismos do que o solo circundante onde vivem (DELL' AGNOLA; NARDI, 1987; FIUZA et al., 2011), o que favorece a biodisponibilização de nutrientes para as plantas devido ao processo de

mineralização. Além disso, apresentam elevada disponibilidade de nutrientes, tamponamento da acidez do solo, alta capacidade de troca catiônica e de retenção de umidade, sendo capazes de contribuir com o crescimento e desenvolvimento das plantas (BROWN; JAMES, 2007).

Fiuzza et al. (2011) compararam a disponibilidade de nutrientes, o teor de carbono orgânico e a atividade microbiana dos coprólitos de *Chibui bari*⁶ com o solo adjacente em áreas de floresta secundária, cultivo de seringal e pastagem. Os autores observaram que os coprólitos apresentaram melhor condição química e biológica do que o solo adjacente nas três áreas avaliadas, pois apresentaram maiores concentrações de cálcio, magnésio, potássio, fósforo e carbono orgânico total, maiores valores de pH e CTC, redução nos teores de alumínio trocável (Al^{3+}), além de maior respiração microbiana.

Aliada à concentração e biodisponibilização de nutrientes, existe a liberação de compostos orgânicos capazes de estimular o crescimento vegetal e de controlar determinados fitopatógenos. Segundo Brown et al. (2004), os coprólitos podem influenciar direta e indiretamente o crescimento de plantas, devido à presença de quantidades significativas de ácidos húmicos e hormônios reguladores do crescimento vegetal. Acredita-se também que os compostos orgânicos estáveis presentes nos coprólitos possam causar supressividade sobre alguns fitopatógenos fúngicos e bacterianos, contribuindo para o controle de determinados microrganismos fitopatogênicos.

Como efeitos negativos da introdução de *P. corethrurus* em ecossistemas, além da dominância sobre espécies de minhocas nativas, quando presente em densidades elevadas, a alta produção de coprólitos na superfície do solo pode compactar a camada superficial, dificultando a infiltração de água no perfil, a atividade de outros organismos e o crescimento de raízes. Em períodos chuvosos, a dificuldade de infiltração de água no solo pode saturar as camadas superficiais, gerando um ambiente com condições anaeróbicas. Em períodos de seca, a abertura de fendas na superfície do solo pode facilitar a perda de umidade, prejudicar o crescimento radicular e a absorção de água pelas raízes, o que pode provocar

⁶ *Chibui bari* (Righi e Guerra, 1985) é uma espécie de minhocoçu pertencente à família Glossoscolecidae, nativa da região amazônica, de hábito geófago e endogéico, que apresenta distribuição em todo o Estado do Acre (FIUZZA et al., 2011).

declínio ou até mesmo a morte da vegetação existente (CHAUVEL et al., 1999; BARROS et al., 2001).

Além de todos os benefícios descritos em relação à melhoria de propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, por apresentarem sensibilidade aos diferentes tipos de uso e manejo adotados em áreas agrícolas, as minhocas tem sido utilizadas como indicadores biológicos da qualidade do solo por muitos pesquisadores (RESSETTI, 2006; NUNES et al., 2007; VELAZQUEZ et al., 2007; SUTHAR, 2009; LIMA; BRUSSAARD, 2010).

As minhocas são consideradas excelentes indicadores da qualidade de agroecossistemas por responderem a diferentes tipos de uso e manejo dos solos (PAOLETTI, 1999; LAVELLE et al., 2006), estando relacionadas às condições ambientais como a fertilidade do solo e sendo susceptíveis à perturbação e contaminação do habitat (BROWN; DOMÍNGUEZ, 2010).

Práticas de manejo que provocam revolvimento do solo tendem a reduzir as populações de minhocas e, conseqüentemente, a atividade e os benefícios destes organismos no meio edáfico (CLAPPERTON et al., 1997; BROWN; DOMÍNGUEZ, 2010). A redução do número de minhocas em áreas agrícolas pode ser ocasionada diretamente pela morte dos organismos, devido a lesões provocadas pelos equipamentos utilizados no revolvimento do solo, ou ainda indiretamente, pela destruição das galerias (drilosfera), redução das fontes de alimento, alteração da temperatura, umidade e aeração do solo (CURRY et al., 2002).

De acordo com Brown e Domínguez (2010), a comunidade de minhocas presente em um determinado local é uma função das condições edáficas (tipo de solo, mineralogia, teor de matéria orgânica, textura, estrutura, temperatura, umidade e valor de pH), da vegetação (espécie e cobertura), da topografia (posição fisiográfica, inclinação), do clima (precipitação, temperatura, umidade relativa do ar, vento), das interações com outros organismos edáficos, além das condições históricas que originaram o solo e o local (história humana e geológica).

Dados referentes à comunidade de minhocas presente em um determinado local podem indicar a integridade do ecossistema e sua capacidade de resistir a perturbações, sendo úteis na determinação de áreas prioritárias para atividades de conservação (BROWN; JAMES, 2007). Assim, o levantamento e a identificação das espécies nativas e exóticas presentes no solo são relevantes para o conhecimento

da diversidade e para a compreensão das inter-relações existentes nos ecossistemas.

Cinquenta e uma espécies exóticas e até sete espécies peregrinas de minhocas nativas são conhecidas do Brasil, geralmente de agroecossistemas ou outros locais perturbados próximos a habitações humanas. Oito espécies são consideradas invasoras e outras 16 são potencialmente invasoras. No entanto, pouco se conhece a respeito dos efeitos que promovem sobre espécies de plantas, propriedades e processos do solo, bem como sobre espécies de minhocas nativas (BROWN et al., 2006) potencialmente importantes para identificar ambientes que tiveram pouca ou nenhuma interferência antrópica.

Espécies de Lumbricidae e algumas espécies de Acanthodrilidae são encontradas principalmente nas regiões sul e sudeste do Brasil, onde o clima subtropical é mais adequado às suas atividades. Outras Acanthodrilidae (principalmente *Dichogaster* spp.), espécies da família Megascolecidae (*Amyntas* spp.) e *P. corethrurus* estão disseminadas por todo o Brasil e, às vezes, migram para ecossistemas nativos servindo como indicadores de perturbação do solo. No entanto, poucas espécies de minhocas foram estudadas com elevado grau de detalhamento, como as conhecidas *Amyntas* spp. e *P. corethrurus*. Resultados disponíveis na literatura indicam que a atividade destas espécies de minhocas pode ter efeitos tanto positivos como negativos sobre os solos, as plantas e a biota nativa, e que isto pode depender de características do local (solo, clima e tipo de vegetação) (BROWN et al., 2006).

Em suma, não há dúvidas de que a presença, a abundância e a diversidade de minhocas possam indicar o impacto causado por atividades antrópicas em ecossistemas agrícolas e naturais. No entanto, o uso das minhocas como indicadores ambientais continua restrito na América Latina, principalmente devido às limitações no conhecimento da biologia básica, da ecologia e taxonomia da maioria das espécies presentes em agroecossistemas latino-americanos (BROWN; DOMÍNGUEZ, 2010).

2.5 Métodos de extração de minhocas do solo

A metodologia para extração de minhocas do solo deve estar relacionada ao objetivo do trabalho. Segundo Brown e James (2007) o método de extração deve facilitar o trabalho de avaliação a ser realizado, no entanto, sem comprometer a representatividade dos resultados a serem obtidos.

Diferentes métodos de coleta podem ser empregados para a avaliação da densidade populacional e da biomassa de minhocas em ecossistemas, os quais são agrupados em físicos, comportamentais e indiretos. Os métodos físicos envolvem a remoção direta das minhocas do solo, o que pode ser feito através de triagem manual, lavagem e peneiramento de amostras de solo. Os métodos comportamentais incluem o uso de armadilhas instaladas na superfície do solo, de equipamentos que produzem pulsos elétricos ou de soluções irritantes. Os métodos indiretos envolvem a contagem de estruturas físicas criadas pelas minhocas na superfície do solo, tais como excrementos e galerias (BROWN; JAMES, 2007).

As particularidades de cada método resultam em vantagens e desvantagens quanto à sua aplicação. Os métodos frequentemente utilizados são a coleta manual, por ser o mais preciso e possibilitar tanto a coleta de casulos, quanto de indivíduos latentes, e o uso de soluções irritantes, por ser mais rápido e prático (RESSETTI, 2004).

O método de coleta manual, recomendado pelo Programa "Tropical Soil Biology and Fertility" (TSBF), corresponde à retirada de monólitos de solo de 25 × 25 cm de lado e 30 cm de profundidade (ANDERSON; INGRAM, 1993). No caso de avaliações qualitativas de minhocas em locais onde há suspeita da presença de espécies endogêicas, as dimensões do monólito de solo podem variar. Segundo Baretta et al. (2007), o uso de monólitos de grandes dimensões (40 x 40 cm) é mais eficiente para a coleta de espécies dessa categoria de minhocas, como as do gênero *Glossoscolex*.

A extração de minhocas por soluções químicas envolve a adição de uma solução irritante em uma área pré-definida, com posterior coleta das minhocas que emergem à superfície em um determinado período de tempo (ZABORSKI, 2003). Dentre os extratores químicos irritantes que podem ser utilizados estão soluções à

base de formaldeído, alil isotiocianato, detergente, permanganato de potássio, vinagre e pó de mostarda (BROWN; JAMES, 2007).

Para a realização de estudos sobre diversidade de minhocas, a amostragem com base na instalação de armadilhas do tipo “pitfall” (BIGNELL et al., 2010) é um método pouco preciso, pois possibilita apenas a captura de espécies ativas que vivem na superfície do solo (BROWN; JAMES, 2007). O uso de equipamentos que produzem campo elétrico a partir da introdução de eletrodos no solo é uma alternativa válida para capturar minhocas. No entanto, sua eficiência é dependente das condições de umidade do solo, além do equipamento ter elevado valor monetário, exigir manutenção e cuidados por parte do operador para evitar acidentes (RÖMBKE, 2007).

Devido à baixa eficiência, o uso de métodos indiretos para avaliar a população de minhocas é pouco recomendado, embora sejam válidos para estudos sobre os efeitos da atividade de minhocas nas propriedades e processos edáficos (BROWN; JAMES, 2007). As principais vantagens e desvantagens das metodologias baseadas na coleta manual, no uso de soluções irritantes e de campo elétrico estão descritas na figura 2.3.

Um dos extratores químicos de minhocas mais utilizado é a solução de formaldeído (0,5%), considerada padrão (ISO 23611-1, 2002). No entanto, por ser fitotóxico e carcinogênico, representando riscos ao ambiente e ao pesquisador, a legislação poderá impedir o uso do formaldeído como extrator (SCHMIDT et al., 2001). Neste sentido, devido às inúmeras vantagens do método químico de extração de minhocas, é fundamental que novas soluções irritantes atóxicas sejam testadas, visando facilitar a avaliação da diversidade destes organismos nos ecossistemas, sem oferecer riscos ao ambiente e à saúde dos pesquisadores.

Para realização de amostragem precisa e segura das espécies de minhocas que habitam determinado ambiente, recomenda-se a combinação de dois métodos de amostragem. Primeiramente, pode ser realizada a coleta de um monólito de solo (25 x 25 x 25 cm) com posterior triagem manual das espécies presentes. Em seguida, pode ser aplicada uma solução irritante à base de formaldeído sobre a área escavada, possibilitando a coleta de espécies anécicas, que habitam profundidades superiores a 25 cm (RÖMBKE, 2007).

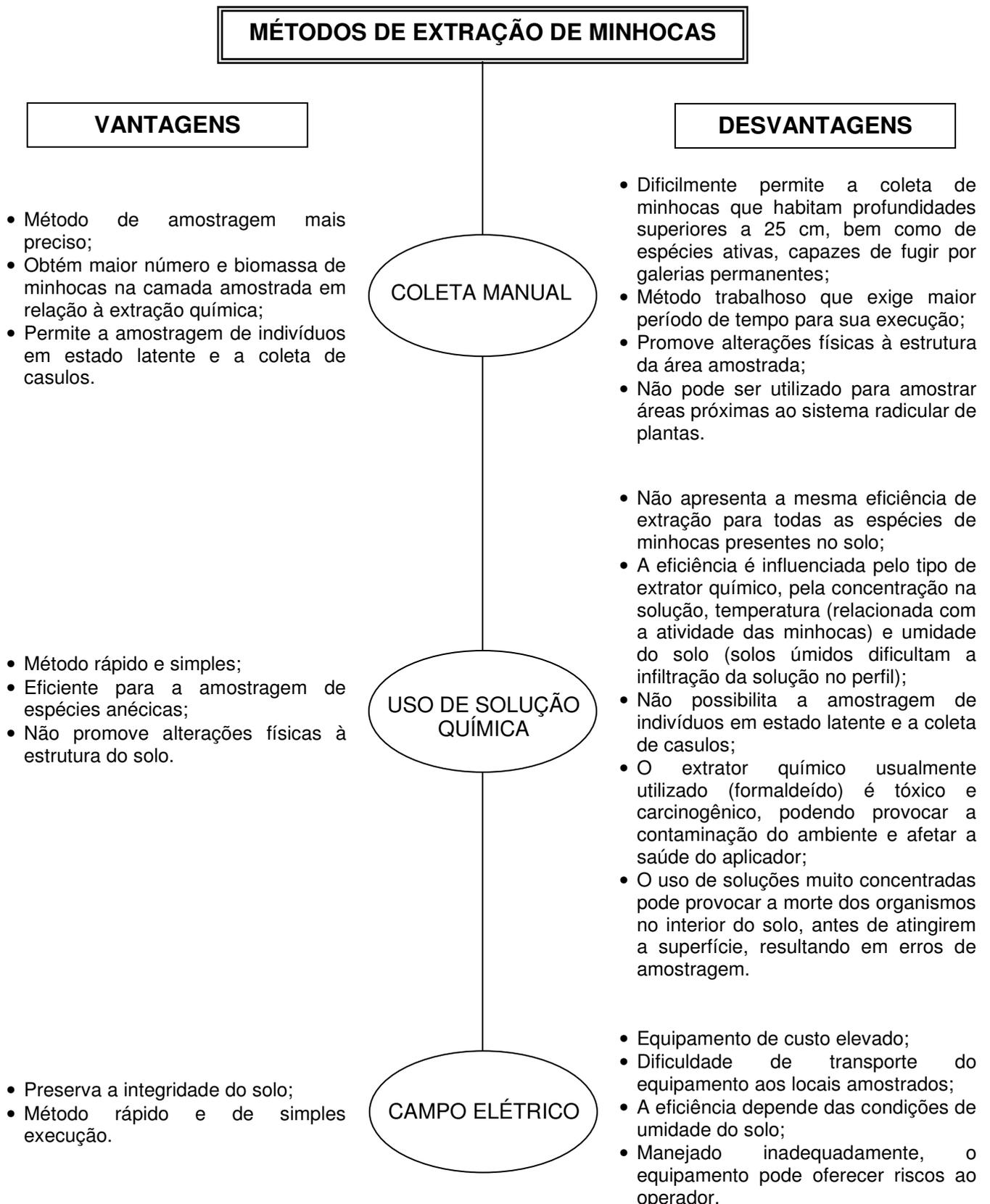


Figura 2.3 – Vantagens e desvantagens de alguns métodos de extração de minhocas do solo.

Cabe ressaltar ainda que, independentemente do método utilizado para avaliação da comunidade de minhocas, é importante considerar alguns parâmetros, tais como: tamanho e número de amostras, características do local, tempo de amostragem e condições ambientais. O número e o tamanho das amostras devem ser suficientemente grande para garantir a avaliação segura e precisa da população de minhocas do local avaliado. A distância entre as amostras deve ser respeitada para evitar interferências. A distribuição das amostras na área deve considerar as características físicas e biológicas do ambiente, tais como tamanho da parcela, diferenças de vegetação e tipo de solo (BROWN; JAMES, 2007). Além disso, é fundamental considerar o tempo disponível para a realização da amostragem, bem como os materiais necessários, a disponibilidade de recursos e de mão-de-obra (BROWN; JAMES, 2007).

Ao comparar o uso de métodos comportamentais (formol 0,5% e eletricidade) e da coleta manual para extração de minhocas em diferentes ecossistemas (fragmento de mata secundária, margem de um pântano, área agrícola de cultivo anual e pastagem), Azevedo et al. (2010) observaram que alguns fatores ambientais e comportamentais das espécies presentes influenciaram a eficiência dos diferentes métodos utilizados: a) composição específica da comunidade de minhocas; b) diferenças na reação de indivíduos adultos e juvenis; c) tipo de cobertura vegetal estabelecida no local; d) condições edáficas, especialmente o teor de umidade; e) hábito/categoria ecológica das espécies de minhocas presentes no local. Neste sentido, para que a avaliação da comunidade de minhocas presente em uma determinada área seja realizada corretamente, Azevedo et al. (2010) sugerem que a escolha dos métodos de coleta deve ser realizada com base nas condições de cada local a ser amostrado.

2.7 Caracterização e identificação de espécies

A caracterização e identificação das espécies de minhocas usualmente é realizada com base nos caracteres externos e internos dos exemplares coletados, a qual é denominada caracterização morfológica. Os estudos anátomo-taxonômicos

são realizados em exemplares previamente fixados em formol (4 a 10%) ou em etanol (100%), os quais são mergulhados em água, em cubas para dissecação, onde são presos com alfinetes entomológicos (RIGHI, 1990).

As observações gerais são realizadas com auxílio de microscópio estereoscópio (lupa) e as mais detalhadas necessitam de um microscópio óptico comum. Os trabalhos taxonômicos exigem o conhecimento dos caracteres externos (cor, forma, comprimento, diâmetro, segmentos, forma do prostômio e do clitelo, sulcos intersegmentares, forma e localização das cerdas, tipos de poros, marcas genitais, traves pubertais, sulcos seminais, papilas e zona caudal) e internos (septos, moela, esôfago, glândulas calcíferas, intestino, cecos intestinais, tiflosole, nefrídios, sistema circulatório, testículos, funis seminais, sacos testiculares, vesículas seminais, canais deferentes, próstatas, câmaras copulatórias, ovários, ovisacos, funis ovulares, espermatecas e glândulas das marcas pubertais) (RIGHI, 1990).

Pode-se perceber que a taxonomia de minhocas é trabalhosa e baseia-se em toda sua anatomia, sendo que a descrição de uma espécie constitui-se em pequena monografia anatômica, como assinalou Pickford (1947) citado por Righi (1990). Devido à dificuldade e à grande demanda de tempo para identificar os exemplares, aliada ao reduzido número de pesquisadores e taxonomistas de oligoquetas ativos no mundo inteiro, novas ferramentas surgiram com o intuito de facilitar a identificação das espécies de minhocas, como é o caso das técnicas moleculares.

As avaliações moleculares surgiram como ferramenta auxiliar nos estudos de taxonomia de oligoquetas, facilitando e acelerando o processo de identificação das espécies. A filogenética molecular é uma das mais ativas áreas de pesquisa em biologia evolutiva e tem grande ligação com a genética da conservação. É uma ciência aplicada que possibilita a descrição da composição genética e genômica de populações (SIQUEIRA et al., 2010). A maioria dos estudos moleculares desenvolvidos em minhocas é de filogenia e se baseia no sequenciamento de genes de regiões conservadas e variáveis do DNA, tais como: 5.8S, 18S, 28S, 12S, 16S rRNA (BEAUCHAMP et al., 2001; JAMIESON et al., 2002; POP et al., 2007; CHANG et al., 2008; KLARICA et al., 2012), subunidades I e II da citocromo c oxidase (COI) (POP et al., 2003; KLARICA et al., 2012), citocromo B (BLEIDORN et al., 2006), subunidade I de NADH desidrogenase (CHANG et al., 2008), genes do

desenvolvimento (Hox e ParaHox) (FRÖBIUS; SEEVER, 2006) e fator de alongamento I alfa (KOJIMA, 1998).

Neste sentido, tem sido intensificado o uso de ferramentas moleculares em estudos sobre diversidade de minhocas, visando aproximar a caracterização morfológica da caracterização molecular e, assim, produzir conhecimentos sólidos e consistentes sobre a população de minhocas presente nos mais diversos agroecossistemas do planeta Terra.

2.8 Referências bibliográficas

ADDISON, J. A. Distribution and impacts of invasive earthworms in Canadian forest ecosystems. **Biological Invasions**, Knoxville, v. 11, n. 1, p. 59-79, Jan. 2009.

ANDERSON, J. M.; INGRAM, J. S. I. **Tropical Soil Biology and Fertility: a handbook of methods**, 2nd ed. Wallingford: CAB International. 1993. 221p.

ARAUJO, M. A. R. **Unidades de Conservação no Brasil: da república à gestão de classe mundial**. Belo Horizonte: SEGRAC, 2007. 272p.

AZEVEDO, P. T. M. et al. Populações de minhocas amostradas por diferentes métodos de coleta (elétrico, químico e manual) em ecossistemas da região de Londrina, Paraná, Brasil. **Acta Zoológica Mexicana** (n.s.), Xalapa, v. 26, Número Especial 2, p. 79-93, Oct. 2010.

BARETTA, D. et al. Earthworm populations sampled using collection methods in atlantic forests with *Araucaria angustifolia*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, n. 4, p. 384-392, July/Aug. 2007.

BAROIS, I. et al. Ecology of species with large environmental tolerance and/or extended distributions. In: LAVELLE, P.; BRUSSAARD, L.; HENDRIX, P. F. (Ed.). **Earthworm management in tropical agroecosystems**. Wallingford: CAB International, 1999. p. 57-85.

BARROS, M. E. et al. The role of macrofauna in the transformation and reversibility of soil structure of an oxisol in the process of forest to pasture conversion. **Geoderma**, Tucson, v. 100, n. 1-2, p. 193-213, Mar. 2001.

BARTZ, M. L. C. **Ocorrência e taxonomia de minhocas em agroecossistemas no Paraná, Brasil**. 2011. 175f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

BEARE, M. H. et al. A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. **Plant and Soil**, Hague, v. 170, n. 1, p. 5-22, Mar. 1995.

BEAUCHAMP, K. A. et al. Molecular phylogeny of the tubificid oligochaetes with special emphasis on *Tubifex tubifex* (Tubificidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Detroit, v. 19, n. 2, p. 216-224, May 2001.

BIGNELL, D. E. et al. Macrofauna. In: MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J.; BIGNELL, D. E. (Ed.). **Manual de biologia dos solos tropicais**: Amostragem e caracterização da biodiversidade. Lavras: UFLA, 2010. 368p.

BLANCHART, E. et al. Effects of earthworms on soil structure and physical properties. In: LAVELLE, P.; BRUSSAARD, L.; HENDRIX, P. (Ed.). **Earthworm management in tropical agroecosystems**. New York: CAB International, 1999. p. 149-172.

BLEIDORN, C.; PODSIADLOWSKY, L.; BARTOLOMAEUS, T. The complete mitochondrial genome of the orbiniid polychate *Orbinia latreillii* (Annelida: Orbiniidae) – A novel gene order for Annelida and implications for annelid phylogeny. **Gene**, Worcester, v. 370, p. 96-103, Mar. 2006.

BOUCHÉ, M. B. Strategies lombriciennes. In: LOHM, U.; PERSSON, T. (Eds.). **Soil organisms as components of ecosystems**. Ecological Bulletins, Stockholm, v. 25, p. 122-123, 1977.

BOUCHÉ, M. B. The establishment of earthworm communities. In: SATCHELL, J. E. (Ed.). **Earthworm ecology**: from Darwin to vermiculture. London: Chapman and Hall, 1983. p. 431-448.

BRITO-VEGA, H.; ESPINOSA-VICTORIA, D. Bacterial diversity in the digestive tract of earthworms (Oligochaeta). **Journal of Biological Sciences**, Turkey, v. 9, n. 3, p. 192-199, 2009.

BROWN, G. G.; EDWARDS, C. A.; BRUSSAARD, L. How earthworms affect plant growth: burrowing into the mechanisms. In: EDWARDS, C. A. (Ed.). **Earthworm ecology**. Boca Raton: CRC Press, 2004. p. 13-49.

BROWN, G. G. et al. Exotic, peregrine, and invasive earthworms in Brazil: diversity, distribution, and effects on soils and plants. **Caribbean Journal of Science**, Puerto Rico, v. 42, n. 3, p. 339-358, Dec. 2006.

BROWN, G. G.; DOMÍNGUEZ, J. Uso das minhocas como bioindicadoras ambientais: princípios e práticas – o 3º Encontro Latino Americano de Ecologia e Taxonomia de Oligoquetas (ELAETAO3). **Acta Zoológica Mexicana** (n.s.), Xalapa, v. 26, Número Especial 2, p. 1-18, Oct. 2010.

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.

CALLAHAM, M. A. et al. Policy and management responses to earthworm invasions in North America. **Biological Invasions Belowground: Earthworms as Invasive Species**, Georgia, v. 8, n. 6, p. 117-129, Sept. 2006.

CAMERON, E. K.; BAYNE, E. M.; COLTMAN, D. W. Genetic structure of invasive earthworms **Dendrobaena octaedra** in the boreal forest of Alberta: insights into introduction mechanisms. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 17, n. 5, p. 1189-1197, Mar. 2008.

CHANG, C.-H.; LIN, S.-M.; CHEN, J.-H. Molecular systematics and phylogeography of the gigantic earthworms of the **Metaphire formosae** species group (Clitellata, Megascolecidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Detroit, v. 49, n. 3, p. 958-968, Dec. 2008.

CHAUVEL, A. et al. Pasture degradation by an Amazonian earthworm. **Nature**, London, v. 389, p. 32-33, 1999.

CLAPPERTON, M. J. et al. Earthworm populations as affected by long-term tillage practices in southern Alberta, Canada. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 3-4, p. 631-633, Mar.-Apr. 1997.

CURRY, J. P.; BYRNE, D.; SCHMIDT, O. Intensive cultivation can drastically reduce earthworm populations in arable land. **European Journal of Soil Biology**, Brawnschweig, v. 38, n. 2, p. 127-130, Apr.-June 2002.

DAVIDSON, D. A.; GRIEVE, I. C. Relationships between biodiversity and soil structure and function: evidence from laboratory and field experiments. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 33, n. 2, p. 176-185, Sept. 2006.

DELL' AGNOLA, G.; NARDI, S. On overview of earthworm activity in the soil. In: BONVICINI-PAGLIAI, A. M.; OMODEO, P. (Eds.). **On earthworms**. Modena: Mucchi Ed., 1987, p. 103-112.

DIDHAM, R. K. et al. Interactive effects of habitat modification and species invasion on native species decline. **Trends in Ecology & Evolution**, Vancouver, v. 22, n. 9, p. 489-496, Sept. 2007.

DOMÍNGUEZ, A.; BEDANO, J. C.; BECKER, A. R. Cambios en la comunidad de lombrices de tierra (Annelida: Lumbricina) como consecuencia del uso de la técnica de siembra directa en el centro-sur de Córdoba, Argentina. **Ciencia del Suelo**, Buenos Aires, v. 27, n.1, p. 11-19, enero/jun. 2009.

DOMÍNGUEZ, J. Influencia del vermicompost en el crecimiento de las plantas. Aportes para la elaboración de un concepto objetivo. **Acta Zoológica Mexicana** (n.s.), Xalapa, v. 26, Número Especial 2, p. 359-371, Oct. 2010.

EDWARDS, C. A.; BOHLEN, P. J. **Biology and ecology of earthworms**. 3rd Ed. Chapman & Hall, London, 1996. 426p.

FIUZA, S. da S.; KUSDRA, J. F.; FURTADO, D. T. Caracterização química e atividade microbiana de coprólitos de *Chibui bari* (Oligochaeta) e do solo adjacente. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 35, n. 3, p. 723-728, maio/jun. 2011.

FRAGOSO, C. et al. A survey of tropical earthworms: taxonomy, biogeography and environmental plasticity. In: LAVELLE, P.; BRUSSAARD, L.; HENDRIX, P. (Coord.) **Earthworm Management in Tropical Agroecosystems**. Oxon: CAB International, 1999. p. 01-25.

FRAGOSO, C.; BROWN, G. G.; FEIJOO, A. The influence of Gilberto Righi on tropical earthworm taxonomy: the value of a full-time taxonomist. **Pedobiologia**, Goettingen, v. 47, n. 5-6, p. 400-404, 2003.

FRÖBIUS, A. C.; SEAVER, E. C. ParaHox gene expression in the polychaete annelid *Capitella* sp. I. **Development Genes and Evolution**, Los Angeles, v. 216, n. 2, p. 81-88, Jan. 2006.

GILLER, K. E. et al. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 6, n. 1, p. 3-16, Aug. 1997.

GONZÁLEZ, G. et al. Earthworm invasions in the tropics. **Biological Invasions Belowground: Earthworms as Invasive Species**, Georgia, v. 8, n. 6, p. 1247-1256, Sept. 2006.

GUNDALE, M. J.; JOLLY, W. M.; DELUCA, T. H. Susceptibility of a Northern Hardwood Forest to exotic earthworm invasion. **Conservation Biology**, Davis, v. 19, n. 4, p. 1075-1083, Aug. 2005.

HENDRIX, P. F.; BOHLEN, P. J. Exotic earthworm invasions in North America: ecological and policy implications. **Biological Sciences**, California, v. 52, n. 9, p. 801–811, Sept. 2002.

HENDRIX, P. F. Biological invasions belowground: earthworms as invasive species. **Biological Invasions Belowground: Earthworms as Invasive Species**, Georgia, v. 8, n. 6, p. 1201-1204, Sept. 2006.

HENDRIX, P. F. et al. Invasion of exotic earthworms into ecosystems inhabited by native earthworms. **Biological Invasions**, Georgia, v. 8, n. 6, p. 1287-1300, Sept. 2006.

ISO/WD (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION) 23611-1. Soil Quality – sampling of soil invertebrates. Part 1: hand-sorting and formalin extraction of earthworms. Version 12. December, 2002. 18p.

JAMES, S. **Earthworms (Annelida: Oligochaeta) of the Columbia River basin assessment area**. General Technical Report PNW-GTR-491. Portland, Oregon, 2000. 13p.

JAMES, S. W.; BROWN, G. G. Earthworm ecology and diversity in Brasil. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (Eds.). **Soil Biodiversity in Amazonian and Other Brazilian Ecosystems**. CABI Publishing: Wallingford, 2006. p. 56-116.

JAMIESON, B. G. M. et al. Phylogeny of the Megascolecidae and Crassiclitellata (Annelida: Oligochaeta): combined versus partitioned analysis using nuclear (28S) and mitochondrial (12S, 16S) rDNA. **Zoosystema**, Paris, v. 24, n. 4, p. 707-734, Dec. 2002.

JOUQUET, P. et al. Soil invertebrates as ecosystem engineers: Intended and accidental effects on soil and feedback loops. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 32, n. 2, p. 153-164, Jun. 2006.

KENNETTE, D. et al. Uptake of trace metals by the earthworm *Lumbricus terrestris* L. in urban contaminated soils. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 19, p. 191–198, Feb. 2002.

KLARICA, J. et al. Comparing four mitochondrial genes in earthworms – Implications for identification, phylogenetics, and discovery of cryptic species. **Soil Biology and Biochemistry**, Brisbane, v. 45, p. 23-30, Feb. 2012.

KNÄPPER, C. F. U. Dominanzverhältnisse der verschiedenen arten der gattung Pheretima in kulturböden von Rio Grande do Sul. **Pedobiologia**, Berlin, v. 12, p. 23-25, 1972a.

KNÄPPER, C. F. U. Oligoquetas terrestres - uma moderna avaliação. **Publicação do Instituto André Voisin**, Porto Alegre, n. 1, p.11-19, 1972b.

KNÄPPER, C. F. U. Preliminar considerations on the occurrence of Oligochaetes in the Estuary of the Guaíba RS. **Estudos Leopoldenses**, São Leopoldo, v. 38, p. 39-41, 1976.

KNÄPPER, C. F. U. Ecological niches of *P. diffringens* (Baird, 1869) and *E. lucens* (Waga, 1857) at São Francisco de Paula. **Estudos Leopoldenses**, São Leopoldo, v. 42, p.194-196, 1977.

KNÄPPER, C. F. U. Velhos habitats de *P. corethrurus* (Fr. Müller, 1857). **Estudos Leopoldenses**, São Leopoldo, v.16, p. 39-50, 1979.

KNÄPPER, C. F. U.; HAUSER, J. Eine anomalie bei "*Allolobophora caliginosa*" (Savigny, 1826) (Oligochaeta). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 29, v. 411-412, 1969.

KNÄPPER, C. F. U.; PORTO, R. P. Ocorrência de Oligoquetas nos solos do Rio Grande do Sul. **Acta Biologica Leopoldensia**, São Leopoldo, v.1, p.137-166, 1979.

KOJIMA, S. Paraphyletic status of Polychaeta suggested by phylogenetic analysis based on the amino acid sequences of elongation factor-1 alpha. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Detroit, v. 9, n. 2, p. 255-261, Apr. 1998.

KRABBE, E. L. et al. Avaliação populacional de oligoquetas e características físicas do solo em diferentes sistemas de cultivo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 23, n. 1, p. 21-26, jan./abr., 1993.

LAFONT, A. et al. Effects of the earthworm *Pontoscolex corethrurus* on banana plants infected or not with the plant-parasitic nematode *Radopholus similis*. **Pedobiologia**, Berlin, v. 51, n. 4, p. 311-318, Oct. 2007.

LANDGRAF, M. D.; MESSIAS, R. A.; REZENDE, M. O. O. **A importância ambiental da vermicompostagem**: vantagens e aplicações. São Carlos: RiMa, 2005. 106p.

LAVELLE, P. The structure of earthworm communities. In: SATCHELL, J. E. (Ed.). **Earthworm ecology: from Darwin to vermiculture**. London: Chapman and Hall, 1983. p. 449-467.

LAVELLE, P. Earthworm activities and the soil system. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 6, n.3, p. 237-251, May 1988.

LAVELLE, P. Diversity of soil fauna and ecosystem function. **Biology International**, Paris, v. 33, p. 3-16, July 1996.

LAVELLE, P. Faunal activities and soil processes: adaptative strategies that determine ecosystem function. **Advanced in Ecological Research**, New York, v. 27, p. 93-132, 1997.

LAVELLE, P. et al. Soil function in a changing world: the role of invertebrate ecosystem engineers. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 33, n. 4, p. 159-193, 1997.

LAVELLE, P.; BRUSSAARD, L.; HENDRIX, P. **Earthworms management in tropical agroecosystems**. CABI International, Wallingford, UK, 1999, 320p.

LAVELLE, P.; SPAIN, A. V. **Soil ecology**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2001.

LAVELLE, P. et al. Soil invertebrates and ecosystem services. **European Journal of Soil Biology**, Braunschweig, v. 42, n. 1, p. 3-15, Nov. 2006.

LEE, K. E. **Earthworms: Their Ecology and Relationships with Soils and Land Use**. Sydney: Academic Press, 1985, 411p.

LEÓN, Y. S. de; JOHNSON-MAYNARD, J. Dominance of an invasive earthworm in native and non-native grassland ecosystems. **Biological Invasions**, Knoxville, v. 11, n. 6, p. 1393-1401, June 2009.

LIMA, A. C. R. de; BRUSSAARD, L. Earthworms as soil quality indicators: local and scientific knowledge in rice management systems. **Acta Zoológica Mexicana** (n.s.), Xalapa, v. 26, Número Especial 2, p. 109-116, Oct. 2010.

LIMA, A. C. R. de; RODRÍGUEZ, C. Earthworm diversity from Rio Grande do Sul, Brazil, with a new native Criodrillid genus and species (Oligochaeta: Criodrillidae). **Megadrilogica**, Canadá, v. 11, n. 2, p. 9- 18, 2007.

LUEDERWALDT, H. A coleção de minhocas (Oligochaeta) no Museu Paulista. **Revista do Museu Paulista**, São Paulo, v. 15, p. 545- 556, 1927.

MARTIIS, L. C. de. Gli Oligocheti della Regione Neotropicale, I. **Mem. Real. Acad. Sci.**, Torino, v. 2, p. 1-72, 1905.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160p.

McNEELY, J. A. et al. **A global strategy on invasive alien species**. Gland, Switzerland and Cambridge, UK, World Conservation Union (IUCN), 2001.

MERLIM, A. de O. et al. Soil macrofauna in cover crops of figs grown under organic manegement. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 62, n. 1, p. 57-61, Jan. 2005.

MICHAELSEN, J. W. Terricolen der Berliner Zoologischen Sammlung, II. **Archiv fur Naturgeschichte**, Berlin, v. 58, p. 209- 261, 1892.

MICHAELSEN, J. W. Die Oligochatenfauna Brasiliens. **Sonderabdruck Aus den Abhandlungen der Senckenbergischen Gesellschaft**, v. 40, p. 367-375, 1927.

MIGGE-KLEIAN, S.; McLEAN, M. A.; HENEGHAN, L. The influence of invasive earthworms on indigenous fauna in ecosystems previously uninhabited by earthworms. **Biological Invasions**, Knoxville, v. 8, n. 6, p. 1275-1285, Sept. 2006.

MOREIRA, C. Vermes oligochetos do Brasil. **Arch. Mus. Nac. Rio de Janeiro**, v. 12, p. 125-136, 1903.

MÜLLER, F. II-Description of a new species of earthworm (*Lumbricus corethrurus*). **Annals and Magazine of Natural History**, v. 20, p. 13-15, 1857.

NUNES, D. H. et al. Minhocas como bioindicadoras da qualidade ambiental. Um estudo de caso na região de Jaguapitã, PR, Brasil. In: BROWN, G. G.; FRAGOSO, C. (Eds.). **Minhocas na América Latina: Biodiversidade e ecologia**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. p. 467-480.

ODUM, E. P. **Fundamentos de Ecologia**. 7 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2004. 928p.

PACHECO, S. M. et al. Contribuição ao conhecimento da fauna de Oligochaeta das áreas de alagamento das unisas hidrelétricas de Itá-Machadinho (RS, SC) e Campos Novos (SC). *Com. Mus. Ciênc. PUCRS, Sér. Zool.*, Porto Alegre, v. 5, p. 23-28, 1992.

PAOLETTI, M. G. The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 74, n. 1-3, p. 137-155, June 1999.

POP, A. A.; WINK, M.; POP, V. V. Use of 18S, 16S rDNA and cytochrome c oxidase sequences in earthworm taxonomy (Oligochaeta, Lumbricidae). **Pedobiologia**, Berlin, v. 47, n. 5-6, p. 428-433, 2003.

POP, A. A. et al. Application of 16S, 18S rDNA and COI sequences in the molecular systematics of the earthworm family Lumbricidae (Annelida, Oligochaeta). **European Journal of Soil Biology**, Braunschweig, v. 43, s. 1, p. 43-52, Nov. 2007.

RESSETTI, R. R. **Determinação da dose de Alil isotiocianato em substituição à solução de formol na extração de oligochaeta edáficos**. 2004. 57f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de concentração Ciência do Solo) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

RESSETTI, R. R. Densidade populacional, biomassa e espécies de minhocas em ecossistemas de áreas urbanas. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 7, n. 1-2, p. 61-66, 2006.

REYNOLDS, J. W.; WETZEL, M. J. **Nomeclatura Oligochaetologica, supplementum quartum**. Champaign: Illinois Natural History Survey Special Publication, 2007 (no prelo). <http://www.inhs.uiuc.edu/~mjwetz/Nomen.Oligo.html>

RIGHI, G. Sobre algumas Lumbricidae (Oligochaeta) do Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência & Cultura**, São Paulo, v. 19, 342 p., 1967.

RIGHI, G. Sobre alguns Oligochaeta do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 28, p. 369-382, 1968.

RIGHI, G. Sobre a família Glossoscolecidae (Oligochaeta) no Brasil. **Arquivos de Zoologia**, São Paulo, v. 20, p. 1-96, 1971.

RIGHI, G. Notas sobre as Oligochaeta Glossoscolecidae do Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 34, p. 551-564, 1974.

RIGHI, G. Alguns Oligochaeta, Ocneroдрilidae e Glossoscolecidae do Brasil. **Papéis Avulsos de Zoologia**, São Paulo, v. 33, p. 239-246, 1980.

RIGHI, G. On a collection of Neotropical Megadrili Oligochaeta. I. Ocneroдрilidae, Acanthoдрilidae, Octochaetidae, Megascolecidae. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, Berlin, v. 19, n.1, p. 9-31, 1984a.

RIGHI, G. Oligochaeta Megadrili da Chapada do Guimarães, Mato Grosso. **Bol. Zool.**, São Paulo, v. 8, n. 17-23, 1984b.

RIGHI, G. **Minhocas de Mato Grosso e de Rondônia**. Brasília: SCT/PR-CNPq, 1990. Programa do Trópico Úmido, Programa Polonoeste, Relatório de Pesquisa n° 12. 157p.

RIGHI, G. Oligochaeta (Annelida) Diversidade e Agro-Ecologia. In: BRANDÃO, C. R. F.; CANCELLO, E. M. (Ed.). **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX**. 5. Invertebrados Terrestres. São Paulo: FAPESP, 1999. p. 13-21.

RIGHI, G.; AYRES, I. Alguns Oligochaeta sul brasileiros. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 35, p. 309-316, 1975.

RIGHI, G.; KNÄPPER, C. U. F. O gênero *Pheretima* Kinberg, no Estado de Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 25, p. 419-427, 1965.

RIGHI, G.; KNÄPPER, C. U. F. Ciclo anual de *Pheretima indica* (Horst, 1883) (Oligochaeta, Megascolecidae). **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 26, p. 341-343, 1966.

RÖMBKE, J. Searching for a standardization of quantitative terrestrial oligochaete sampling methods: The ISO methodology. In: BROWN, G. G.; FRAGOSO, C. (Ed.). **Minhocas na América Latina: Biodiversidade e ecologia**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. p. 497-505.

ROSSI, J. P. et al. Soil properties inside earthworm patches and gaps in a tropical grassland (la Mancha, Veracruz, Mexico). **European Journal of Soil Biology**, Braunschweig, v. 42, n. 1, p. 284-288, Nov. 2006.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**: uma abordagem funcional-evolutiva. 7ª ed. São Paulo: Roca, 2005. 1145p.

SCHIAVON, G. de A. et al. **Biodiversidade de Minhocas do Solo na Estação Experimental Cascata, Embrapa Clima Temperado**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento).

SCHIEDECK, G. et al. Percepção de agricultores sobre o papel das minhocas nos agroecossistemas. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 4, n. 2, p. 856-859, 2009a.

SCHIEDECK, G.; SCHIAVON, G. de A. ; SCHWENGBER, J. E. **Sanguessugas em minhocários**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009b. (Comunicado técnico).

SCHIEDECK, G. et al. Aspectos culturais associados às minhocas no Brasil. **Acta Zoológica Mexicana** (n.s.), Xalapa, v. 26, Número Especial 2, p. 19-33, Oct. 2010.

SCHMIDT, O. et al. Earthworm communities in conventional wheat monocropping and low-input wheat-clover intercropping systems. **Annals of Applied Biology**, Harpenden, v. 138, n. 3, p. 377-388, June 2001.

SIQUEIRA, F. de F. et al. Análise filogenética do minhocoçu *Rhinodrilus alatus*, Righi 1971 (Glossoscolecidae: Annelida) baseada em sequências dos genes de RDNA 5.8S, do espaço interno transcrito (ITS1) e da subunidade I da Citocromo C Oxidase mitocondrial. **Acta Zoológica Mexicana** (n.s.), Xalapa, v. 26, Número Especial 2, p. 59-77, Oct. 2010.

STEFFEN, G. P. K. et al. Casca de arroz e esterco bovino como substratos para a multiplicação de minhocas e produção de mudas de tomate e alface. **Acta Zoológica Mexicana** (n.s.), Xalapa, v. 26, Número Especial 2, p. 333-343, Oct. 2010.

STORK, N. E.; EGGLETON, P. Invertebrates as determinants and indicators of soil quality. **American Journal of Alternative Agriculture**, Greenbelt, v. 7, Special Issue 1-2, p. 38-47, June 1992.

SUTHAR, S. Earthworm communities a bioindicator of arable land management practices: A case study in semiarid region of India. **Ecological Indicators**, Olshausenstrasse, v. 9, n. 3, p. 588-594, May 2009.

SWIFT, M. J.; HEAL, O. W.; ANDERSON, J. M. **Decomposition in terrestrial ecosystems**. Berkeley. University of California Press, 1979. p. 66-117.

VELAZQUEZ, E.; LAVELLE, P.; ANDRADE, M. GISQ, a multifunctional indicator of soil quality. **Soil Biology & Biochemistry**, Brisbane, v. 39, n. 12, p. 3066-3080, Dec. 2007.

ZABORSKI, E. R. Allyl isothiocyanate: na alternative chemical expellant for sampling earthworms. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 22, n.1, p. 87-95, Jan. 2003.

ZICSI, A. A revision der gattung *Glossodrilus* Cognetti, 1905 auf grund der arten aus dem andengebiet (Oligochaeta: Glossoscolecidae). Regenwürmer aus Südamerika, 25. **Opuscula Zoologica**, Budapest, v. 27-28, p. 79-116, 1995.

ZICSI, A.; RÖMBKE, J.; GARCIA, M. V. Regenwürmer (Oligochaeta) aus der Umgebung von Manaus (Amazonien). Regenwürmer aus Südamerika 32. **Revue Suisse de Zoologie**, Genève, v. 108, p. 153-164, 2001.

3 CAPÍTULO I – LEVANTAMENTO DA DIVERSIDADE DE MINHOCAS EM TRÊS REGIÕES DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

3.1 Resumo

O conhecimento da diversidade de minhocas no Estado do Rio Grande do Sul (RS) é limitado. O objetivo deste estudo foi determinar a diversidade de minhocas em diferentes ecossistemas do RS, priorizando regiões do Estado que ainda não haviam sido avaliadas. Foram amostrados 15 tipos de ecossistemas em 29 municípios do RS, totalizando 77 locais de amostragem. As avaliações foram qualitativas, através da retirada de monólitos de solo e triagem manual. A identificação das espécies foi realizada com base em parâmetros morfológicos e, para alguns exemplares, através de análises moleculares. Para cada ecossistema avaliado foram calculados a riqueza de espécies e o índice de McIntosh (U). Foram observadas diferenças na riqueza de espécies dos ecossistemas avaliados, sendo que as áreas com menor grau de perturbação (fragmento de mata nativa e campo nativo) apresentaram maior riqueza. Vinte e uma espécies de minhocas foram identificadas, pertencentes às famílias Glossoscolecidae (10), Ocnerodrilidae (4), Megascolecidae (4), Acanthodrilidae (1), Lumbricidae (1) e Criodrilidae (1). Destas, dez corresponderam a novos registros, sendo seis do gênero *Glossoscolex*, uma do gênero *Fimoscolex*, uma do gênero *Kerriona*, uma do gênero *Eukerria* e uma nova espécie da família Criodrilidae, de hábito aquático, com possibilidade de se tornar um novo gênero de oligoquetas. Observou-se que a maioria das espécies nativas (*Urobenus brasiliensis* Benham (1887), *Fimoscolex* n. sp. 1 e *Glossoscolex* sp.) predomina em ecossistemas pouco alterados pelo homem, enquanto que as espécies exóticas (*Amyntas gracilis* Kinberg (1867), *Amyntas rodericensis* Grube (1879), *Metaphire californica* Kinberg (1867), *Aporrectodea trapezoides* Dugès (1828)) e peregrina (*Pontoscolex corethrurus* Müller (1857)) predominam em áreas com maior antropização.

Palavras-chave: Oligoquetas; diversidade; taxonomia.

3.2 Introdução

As minhocas estão presentes em quase todos os ecossistemas terrestres e representam um dos mais importantes componentes da macrofauna invertebrada do solo. No mundo, cerca de 8.300 espécies de oligoquetas já foram descritas em 38 famílias e 811 gêneros (REYNOLDS; WETZEL, 2009), embora seja estimada a existência de um número ainda maior de espécies (FRAGOSO et al., 2003). Estima-se que mais de 3.000 espécies podem ocorrer na região neotropical (BROWN; JAMES, 2007). Entretanto, apenas 960 são conhecidas atualmente (FRAGOSO; BROWN, 2007).

Até o ano de 2010, havia registro de 305 espécies/subespécies de minhocas (Megadrili) no Brasil, agrupadas em 65 gêneros (BROWN; JAMES, 2007), das quais 259 são nativas (85%) e 46 são exóticas (15%). Em 2011, nove novas espécies brasileiras foram descritas, as quais foram coletadas em diferentes sistemas de uso do solo no Estado do Paraná (BARTZ, 2011). No entanto, supõe-se que ainda exista grande número de espécies de minhocas a serem descobertas no Brasil, porque somente em poucas regiões foi avaliada a diversidade de oligoquetas, além do país possuir grande território e diversidade de climas e solos favoráveis ao estabelecimento destes organismos. Se as estimativas referentes à biodiversidade de minhocas estiverem corretas, a maioria das espécies presentes no Brasil ainda não foi encontrada e descrita (BROWN; JAMES, 2007), representando um grande desafio para os pesquisadores de oligoquetas.

As famílias mais diversificadas no Brasil são a Glossoscolecidae (Michaelsen, 1900), com 201 espécies/subespécies (todas nativas) agrupadas em 24 gêneros, a Ocnerodrilidae (Beddard, 1891), com 46 espécies (39 nativas) agrupadas em 15 gêneros e a Acanthodrilidae (Claus, 1880), com 24 espécies (12 nativas) agrupadas em sete gêneros. As demais famílias menos expressivas são Lumbricidae (13 espécies), Megascolecidae (11 espécies), Almidae e Criodrilidae (7 espécies), Eudrilidae (2 espécies) e Sparganophilidae (1 espécie). Dentro da família Glossoscolecidae, os gêneros que apresentam maior diversidade de espécies são *Glossoscolex* (54 espécies/subespécies), *Rhinodrilus* (31 espécies/subespécies) e *Righiodrilus* (21 espécies/subespécies) (BROWN; JAMES, 2007).

O Rio Grande do Sul (RS) é um Estado que apresenta condições para abrigar uma diversa comunidade de minhocas. Possui área de 281.748,5 km² e clima subtropical. O relevo é caracterizado por planaltos a oeste e nordeste, depressão na área central e planície litorânea com restinga e areia. A vegetação é composta por campo (campanha gaúcha) a sul e oeste, floresta tropical a leste, matas de araucárias a norte e por mangues no litoral (PORTAL BRASIL, 2012).

Poucos pesquisadores realizaram levantamentos no Estado do RS, o que resultou em reduzido conhecimento sobre a real diversidade de minhocas em ecossistemas gaúchos. Aliado a isso, as pesquisas realizadas no RS priorizaram a amostragem em localidades próximas a Porto Alegre, em áreas perturbadas (BROWN; JAMES, 2007). De acordo com Brown et al. (2006) e James e Brown (2006), há o registro da ocorrência de 44 espécies de minhocas no RS, as quais estão distribuídas nas Famílias Glossoscolecidae (11), Lumbricidae (12), Megascolecidae (8), Acanthodrilidae (7), Ocnerodrilidae (4) e Criodrilidae (2) (Tabela 2.2, Revisão bibliográfica).

Considerando a estimativa de grande diversidade de minhocas no Brasil e a reduzida disponibilidade de informações em determinadas regiões, é necessário e justificável a realização de outros estudos para avaliar adequadamente a diversidade e distribuição de minhocas nativas e exóticas no Brasil. Além disso, esses estudos podem ser úteis para prever o potencial de impactos ambientais, positivos ou negativos, que a colonização de espécies exóticas podem acarretar em novos ambientes (BROWN et al., 2006). A hipótese do trabalho foi que o Estado do Rio Grande do Sul apresenta diversidade de espécies de minhocas superior à conhecida atualmente. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar a diversidade de minhocas em diferentes ecossistemas do Estado do Rio Grande do Sul.

3.3 Material e métodos

3.3.1 Locais amostrados

Minhocas foram coletadas em diferentes ecossistemas das regiões noroeste, central e sudoeste do Estado do Rio Grande do Sul (RS), através de levantamento qualitativo. Foram amostrados 15 ecossistemas: fragmento de mata nativa⁷ (17), campo nativo (13), cultivos anuais (8) mata ciliar (7), pastagem cultivada (6), monocultivos de eucalipto (12), pinus (3) e acácia negra (2), várzea em pousio (2), beira de córrego (2), banhado (1), pomar de citros (1), gramado residencial (1), locais para deposição de resíduos domésticos (1) e dejetos animais (1), totalizando 77 locais amostrados distribuídos em 29 municípios do Estado do RS (Figura 3.1).



Figura 3.1 – Localização dos municípios gaúchos onde foram realizadas amostragens qualitativas da ocorrência de minhocas em diferentes ecossistemas.

⁷ Entende-se por fragmento florestal toda área de vegetação natural, interrompida por barreiras antrópicas (estradas, pastagens, culturas agrícolas, moradias, etc.) ou naturais (rios, montanhas, etc.), capazes de reduzir, significativamente, o fluxo de animais, pólen ou sementes (VIANA, 1990). São considerados fragmentos florestais pequenos aqueles menores do que 10 ha e grandes, aqueles com dimensões superiores a 40 ha (VIANA; PINHEIRO, 1998).

As regiões amostradas neste estudo (bioma Campos Sulinos e Pampas) representam locais de coleta considerados prioritários por Brown e James (2007) para a ampliação do conhecimento sobre diversidade de espécies nativas dentro dos principais biomas do Brasil.

3.3.2 Coleta dos indivíduos

Para conhecer a diversidade de minhocas existente em cada uma das áreas avaliadas, realizou-se amostragem qualitativa através da abertura de buracos aleatórios (mínimo de dez por ecossistema). A profundidade da amostragem variou entre 30 a 50 cm, dependendo da categoria ecológica das espécies de minhocas presentes. A triagem do solo foi realizada no campo e as minhocas coletadas foram imediatamente armazenadas em etanol 70%.

As coletas foram realizadas no período de setembro de 2009 a outubro de 2012. No laboratório, as minhocas armazenadas em etanol 70% foram transferidas para frascos contendo solução de formaldeído a 4% (TALAVERA, 1987), sendo que um exemplar de cada ponto amostrado foi fixado em etanol 100% para possibilitar a realização de avaliações moleculares. A identificação morfológica das espécies⁸ foi realizada através do uso de chaves de identificação e descrição de famílias, gêneros e espécies de acordo com Righi (1990, 1995) e Blakemore (2002).

Foram consideradas as designações nativa, exótica, invasora e nativa peregrina (BROWN et al., 2006) para classificar as espécies de minhocas de acordo com seu local de origem. Espécies nativas são aquelas nativas do Brasil e exóticas são aquelas nativas de outros países. Foram consideradas invasoras as espécies exóticas que colonizaram ambientes diferentes do seu habitat de origem e designadas nativas peregrinas aquelas espécies nativas que possuem alto potencial de disseminação, tal como a *Pontoscolex corethrurus*.

Alguns exemplares de minhocas coletados, cuja identificação taxonômica ao nível de espécie não foi possível através da análise morfológica, foram submetidos a análises moleculares (Capítulo 3).

⁸ Dúvidas taxonômicas foram atendidas pelos especialistas Samuel Wooster James (University of Iowa, Estados Unidos) e Marie Luise Carolina Bartz (Universidade do Estado de Santa Catarina).

3.3.3 Análise dos dados

A riqueza de grupos foi definida pelo número de espécies identificadas em cada ecossistema avaliado. O índice de McIntosh (U), o qual expressa a dominância de determinado grupo taxonômico dentro de uma comunidade, foi calculado segundo metodologia descrita por Pinto-Coelho (2000), com auxílio do software BIO-DAP (THOMAS; CLAY, 1988).

Os valores obtidos pelo cálculo do índice de McIntosh foram comparados quanto à significância pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Utilizou-se o software SISVAR (FERREIRA, 2000).

O estudo da relação entre a distribuição das espécies e os diferentes ecossistemas foi realizado por meio de uma ordenação gerada pela análise de componentes principais (DCA), utilizando-se o software CANOCO Versão 4.0 (TER BRAAK; SMILAUER, 1998).

Após análise de discriminação canônica (DCA), optou-se por fazer análise de componentes principais (PCA), porque o comprimento de onda do gradiente foi menor do que 3.

3.4 Resultados e discussão

Foram encontradas vinte e uma espécies de oligoquetas, as quais foram agrupadas em 11 gêneros conhecidos e um gênero desconhecido (família Criodrilidae), e em seis famílias: Acanthodrilidae, Criodrilidae, Glossoscolecidae, Lumbricidae, Megascolecidae e Ocnerodrilidae. Dentre os exemplares coletados, foram encontradas dez espécies novas pertencentes aos gêneros: *Glossoscolex* (6), *Fimoscolex* (1), *Kerriona* (1), *Eukerria* (1) e uma espécie de hábito aquático ainda não identificada, pertencente à família Criodrilidae, que possivelmente corresponda a um novo gênero (Tabela 3.1).

Novas espécies de minhocas foram encontradas em sistemas de cultivo do solo que visam a diminuição da perturbação mecânica (várzea em pousio, áreas de banhado, campo nativo) e a manutenção dos resíduos vegetais sobre o solo (monocultivos florestais) (Tabela 3.1), fatores que contribuem significativamente para a sobrevivência dos organismos edáficos.

As novas espécies do gênero *Glossoscolex* coletadas neste trabalho estão descritas no capítulo 4. As descrições foram realizadas pelos taxonomistas Marie Luise Carolina Bartz e Samuel Wooster James.

Glossoscolecidae é a família de oligoquetas mais diversificada do Brasil e da América Latina, cuja ocorrência é verificada na América Central e América do Sul, desde a Guatemala até o norte da Argentina (RIGHI, 1990; BROWN; JAMES, 2007). Na América do Sul, há o registro da presença de 429 espécies de minhocas desta família (CHRISTOFFERSEN, 2010).

Dentre os pontos amostrados no presente trabalho, o maior número de espécies encontradas (10) pertence à família Glossoscolecidae, sendo que a maioria delas (7 espécies) corresponde ao gênero *Glossoscolex* (7). As minhocas do gênero nativo *Glossoscolex* foram encontradas em áreas com baixo nível de perturbação, como fragmento de mata nativa, campo nativo, mata ciliar e pastagem cultivada. Seis novas espécies deste gênero foram encontradas, sendo que três estavam presentes em áreas de campo nativo (Tabela 3.1).

(continua)

Tabela 3.1 - Diversidade de minhocas exóticas (EX), invasoras (IN), nativas peregrinas (NP) ou nativas (N) em ecossistemas de diferentes municípios do Rio Grande do Sul.

| Identificação | Classificação | Ecossistema | Município |
|--|---------------|---|--|
| Família Acanthodrilidae | | | |
| <i>Microscolex dubius</i> (Fletcher, 1887) | EX | Mata nativa Monocultivo de eucalipto | Barra do Quaraí (Parque Estadual do Espinilho ^a) Itaqui |
| Família Criodrilidae | | | |
| Nova espécie | N | Banhado | Santo Cristo |
| Família Glossoscolecidae | | | |
| <i>Fimoscolex</i> n. sp. 1 | N | Fragmento de mata nativa | Maçambará |
| <i>Glossoscolex</i> sp. (Leuckart, 1835) | N | Campo nativo | Santa Maria |
| | | Fragmento de mata nativa | Caçapava do Sul, Itaara, Rosário do Sul |
| | | Lavoura de aveia | Tupanciretã |
| | | Monocultivo de pinus | Caçapava do Sul |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 1 | N | Pastagem cultivada | Itaara |
| | | Fragmento de mata nativa | Rosário do Sul |
| | | Monocultivo de acácia negra | Rosário do Sul |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 2 | N | Monocultivo de eucalipto | São Vicente do Sul |
| | | Campo nativo | Uruguaiana |
| | | Gramado residencial | Santa Maria |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 3 | N | Pastagem cultivada | Itaara, Santa Maria |
| | | Campo nativo | Caçapava do Sul |

(continuação)

Tabela 3.1 – Diversidade de minhocas exóticas (EX), invasoras (IN), nativas peregrinas (NP) ou nativas (N) em ecossistemas de diferentes municípios do Rio Grande do Sul.

| Identificação | Classificação | Ecossistema | Município |
|--|---------------|--------------------------|--|
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 4 | N | Pastagem cultivada | Santa Maria |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 5 | N | Fragmento de mata nativa | Santa Maria |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 6 | N | Campo nativo | Santana do Livramento |
| <i>Glossoscolex uruguayensis uruguayensis</i> (Cordero, 1943) | N | Mata ciliar | Jaguari |
| <i>Pontoscolex corethrurus</i> (Müller, 1857) | NP, IN | Beira de córrego | Santo Cristo |
| | | Campo nativo | Alegrete, Santo Cristo, São Francisco de Assis |
| | | Fragmento de mata nativa | Santa Maria |
| | | Lavoura de aveia | Tupanciretã |
| | | Lavoura de milho | Jaguari |
| | | Lavoura de soja | Júlio de Castilhos |
| | | Mata ciliar | Caçapava do Sul |
| | | Monocultivo de eucalipto | Cacequi, Jaguari |
| <i>Urobenus brasiliensis</i> (Benham, 1887) | N | Monocultivo de pinus | Jaguari |
| | | Campo nativo | Caçapava do Sul |
| | | Fragmento de mata nativa | Itaara, Santo Cristo |
| | | Mata nativa | Barra do Quaraí (Parque Estadual do Espinilho ^a) |
| | | Monocultivo de eucalipto | Dilermando de Aguiar, Caçapava do Sul |

(continuação)

Tabela 3.1 – Diversidade de minhocas exóticas (EX), invasoras (IN), nativas peregrinas (NP) ou nativas (N) em ecossistemas de diferentes municípios do Rio Grande do Sul.

| Identificação | Classificação | Ecossistema | Município |
|--|---------------|--|--|
| Juvenis de Glossoscolecidae | N | Campo nativo | Nova Esperança do Sul |
| | | Fragmento de mata nativa | Caçapava do Sul, Jaguari, Maçambará |
| | | Monocultivo de acácia negra | Rosário do Sul |
| | | Monocultivo de eucalipto | Dilermando de Aguiar, Vila Nova do Sul |
| Família Megascolecidae | | | |
| <i>Amyntas gracilis</i> (Kinberg, 1867) = <i>Amyntas hawayanus</i> (Rosa, 1891) = <i>Pheretima hawayana</i> (Rosa, 1891) | EX | Campo nativo | Santa Maria, Santiago, Roque Gonzales |
| | | Esterqueira ^b | Santo Cristo |
| | | Beira de córrego | Santo cristo |
| | | Fragmento de mata nativa | Santa Maria, Santiago |
| | | Lavoura de aveia | Tupanciretã |
| | | Lavoura de milho | Santo Cristo |
| | | Lavoura de soja | Júlio de Castilhos, Santa Rosa |
| | | Local deposição de resíduos domésticos | Roque Gonzales |
| | | Mata ciliar | São Vicente do Sul |
| | | Monocultivo de eucalipto | Alegrete, Bagé, Caçapava do Sul, Hulha Negra, São Sepé, São Vicente do Sul |
| <i>Amyntas rodericensis</i> (Grube, 1879) | EX | Monocultivo de pinus | Jaguari |
| | | Pastagem cultivada | Santo Cristo |
| | | Pomar de citros | Santa Maria |
| | | Monocultivo de pinus | Caçapava do Sul |

(conclusão)

Tabela 3.1 – Diversidade de minhocas exóticas (EX), invasoras (IN), nativas peregrinas (NP) ou nativas (N) em ecossistemas de diferentes municípios do Rio Grande do Sul.

| Identificação | Classificação | Ecossistema | Município |
|---|---------------|---|--|
| <i>Amyntas corticis</i> (Kinberg, 1867) | EX | Campo nativo | Roque Gonzales |
| = <i>Amyntas diffringens</i> (Baird, 1869) | | Mata ciliar | Jaguari |
| = <i>Pheretima diffringens</i> (Baird, 1869) | | Fragmento de mata nativa | Santo Cristo |
| | | Pastagem cultivada | Formigueiro, Santiago |
| <i>Metaphire californica</i> (Kinberg, 1867) | EX | Fragmento de mata nativa | Santa Maria |
| = <i>Pheretima californica</i> (Michaelsen, 1900) | | Mata ciliar | Jaguari |
| Família Lumbricidae | | | |
| <i>Aporrectodea trapezoides</i> (Dugès, 1828) | EX | Monocultivo de pinus | São Gabriel |
| Família Ocnerodrilidae | | | |
| <i>Eukerria saltensis</i> (Beddard, 1895) | EX | Lavoura de trigo (Sistema Plantio Direto) | São Gabriel |
| | | Mata nativa (mata de restinga) | Rosário do Sul |
| | | Mata nativa | Barra do Quaraí (Parque Estadual do Espinilho ^a) |
| <i>Eukerria</i> n. sp. 1 | N | Banhado | Santo Cristo |
| | | Pastagem cultivada | Santa Maria |
| | | Várzea em pousio | Santo Cristo |
| <i>Kerriana</i> n. sp. 1 | N | Várzea em pousio | Mata |
| <i>Ocnerodrilus</i> sp. (Eisen, 1878) | N | Pastagem cultivada | Santa Maria |

^a Localizado no extremo sudoeste do RS, o Parque Estadual do Espinilho ocupa uma área de 1.617,14 hectares e abriga uma formação vegetal singular: a savana estépica, além de formações de matas ciliares. Este ecossistema não possui outra ocorrência em outra área no Brasil.

^b Área de armazenamento de esterco sólido de bovinos a céu aberto.

As espécies do gênero *Glossoscolex* são todas endêmicas do continente sul-americano (CHRISTOFFERSEN, 2007). Uma espécie é considerada endêmica quando sua distribuição é restrita a uma pequena área ou a pequenas manchas localizadas em um mesmo tipo de habitat dentro de uma região mais ampla. Uma característica que tem sido observada no gênero *Glossoscolex* é a diversificação das espécies em um mesmo tipo de habitat, porém em áreas separadas por barreiras geográficas (BROWN; JAMES, 2007). O fato de terem sido encontradas seis novas espécies deste gênero neste trabalho, pode estar relacionado a esta característica do gênero *Glossoscolex* e/ou ao reduzido número de amostragens realizadas anteriormente a este levantamento no RS.

Em relação à distribuição das minhocas em ambientes naturais e perturbados⁹, os dados indicaram maior quantidade de espécies em ambientes naturais (16) do que em perturbados (14). Foi observada a presença de número maior de espécies nativas em ecossistemas naturais, sendo encontradas 11 espécies em ambientes naturais e oito espécies em ambientes perturbados. No caso das exóticas, foram encontradas cinco espécies vivendo em ambientes naturais e seis espécies em locais que tenham recebido algum tipo de interferência do homem (Tabela 3.1).

Seis espécies nativas (nova espécie de Criodrilidae, *Fimoscolex* n. sp. 1, *Glossoscolex uruguayensis uruguayensis*, *Glossoscolex* n. sp. 3, *Glossoscolex* n. sp. 5 e *Glossoscolex* n. sp. 6) foram encontradas exclusivamente em ambientes não perturbados e apenas uma espécie exótica (*Metaphire californica*). Quatro espécies nativas (*Glossoscolex* n. sp. 1, *Glossoscolex* n. sp. 2, *Urobenus brasiliensis* e *Eukerria* n. sp. 1) e uma peregrina (*Pontoscolex corethrurus*) foram encontradas tanto em ambientes naturais quanto nos perturbados vs quatro exóticas (*Amyntas corticis*, *A. gracilis*, *Eukerria saltensis* e *Microscolex dubius*). Apenas três espécies nativas (*Glossoscolex* n. sp. 4, *Kerriona* n. sp. 1 e *Ocnerodrilus* sp.) foram encontradas unicamente em ambientes perturbados e duas espécies exóticas (*Aporrectodea trapezoides* e *Amyntas rodericensis*) (Tabela 3.1).

A presença de cobertura vegetal sobre o solo proporciona um ambiente favorável tanto no tempo como no espaço para a manutenção e proliferação dos organismos epiedáficos, os quais ingerem e redistribuem o material orgânico,

⁹ Entende-se por perturbado qualquer ambiente que tenha recebido algum tipo de interferência antrópica.

influenciando na sua dinâmica populacional. O modelo multivariado utilizado para avaliar a diversidade de minhocas nos diferentes ecossistemas demonstrou esta variabilidade biológica presente nas áreas estudadas, apresentando relação dos gêneros e/ou espécies com as modificações no solo, decorrentes dos diferentes usos dos ambientes (Figura 3.2).

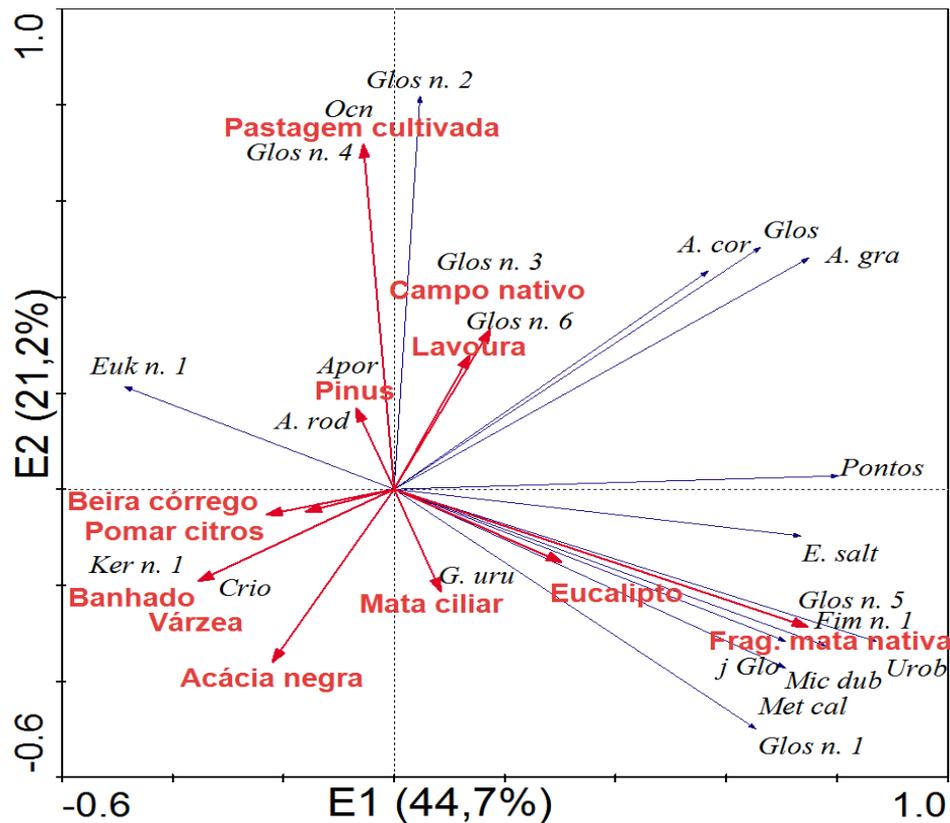


Figura 3.2 - Representação gráfica da análise de componentes principais (PCA) relacionando as dimensões 1 e 2 referentes à amostragem de minhocas em diferentes ecossistemas do RS. (Glos) *Glossoscolex* sp., (Glos n. 1) *Glossoscolex* n. sp. 1, (Glos n. 2) *Glossoscolex* n. sp. 2, (Glos n. 3) *Glossoscolex* n. sp. 3, (Glos n. 4) *Glossoscolex* n. sp. 4, (Glos n. 5) *Glossoscolex* n. sp. 5, (Glos n. 6) *Glossoscolex* n. sp. 6, (G. uru) *Glossoscolex uruguayensis uruguayensis*, (Pontos) *Pontoscolex corethrurus*, (Urob) *Urobenus brasiliensis*, (j Glo) Juvenis de *Glossoscolecidae*, (Apor) *Aporrectodea trapezoides*, (A. gra) *Amyntas gracilis*, (A. cor) *Amyntas corticis*, (A. Rod) *Amyntas rodericensis*, (Met cal) *Metaphire californica*, (E. salt) *Eukerria saltensis*, (Euk n. 1) *Eukerria* n. sp. 1, (Ker n. 1) *Kerriona* n. sp. 1, (Ocn) *Ocnerodrilus* sp., (Mic dub) *Microscolex dubius*, (Fim n. 1) *Fimoscolex* n. sp. 1, (Crio) Nova espécie de *Criodrilidae*.

Observou-se que os exemplares de *Glossoscolex* sp., *Glossoscolex* n. sp. 1, *Glossoscolex* n. sp. 5, *Glossoscolex uruguayensis uruguayensis*, *Fimoscolex* n. sp. 1, *Urobenus brasiliensis*, *Metaphire californica*, *Aporrectodea trapezoides*, *Amyntas rodericensis*, *Microscolex dubius* e juvenis da família Glossoscolecidae estiveram presentes, principalmente, em ecossistemas com grande deposição de resíduos na superfície, devido ao tipo de vegetação existente. Os exemplares de *Glossoscolex* n. sp. 3 e *Glossoscolex* n. sp. 6 foram encontrados, exclusivamente, em áreas de campo nativo, com menor deposição de material orgânico em superfície (Figura 3.2). Minhocas do gênero *Glossoscolex* são endogêicas, habitam o interior do solo, vivendo em galerias próximas a 40 cm de profundidade. A alimentação consiste na ingestão de solo mineral (LEE, 1985; BARETTA et al., 2007).

Possivelmente, a variação da diversidade de minhocas nos ecossistemas seja decorrente da variabilidade das características de cada habitat. JIMÉNEZ et al. (2006) descrevem que a densidade e a diversidade de minhocas em um ecossistema apresentam relação espécie-habitat, no qual a estrutura do solo e o aporte de material orgânico possuem grande influência.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, observou-se que a distribuição das espécies de minhocas apresentou relação com o uso e manejo do solo e com a cobertura vegetal existente, corroborando com os dados descritos na literatura, os quais demonstram a influência da bioperturbação do solo nas comunidades e cadeias alimentares de organismos edáficos (BARETTA et al., 2003; BARETTA et al., 2005; MOÇO et al., 2005).

Além de minhocas do gênero *Glossoscolex*, outra espécie nativa da família Glossoscolecidae foi frequentemente encontrada, a *U. brasiliensis* (Figura 3.3). Esta espécie possui ampla distribuição nas regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil (BROWN; JAMES, 2007). Neste trabalho, foi encontrada em áreas de campo nativo, monocultivo de eucalipto, mata ciliar, mata nativa e fragmento de mata nativa (Tabela 3.1), porém com maior frequência neste último ecossistema (dado não apresentado).



Figura 3.3 – Exemplar de *Urobenus brasiliensis* coletado em Santo Cristo, RS.

Os dados da análise de componentes principais (PCA) demonstraram que a ocorrência de *U. brasiliensis* esteve associada a fragmentos de mata nativa e a monocultivos de eucalipto (Figura 3.2), o que pode ser explicado por esta espécie ser epigéica e estar associada à presença de liteira na superfície do solo em florestas ou fragmentos de florestas primárias e secundárias (SAUTTER et al., 2006).

A presença de minhocas do gênero *Urobenus* é considerada indicador de ecossistemas bem preservados (matas nativas) e/ou com densa camada de matéria orgânica superficial, sendo frequentemente encontradas em florestas nas regiões sul e sudeste do Brasil (BARTZ et al., 2011). Neste trabalho, indivíduos da espécie *U. brasiliensis* foram encontrados em diversos locais correspondentes a ecossistemas pouco perturbados, não sendo observados em agrossistemas. Segundo Sautter et al. (2007), a ausência de indivíduos desta espécie em sistemas cultivados, possivelmente esteja atribuída à movimentação do solo, bem como à ausência de serrapilheira abundante e diversificada. Brown e James (2007) relatam que embora a espécie *U. brasiliensis* possua ampla distribuição no Brasil, as demais espécies do gênero (cinco) possuem distribuição bastante restrita, habitando principalmente a região Amazônica.

Uma nova espécie do gênero *Fimoscolex* foi encontrada em fragmento de mata nativa no município de Maçambará (Tabela 3.1). Este gênero pertencente à família Glossoscolecidae possui 11 espécies descritas e, no Brasil, apresenta distribuição restrita às regiões sul e sudeste. As espécies deste gênero apresentam grande variação no comprimento, existindo exemplares adultos de 6 cm, como a *F. sporadochaetus* Michaelsen (1918), até indivíduos medindo mais de um metro, como

a *F. saci* Righi (1971) (BROWN; JAMES, 2007). A espécie nativa *F. sporadochaetus* foi considerada extinta do território brasileiro em 2003 pelo Ministério do Meio Ambiente do Brasil. No entanto, em 2006, foi redescoberta em uma reserva do Bosque Atlântico (Parque Estadual de Itacolomi) no município de Ouro Preto, Minas Gerais (JAMES; BROWN, 2010).

De acordo com a distribuição geográfica conhecida das espécies de minhocas do gênero *Fimoscolex* no Brasil, publicada por Brown e James (2007), não havia registros da ocorrência deste gênero no RS, mas apenas nos Estados de Santa Catarina, Paraná, Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo, Estado este com maior número de locais amostrados. A coleta da nova espécie do gênero *Fimoscolex* no RS, além de representar o registro da ocorrência deste gênero no Estado, demonstra a importância e a necessidade da realização de avaliações da diversidade de minhocas em solos gaúchos.

A espécie *Pontoscolex corethrurus*, também da família Glossoscolecidae, foi encontrada em diversos ecossistemas amostrados (áreas de lavoura, monocultivos florestais, campo nativo, mata ciliar, fragmento de mata nativa e beira de córrego) em oito municípios do Estado (Tabela 3.1). Esta espécie, comumente conhecida como minhoca mansa, é a espécie mais comum e abundante no Brasil (BROWN; JAMES, 2007) e no mundo (GONZÁLEZ et al., 2006).

Embora tenha sido encontrada em ecossistemas preservados, a ocorrência da espécie *P. corethrurus* esteve mais associada a ambientes alterados (Tabela 3.1). Levantamentos para avaliar a diversidade de minhocas em diferentes ecossistemas têm demonstrado que em ambientes desmatados, ou que passaram por algum tipo de transformação antrópica, ocorre invasão de *P. corethrurus*, e muitas vezes, esta espécie acaba se tornando dominante (BARROS et al., 2004), afugentando ou até mesmo interferindo na permanência de espécies nativas no local (LAPIED; LAVELLE, 2003). Segundo Lavelle et al. (1987; 1999), este comportamento pode estar relacionado ao fato desta espécie apresentar reprodução partenogenética, bem como à sua tolerância e adaptabilidade a diferentes tipos de solo e habitats.

Kalisz e Wood (1995) sugerem quatro estágios no estabelecimento de populações de minhocas exóticas em solos habitados por espécies nativas: (1) perturbação do habitat, (2) extinção ou redução das populações nativas, (3)

introdução de espécies exóticas e colonização, (4) colonização dos espaços e nichos vagos por espécies exóticas.

Em algumas áreas amostradas, observou-se a co-existência das espécies *P. corethrurus* e *Amyntas gracilis* (exótica da família Megascolecidae) (Tabela 3.1), que também apresenta alta adaptabilidade a sistemas perturbados e comportamento dominante em relação a espécies nativas. Segundo Sautter et al. (2006), as espécies *P. corethrurus*, *Amyntas gracilis* e *A. corticis*, apesar de sua ampla distribuição geográfica, estão associadas à presença do homem colonizando áreas perturbadas.

As espécies *P. corethrurus*, *A. gracilis* e *A. corticis* estiveram presentes em diversos ecossistemas avaliados (Tabela 3.1). Por este motivo, a figura 3.2 não representou, satisfatoriamente, a ocorrência destas espécies nos ambientes.

Registrou-se a ocorrência de quatro espécies da família Megascolecidae: *Metaphire californica*, *A. gracilis*, *A. corticis* e *A. rodericensis*. A coleta de um exemplar desta última espécie representa um novo registro para o Brasil, já que não existem trabalhos, até o momento, que relatem sua ocorrência. A espécie *A. gracilis*, originária do sudeste asiático, é uma das espécies exóticas mais amplamente distribuídas no Brasil e no mundo. As espécies do gênero *Amyntas* são popularmente conhecidas como minhoca louca, saltadora, brava ou puladora, devido ao comportamento vivaz que exibem quando manipuladas ou perturbadas (BROWN; JAMES, 2007). Acredita-se que estas espécies, assim como demais espécies exóticas da família Megascolecidae, tenham chegado ao Brasil no século XIX, com o início da troca de material vegetal, juntamente com solo entre a Ásia e o Novo Mundo, realizada por navios mercantes (CHANG, 1997). Para Hendrix e Bohlen (2002), a expansão do comércio global pode ter contribuído para o aumento das invasões de espécies exóticas, o que pode causar implicações negativas sobre os processos do solo, outros organismos e comunidade de plantas, além da importação de certos patógenos.

As espécies do gênero *Amyntas* foram encontradas, principalmente, em áreas influenciadas pela ação humana, como lavouras, monocultivos florestais, pastagem cultivada, pomar, área de deposição de esterco bovino e de resíduos domiciliares (Tabela 3.1). A presença de *Amyntas* sp. nestas áreas está associada ao fato destas minhocas habitarem a camada superficial do solo e serem

dependentes de elevados teores de matéria orgânica. Estes resultados vão ao encontro das informações apresentadas por Brown et al. (2006), os quais citam que as espécies do gênero *Amyntas* colonizaram amplamente jardins, pomares, hortas e plantações, sendo abundantes em lavouras manejadas sob sistema de plantio direto na região dos campos gerais no Paraná (PEIXOTO; MAROCHI, 1996).

No entanto, o fato de terem sido encontradas minhocas do gênero *Amyntas* em áreas com ação antrópica reduzida, tais como campo nativo, fragmento de mata nativa e mata ciliar, possivelmente pode sugerir que, em algum momento, estas áreas tenham recebido influência humana, além de afirmar o alto potencial de disseminação destas espécies exóticas. Tondoh (2006) descreve que a presença de espécies comumente encontradas em locais antropizados depende do grau e do tipo de perturbação, do teor de matéria orgânica, das características do solo, do regime hídrico e da vegetação presente.

Apenas uma espécie da família Acanthodrilidae foi encontrada neste trabalho, a *Microscolex dubius*. Exemplares desta espécie exótica foram coletados em mata nativa e monocultivo de eucalipto, respectivamente nos municípios de Barra do Quaraí e Itaqui, ambos localizados na região da fronteira oeste do RS (Tabela 3.1). Segundo James e Brown (2006), minhocas das famílias Acanthodrilidae (principalmente *Microscolex* spp.) e Lumbricidae (com exceção de *Eisenia Andrei* e *Eisenia fetida*, utilizadas para vermicompostagem) possuem distribuição restrita ao sul do Brasil, particularmente no Estado do RS, onde o clima subtropical é mais frio e parecido com o clima da região de origem destas minhocas, no hemisfério norte.

Encontrou-se exemplares de minhocas habitando solos úmidos de várzea e de banhado¹⁰, pertencentes aos gêneros *Eukerria* e *Kerriona* (família Ocnerodrilidae), além de uma espécie rara ainda não identificada, de corpo com secção quadrangular, pertencente à família Criodrilidae (Figura 3.4). Esta espécie está em processo de descrição e, possivelmente, corresponderá a um novo gênero de minhocas. Embora o ecossistema banhado represente uma formação comum no

¹⁰ Existem diferenças entre solos de várzea e solos de banhado. De acordo com Ringuelet (1962), os banhados são definidos como corpos d'água permanentes ou temporários, sem uma bacia bem definida, de contorno ou perímetro indefinido e sem sedimentos próprios, apresentando vegetação emergente abundante e poucos espaços livres. Os solos de várzea são sazonalmente alagados, principalmente para o cultivo do arroz, apresentando alternância nas condições de oxidação e redução, a qual determina modificações intensas na fase sólida mineral do solo e na dinâmica de elementos químicos.

Rio Grande do Sul (INSTITUTO SOCIOAMBIENTAL, 2005), os estudos quanto à biologia destes ambientes são restritos a vertebrados, sabendo-se muito pouco sobre a meso e macrofauna presente nestes locais (CARVALHO; OZÓRIO, 2007).

Algumas espécies de minhocas habitam solos encharcados, estacionalmente submersos ou até ambientes aquáticos. No entanto, a maioria das espécies de minhocas existentes no Brasil não consegue sobreviver por longos períodos em solos permanentemente alagados, tais como pântanos, brejos, várzeas cultivadas com arroz irrigado, florestas inundáveis, áreas de nascentes e acúmulo de água. Apenas algumas espécies de minhocas pertencentes às famílias Almidae, Criodrilidae e Ocnerodrilidae habitam estes ambientes alagados permanentemente, por possuírem adaptações especiais para suportar a falta de oxigênio ou alternativas para escapar a longos períodos de inundação (BROWN; JAMES, 2007). Segundo Carter e Beadle (1931) e Beadle (1957) citados por Brown e James (2007), minhocas da família Almidae, por exemplo, possuem estruturas especiais nas caudas, que são levemente achatadas, e uma ampla rede de vasos sanguíneos usada para auxiliar na respiração. Em solos alagados, estas minhocas se posicionam com a parte anterior para baixo e com a cauda próxima à superfície do solo, possibilitando a respiração (BROWN; JAMES, 2007).

Segundo Carvalho e Ozório (2007), as características comuns que reúnem ambientes tão diversos em “áreas úmidas” são: a presença de água rasa ou solo saturado, o acúmulo de material orgânico proveniente de vegetais em decomposição e a presença de plantas e animais adaptados à vida aquática. Possivelmente, as espécies de minhocas encontradas em solos úmidos ou alagados (*Eukerria* n. sp. 1, *Kerriona* n. sp. 1 e nova espécie de Criodrilidae), pertencentes às famílias Ocnerodrilidae e Criodrilidae, apresentem algum tipo de adaptação que permita a sobrevivência em solo saturado.

Os gêneros de minhocas aquáticas e semi-aquáticas encontrados no Brasil são *Criodrilus*, *Drilocrius*, *Guarani* e *Glyphydrilocrius*, pertencentes às famílias Almidae e Criodrilidae, e o gênero *Eukerria* pertencente à família Ocnerodrilidae (BROWN; JAMES, 2007).

O gênero *Eukerria* distribui-se na América do Sul, nos países Brasil, Paraguai, Uruguai, Argentina e Chile (RIGHI, 1990). No Estado do RS, há o registro de apenas quatro espécies do gênero *Eukerria*: *E. eiseniana* (Rosa, 1895) e *E. saltensis* (LIMA;

RODRÍGUEZ, 2007), *E. stagnalis* (Kinberg, 1867) (RIGHI; AYRES, 1975; LIMA; RODRÍGUEZ, 2007) e *E. garmani argentinae* (Jamieson, 1970) (RIGHI; AYRES, 1975) (Tabela 2.2, Revisão bibliográfica).



Figura 3.4 – Nova espécie da família Criodrilidae coletada no município de Santo Cristo, RS (A); detalhe da parte ventral da minhoca na região clitelar (B); exemplar após armazenamento em etanol 70% (C) e em formol 6% (D); locais alagados onde foram coletados exemplares desta espécie de minhoca aquática (E e F).

Neste trabalho, além da espécie *E. saltensis*, uma nova espécie deste gênero foi registrada em três diferentes ecossistemas (pastagem cultivada, várzea em pousio e banhado) nos municípios de Santa Maria e Santo Cristo (Tabela 3.1).

Além da nova espécie do gênero *Eukerria*, duas outras espécies da família Ocnerodrilidae foram encontradas, representando novos registros para o RS: uma nova espécie do gênero *Kerriona* coletada em área de várzea em pousio no município de Mata e exemplares do gênero *Ocnerodrilus* foram registrados em pastagem cultivada no município de Santa Maria (Tabela 3.1, Figura 3.5).



Figura 3.5 – Nova espécie de *Eukerria* sp. coletada em três diferentes ecossistemas do RS (A) e exemplar do gênero *Ocnerodrilus* coletado em pastagem cultivada no município de Santa Maria, RS (B).

O gênero *Ocnerodrilus* é encontrado na América Central e América do Sul (RIGHI, 1990), porém ainda não havia registro da sua presença no RS, bem como da presença do gênero *Kerriona*. No Brasil, as espécies *K. limae* Righi (1980) e *K. luederwaldti* Michaelsen (1926), comumente encontradas em ambientes aquáticos, já foram coletadas em poças de água acumuladas no interior de folhas de bromélias (BROWN; JAMES, 2007). Segundo os mesmos autores, considerando a distribuição e a biodiversidade no Brasil, a família Ocnerodrilidae deve receber atenção especial para estudos moleculares, visando esclarecer sua complexa origem filogenética e a relação com demais famílias de minhocas.

Observou-se que os ecossistemas fragmento de mata nativa e campo nativo apresentaram a maior riqueza de espécies de minhocas (Tabela 3.2). Provavelmente, esta diversidade esteja relacionada ao menor grau de perturbação e ao maior nível de preservação destes ecossistemas, quando comparados aos demais ambientes avaliados. Nesse sentido, diversos fatores podem ter favorecido a

diversidade e permanência desses organismos no ambiente, tais como: deposição de serrapilheira sobre o solo, aumento do teor de matéria orgânica, diversidade e abundância de alimento, ausência de revolvimento, formação de microhabitats e microclimas favoráveis nas áreas nativas.

Tabela 3.2 - Riqueza de espécies (S) e índice de McIntosh (U) para os diferentes ecossistemas amostrados no Rio Grande do Sul.

| Ecossistema | Riqueza (S) | Índice de McIntosh (U) |
|-----------------------------|--------------------|-------------------------------|
| Fragmento de mata nativa | 12 | 16,37 a |
| Campo nativo | 9 | 8,26 c |
| Pastagem cultivada | 7 | 9,16 c |
| Monocultivo de eucalipto | 6 | 13,71 b |
| Mata ciliar | 5 | 7,48 d |
| Monocultivo de pinus | 5 | 7,48 d |
| Áreas de lavoura | 4 | 12,00 b |
| Várzea em pousio | 2 | 2,82 e |
| Monocultivo de acácia negra | 2 | 2,82 e |
| Beira de córrego | 2 | 2,82 e |
| Banhado | 2 | 2,82 e |
| Pomar de citros | 1 | 2,00 e |

* Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Estes resultados concordam com os apresentados por Sinha et al. (2003) e Suthar (2009), os quais demonstram maior diversidade e densidade de minhocas em solos de matas nativas. Segundo Chan (2001), o aporte de alimento aliado à ausência de perturbação do solo resulta em um ambiente propício para multiplicação e manutenção de populações de minhocas, por conferir estabilidade ao sistema. Além disso, quanto mais diversa for a cobertura vegetal, maior será a heterogeneidade da serrapilheira, possibilitando maior diversidade de organismos.

Os ecossistemas pomar de citros, áreas de lavoura, monocultivo de acácia negra, várzea em pousio, beira de córrego e banhado apresentaram menor riqueza de espécies (Tabela 3.2). Segundo Moço et al. (2005) a maior ou menor associação de um determinado grupo da fauna edáfica, em cada agroecossistema, deve-se ao

tipo de preparo do solo e, principalmente, aos efeitos benéficos dos resíduos vegetais mantidos na superfície do mesmo, os quais proporcionam ambiente mais favorável para a sobrevivência de determinados grupos. Possivelmente, os ecossistemas que apresentaram menor diversidade de espécies de minhocas apresentavam um ou mais fatores associados que, de alguma forma, não propiciaram a co-existência de outras espécies de minhocas, seja por restrições de oferta de alimento (monocultivo de acácia negra, lavouras, pomar de citros), regime de umidade do solo (área de várzea, banhado) ou condições edafoclimáticas desfavoráveis (beira de córrego). Segundo Jiménez et al. (2006), existe uma relação espécie-habitat que determina a diversidade de minhocas nos ecossistemas.

O índice de McIntosh (U), que demonstra a dominância de determinadas espécies nos ambientes, foi maior para fragmento de mata nativa, seguido pelos agrossistemas áreas de lavoura e monocultivo de eucalipto (Tabela 3.2). Estes resultados devem-se ao predomínio da espécie *U. brasiliensis* nos fragmentos de mata nativa, de *P. corethrurus* em áreas de lavoura e de *A. gracilis* em monocultivos de eucalipto.

Em solos sob vegetação natural, os recursos biológicos resultam de processos de adaptação às condições ambientais, refletindo os mecanismos de evolução do ecossistema como um todo (CORREIA; ANDRADE, 1999). Com as modificações impostas pelo uso do solo e, em particular pela agricultura, a fauna e os microrganismos, em diferentes graus de intensidade, são afetados pelos impactos provocados pelas práticas agrícolas (ANDRÉN et al., 1988; ALVAREZ et al., 2001), tanto devido às modificações nas propriedades do solo, como pela ação direta dessas práticas sobre os organismos. Isso explica, em parte, o porquê da dominância de cada uma das espécies nos diferentes ecossistemas avaliados.

As espécies mais sensíveis a alterações ambientais e dependentes da presença de serrapilheira e de altos teores de matéria orgânica, como é o caso de *U. brasiliensis*, foi mais abundante em fragmentos de mata nativa. Já as espécies mais adaptadas a ambientes alterados e que toleram condições edafoclimáticas menos favoráveis, como as espécies exóticas *P. corethrurus* e a *A. gracilis*, foram frequentemente encontradas em sistemas agrícolas e florestais.

Segundo Leon et al. (2003) áreas anteriormente perturbadas e em processo de revegetação são primeiramente colonizadas por espécies exóticas de minhocas,

as quais passam a exercer domínio sobre as demais espécies. Os autores citam, como exemplo, a espécie *P. corethrurus* como colonizadora destes ambientes. No caso das áreas de lavoura amostradas neste trabalho, conduzidas no sistema de plantio direto, com ausência de revolvimento do solo e contínua deposição de material orgânico em superfície, pode-se considerar que essas áreas sofreram processo de perturbação quando passaram de campo nativo ou fragmento de mata para lavoura. Após a perturbação, é provável que a espécie *P. corethrurus* foi encontrada com maior frequência nessas áreas agrícolas, devido à sua capacidade de colonização e estabelecimento em novas áreas.

Embora alguns autores citem que os monocultivos florestais são desfavoráveis à diversidade de organismos devido à baixa diversidade vegetal (BATTIROLA et al., 2007), este trabalho demonstrou que existe atividade e riqueza de minhocas nestes tipos de agrossistemas. Foram encontradas duas espécies de minhocas em monocultivo de acácia negra e seis espécies nos monocultivos de eucalipto e de pinus, sendo que uma nova espécie do gênero *Glossoscolex* (*Glossoscolex* n. sp. 1) foi descoberta habitando plantações de eucalipto e acácia negra (Tabela 3.1). Possivelmente, estes resultados estejam relacionados ao grande aporte de resíduos vegetais e à amenização dos fatores climáticos observados em monocultivos florestais, o que favorece o estabelecimento de organismos edáficos.

O monocultivo de pinus foi o único ecossistema onde foram encontrados indivíduos de *Amyntas rodericensis* e *Aporrectodea trapezoides*, única espécie da família Lumbricidae coletada neste trabalho. Esta espécie exótica vive na superfície do solo e já havia registros de sua presença no RS, no município de Porto Alegre (KNÄPPER, 1976). Segundo Silva (2007) a baixa diversidade de espécies de minhocas em áreas de monocultura de pinus pode estar associada ao tipo de resíduo vegetal depositado sobre o solo, o qual apresenta alta saturação de alumínio e elevados teores de matéria orgânica, caracterizando-se pelo baixo grau de humificação. De acordo com Copatti e Daudt (2009) a implantação de monocultivos de pinus resulta em empobrecimento do solo no que diz respeito ao complexo de troca e ao teor de micronutrientes.

Segundo Lavelle et al. (1992) e Lavelle (1996), a diversidade da fauna edáfica está relacionada com a grande variedade de recursos e microhabitats que o sistema solo-serrapilheira oferece, como uma mistura de fases altamente

compartimentalizadas, gerando um mosaico de condições microclimáticas. Assim, a avaliação da comunidade de organismos presentes em um determinado ecossistema deve levar em conta todos os fatores possíveis que estão interferindo no sistema, visando compreender as relações existentes entre as espécies e seus habitats.

O conhecimento da diversidade dos organismos que vivem no solo, os quais mantêm a sua funcionalidade, é essencial para a proteção das espécies. Portanto, estudos como este devem ter continuidade em outros locais e ambientes do RS, objetivando a descoberta de novas espécies, o monitoramento e a distribuição das espécies já conhecidas, bem como a avaliação ecológica das novas espécies encontradas.

3.5 Conclusões

O número de espécies registradas no Estado do Rio Grande do Sul foi ampliado de 44 (15 nativas e 29 exóticas) para 56 espécies (26 nativas e 30 exóticas), distribuídas em seis famílias: Glossoscolecidae (18), Lumbricidae (12), Megascolecidae (9), Ocnerodrilidae (7), Acanthodrilidae (7) e Criodrilidae (3).

As espécies de minhocas identificadas neste trabalho, em ecossistemas naturais e agroflorestais do Rio Grande do Sul são: *Amyntas corticis*, *A. gracilis*, *A. rodericensis*, *Aporrectodea trapezoides*, *Eukerria saltensis*, *Glossoscolex uruguayensis uruguayensis*, *Metaphire californica*, *Microscolex dubius*, *Ocnerodrilus* sp., *Pontoscolex corethrurus*, *Urobenus brasiliensis*, além de seis novas espécies de *Glossoscolex* sp., três novas espécies pertencentes aos gêneros *Eukerria*, *Fimoscolex* e *Kerriona*, e uma nova espécie da família Criodrilidae.

A ocorrência das espécies de minhocas apresenta relação com o tipo de ecossistema avaliado, sendo observada maior riqueza de espécies em áreas de fragmento de mata nativa e campo nativo.

3.6 Referências bibliográficas

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Southampton, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, Sept. 1997.

ALVAREZ, T.; FRAMPTON, G. K.; GOULSON, D. Epigeic Collembola in wheat hunter organic, integrated and conventional farm management regimes. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Zürich, v. 83, n. 1-2, p. 95-110, Jan. 2001.

ANDRÉN, O.; PAUSTIAN, K.; ROSSWALL, T. Soil biotic interactions in the functioning of agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Charlottetown, v. 24, n. 1, p. 57-67, Nov. 1988.

BARETTA, D.; SANTOS, J. C. P.; MAFRA, Á. L. Fauna edáfica avaliada por armadilhas de catação manual afetada pelo manejo do solo na região oeste catarinense. **Revista de Ciência Agroveterinárias**, Lages, v. 2, n. 2, p. 97-106, jul./dez. 2003.

BARETTA, D. et al. Efeito do monocultivo de pinus e da queima do campo nativo em atributos biológicos do solo no Planalto Sul Catarinense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 29, n. 5, p. 715-724, set./out. 2005.

BARETTA, D. et al. Earthworm populations sampled using collection methods in atlantic forests with *Araucaria angustifolia*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, n. 4, p. 384-392, July/Aug. 2007.

BARROS, E. et al. Soil physical degradation and changes in macrofaunal communities in Central Amazon. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 26, n. 2, p. 157-168, Mar./Apr. 2004.

BARTZ, M. L. C. **Ocorrência e taxonomia de minhocas em agroecossistemas no Paraná, Brasil**. 2011. 175f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

BARTZ, M. L. C. et al. Minhocas *Urobenus* sp.: das matas para as áreas sob plantio direto. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, n. 124, p. 6-7, jul./ago. 2011.

BATTIROLA, L. D. et al. Composição da comunidade de artrópodes associada à copa de *Attalea phalerata* Mart. (Arecaceae), durante o período de cheia no

Pantanal de Poconé, Mato Grosso, Brasil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 36, n. 5, p. 640-651, Sept./Oct. 2007.

BLAKEMORE, R. J. **Cosmopolitan earthworms – an eco-taxonomic guide to the peregrine species of the world**. Kippax: VermEcology. CD-ROM, 2002.

BROWN, G. G.; JAMES, S. W. Ecologia, biodiversidade e biogeografia das minhocas no Brasil. In: BROWN, G. G.; FRAGOSO, C. (Ed.). **Minhocas na América Latina: Biodiversidade e ecologia**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. p. 297-381.

BROWN, G. G. et al. Exotic, peregrine, and invasive earthworms in Brazil: diversity, distribution, and effects on soils and plants. **Caribbean Journal of Science**, Puerto Rico, v. 42, n. 3, p. 339-358, Dec. 2006.

CARVALHO, A. B. P.; OZÓRIO, C. P. Avaliação sobre os banhados do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas, v. 1, n. 2, p. 83- 95, ago./dez. 2007.

CHAN, K. Y. An overview of some tillage impacts on earthworm population abundance and diversity – implications for functioning in soils. **Soil and Tillage Research**, Beckenham, v. 57, n. 4, p. 179-191, Jan. 2001.

CHANG, Y. C. Minireview: Natural history of *Amyntas hawayanus* (Rosa, 1891). **Acta Biologica Paranaense**, Curitiba, v. 26, n. 1-4, p. 39-50, 1997.

COPATTI, C. E.; DAUDT, C. R. Diversidade de artrópodes na serapilheira em fragmentos de mata nativa e *Pinus elliottii* (Engelm. Var elliottii). **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 31, n. 1, p. 95-113, jun. 2009.

CORREIA, M. E. F.; ANDRADE, A. G. Formação da serapilheira e ciclagem de nutrientes. In: SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. O. (Eds.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. Porto Alegre, Gênese, 1999. p. 197-225.

CHRISTOFFERSEN, M. L. Biodiversity and distribution of the Glossoscolex genus-group (Annelida, Clitellata, Lumbricina, Glossoscolecidae) in South America. **Neotropical Biology and Conservation**, São Leopoldo, v. 2, n. 3, p. 155-160, Sept./Dec. 2007.

CHRISTOFFERSEN, M. L. Continental biodiversity of South American oligochaetes: the importance of inventories. **Acta Zoológica Mexicana** (n.s.), Xalapa, v. 26, Número Especial 2, p. 35-46, Oct. 2010.

FERREIRA, D. F. **Sistemas de análise estatística para dados balanceados**. Lavras: UFLA/DEX/SISVAR, 2000. 145 p.

FOLMER, O. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, Newcastle, v. 3, n. 5, p. 294-299, Oct. 1994.

FRAGOSO, C.; BROWN, G. G. Ecología y taxonomía de las lombrices de tierra en Latinoamérica: el primer Encuentro Latino-Americano de Ecología y Taxonomía de Oligoquetas (ELAETA01). In: BROWN, G. G.; FRAGOSO, C. (Ed.). **Minhocas na América Latina: biodiversidade e ecologia**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. p. 33-75.

FRAGOSO, C.; BROWN, G. G.; FEIJOO, A. The influence of Gilberto Righi on tropical earthworm taxonomy: the value of a full-time taxonomist. **Pedobiologia**, Berlin, v. 47, n. 5-6, p. 400-404, 2003.

GONZÁLEZ, G. et al. Earthworm invasions in the tropics. **Biological Invasions Belowground: Earthworms as Invasive Species**, Georgia, v. 8, n. 6, p. 1247-1256, Sept. 2006.

HENDRIX, P. F.; BOHLEN, P. J. Exotic earthworm invasions in North America: ecological and policy implications. **Biological Sciences**, California, v. 52, n. 9, p. 801-811, Sept. 2002.

INSTITUTO SOCIOAMBIENTAL. **Almanaque Brasil Socioambiental**. 1. ed. São Paulo, 2005, 479p.

ISHIZUKA, K. A review of the Genus *Pheretima* s. Lat. (Megascolecidae) from Japan. **Edaphologia**, Yokohama, n. 62, p. 55-80, Feb. 1999.

JAMES, S. W.; BROWN, G. G. Earthworm ecology and diversity in Brazil. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). **Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems**. Wallingford: CAB International, 2006. p. 56-116.

JAMES, S. W.; BROWN, G. G. Rediscovery of *Fimoscolex sporadochaetus* Michaelsen 1918 (Clitellata: Glossoscolecidae), and considerations on the endemism and diversity of Brazilian earthworms. **Acta Zoológica Mexicana** (n.s.), Xalapa, v. 26, Número Especial 2, p. 47-58, Oct. 2010.

JIMÉNEZ, J. J.; LAVELLE, P.; DECAËNS, T. The efficiency of soil hand-sorting in assessing the abundance and biomass of earthworm communities. Its usefulness in population dynamics and cohort analysis studies. **European Journal of Soil Biology**, Rouen, v. 42, s. 1, p. 225-230, Nov. 2006.

KALISZ, P. J.; WOOD, H. B. Native and exotic earthworms in wild land ecosystems. In: HENDRIX, P. F. (Ed.) **Earthworm Ecology and Bio-geography in North America**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1995. p. 117- 126.

KNÄPPER, C. F. U. Preliminar considerations on the occurrence of Oligochaetes in the Estuary of the Guaíba RS. **Estudos Leopoldenses**, São Leopoldo, v. 38, p. 39-41, 1976.

KUMAR, S. et al. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Briefings in Bioinformatics**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 299-306, July 2008.

LAPIED, E.; LAVELLE, P. The peregrine earthworm *Pontoscolex corethrurus* in the East coast of Costa Rica. **Pedobiologia**, Berlin, v. 47, n. 5-6, p. 471-474, 2003.

LAVELLE, P. et al. Impact of soil fauna on the properties of soils in the humid tropics. In: LAL, R.; SANCHEZ, P. A. **Myths and science of soils of the tropics**. Soil Science Society of America, Madison, p. 157-185, 1992.

LAVELLE, P. Diversity of soil fauna and ecosystem function. **Biology International**, n. 33, p. 3-16, July 1996.

LAVELLE, P. et al. Adaptative strategies of *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae, Oligochaeta), a peregrine geophagous earthworm of the humid tropics. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 5, n. 3, p. 188-194, 1987.

LAVELLE, P.; BRUSSAARD, L.; HENDRIX, P. **Earthworms management in tropical agroecosystems**. CABI International, Wallingford, UK, 1999, 320p.

LEON, Y. S. D. et al. Recovery of native earthworm in abandoned tropical pastures. **Conservation Biology**, v. 17, n. 4, p. 999-1006, Aug. 2003.

LEE, K. E. **Earthworms: Their Ecology and Relationships with Soils and Land Use**. Sydney: Academic Press, 1985, 411p.

LIMA, A. C. R. de; RODRÍGUEZ, C. Earthworm diversity from Rio Grande do Sul, Brazil, with a new native Criodrilid genus and species (Oligochaeta: Criodrilidae). **Megadrilologica**, Canadá, v. 11, n. 2, p. 9- 18, 2007.

MILLER, A. S.; DYKES, D. D.; POLESKI, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human cells. **Nucleic Acids Research**, Southampton, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.

MOÇO, M. K. et al. Caracterização da fauna edáfica em diferentes coberturas vegetais na região norte fluminense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 29, n. 4, p. 555-564, jul./ago. 2005.

PEIXOTO, R. T.; MAROCHI, A. I. A influência da minhoca *Pheretima* sp. nas propriedades de um latossolo vermelho escuro álico e no desenvolvimento de culturas em sistema de plantio direto em Arapoti-PR. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, v. 35, p. 23-35, 1996.

PINTO-COELHO, R. M. **Fundamentos em ecologia**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2000. 252p.

PORTAL BRASIL. **Geografia**. Acesso em: 16 de fevereiro de 2012. Disponível em: <<http://www.portalbrasil.net/geografia.htm>>.

REYNOLDS, J. W.; WETZEL, M. J. **Nomenclatura Oligochaetologica - Supplementum Quartum [N.O.S.Q.]**. Champaign: University of Illinois, 2009. Disponível em: < <http://www.inhs.uiuc.edu/~mjwetz/Nomen.Oligo.html>>. Acesso em: 20 de maio de 2011.

RIGHI, G. **Minhocas de Mato Grosso e de Rondônia**. Brasília: SCT/PR-CNPq. Programa do Trópico Úmido, Programa Polonoroeste, Relatório de Pesquisa n° 12. 1990. 157p.

RIGHI, G. Colombian earthworms. In: VAN DER HAMMEN, T. (Ed). **Studies on Tropical Andean Ecosystems**, Vol. 4, Cramer (Borntraeger), Berlin-Stuttgart, 1995. p. 485–607.

RIGHI, G.; AYRES, I. Alguns Oligochaeta sul brasileiros. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 35, p. 309-316, 1975.

RINGUELET, R. A. 1962. **Ecologia acuática continental**. Buenos Aires: EUDEBA, 138p.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 4, n. 4, p. 406-425, July 1987.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 2001.

SAUTTER, K. D. et al. Present knowledge on earthworm biodiversity in the State of Paraná, Brazil. **European Journal of Soil Biology**, Rouen, v. 42, s. 1, p.296-300, Aug./Sept. 2006.

SAUTTER, K. D. et al. Ecologia e biodiversidade das minhocas no Estado do Paraná, Brasil. In: BROWN, G. G.; FRAGOSO, F. (Org). **Minhocas na América Latina: Biodiversidade e ecologia**. Londrina: Embrapa Soja, 383-396, 2007.

SILVA, L. B. **Caracterização e quantificação da matéria orgânica em horizontes de solos sob pastagem natural dos Campos de Cima da Serra, RS**. 2007. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SINHA, B. et al. Impact of landscape modification on earthworm diversity and abundance in the Hariyali sacred landscape Garhwal Himalaya. **Pedobiologia**, Goettingen, v. 47, n. 4, p. 357-370, 2003.

STADEN, R.; BEAL, K. F.; BONFIELD, J. K. The Staden Package, 1998. **Methods in Molecular Biology**, v. 132, p.115-130, 2000.

SUTHAR, S. Earthworm communities a bioindicator of arable land management practies: A case study in semiarid region of India. **Ecological Indicators**, Kiel, v. 9, n. 3, p. 588-594, May 2009.

TALAVERA, J. A. Lombrices de tierra presentes en la laurisilva de Tenerife (Islas Canarias). **Miscellania Zoologica**, Barcelona, v. 11, p. 93-103, 1987.

TER BRAAK, C. J. F.; SMILAUER, P. **CANOCO reference manual and user's guide to Canoco for Windows**: Software for canonical community ordination (version 4). New York: Microcomputer Power, 1998.

THOMAS G.; CLAY, D. **Biodiversity data analysis package Bio-DAP**. Resource Conservation Fundy National Park, New Brunswick, Canada, 1988.

THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, Nov. 1994.

TONDOH, J. E. Seasonal changes in earthworm diversity and community structure in Central Côte d'Ivoire. **European Journal of Soil Biology**, Rouen, v. 42, s. 1, p. 334-340, Nov. 2006.

VIANA, V. M. Biologia e manejo de fragmentos de florestas naturais. Congresso Florestal brasileiro, 1990.

VIANA, V. M.; PINHEIRO, L. A. F. V. Conservação da biodiversidade em fragmentos florestais. Série técnica IPEF, v. 12, n. 32, p. 25-42, dez. 1998.

4 CAPÍTULO II - COMUNIDADE DE MINHOCAS EM ECOSISTEMAS NO RIO GRANDE DO SUL: CARACTERIZAÇÃO ECOLÓGICA E EDÁFICA DOS AMBIENTES

4.1 Resumo

As minhocas desempenham importantes funções no ecossistema solo, sendo a ocorrência das espécies relacionada com fatores edafo-climáticos e vegetação. O objetivo do trabalho foi determinar a influência de fatores edáficos, uso e manejo do solo na ocorrência de minhocas em ecossistemas naturais e alterados do Rio Grande do Sul (RS). Avaliação qualitativa da diversidade de minhocas foi realizada em 15 diferentes de ecossistemas, em 29 municípios do RS, totalizando 77 locais de amostragem. Em cada local avaliado foram retirados, no mínimo, dez monólitos de solo. A identificação das espécies foi realizada com base em parâmetros morfológicos. Foram encontradas diversas espécies de minhocas no Estado do RS, vivendo em solos de ecossistemas naturais e agrícolas, com variações quanto às características físicas e químicas. A maioria das espécies encontradas foi nativa, pertencente à família Glossoscolecidae e ao gênero *Glossoscolex*. A caracterização do solo e do uso dos ambientes onde foram coletadas as diferentes espécies de minhocas possibilitou o levantamento de informações associadas ao ecossistema com ocorrência de minhocas. A ocorrência das espécies esteve mais relacionada ao grau de perturbação do ambiente e ao tipo de uso do solo, do que às características físicas e químicas. As espécies de minhocas encontradas neste trabalho, em ecossistemas naturais e agrofloretais do Estado do Rio Grande do Sul são: *Amyntas corticis*, *A. gracilis*, *A. rodericensis*, *Aporrectodea trapezoides*, *Eukerria saltensis*, *Glossoscolex uruguayensis uruguayensis*, *Metaphire californica*, *Microscolex dubius*, *Ocnerodrilus* sp., *Pontoscolex corethrurus*, *Urobenus brasiliensis*, além de seis novas espécies de *Glossoscolex* sp. e uma nova espécie de cada um dos gêneros *Eukerria*, *Fimoscolex* e *Kerriona* e da família Criodrilidae. O grau de perturbação dos ecossistemas e o uso do solo interferem na presença de minhocas, seguido pelas características físicas e químicas do solo.

Palavras-chave: Oligoquetas; distúrbio ambiental; solo.

4.2 Introdução

As minhocas participam de diversos processos no solo, sendo importantes para a manutenção da qualidade dos ecossistemas. Participam da trituração e incorporação da serrapilheira, construção e manutenção da porosidade e agregação do solo através da formação de galerias, do controle de comunidades microbianas, da proteção de plantas contra algumas pragas e doenças e do crescimento vegetal (JOUQUET et al., 2006; LAVELLE et al., 2006; ANDERSON, 2009).

Embora a dinâmica da atuação das minhocas sobre a decomposição da matéria orgânica do solo seja constantemente estudada (AIRA; DOMÍNGUEZ, 2004; EDWARDS; ARANCON, 2004; PULLEMAN et al., 2005; BHADAURIA; SAXENA, 2010), existe carência de pesquisas quanto à ocorrência de minhocas em diferentes ecossistemas e sobre a relação entre espécies nativas e exóticas presentes em um determinado local (BROWN et al., 2000; NUNES et al. 2007). Os efeitos que a invasão de minhocas exóticas provocam no solo e na comunidade de minhocas nativas em agroecossistemas ainda não estão claros (HENDRIX et al., 2006).

A diversidade e abundância das populações de minhocas que habitam um local específico são determinadas e controladas por fatores hierárquicos, que operam em diferentes escalas de tempo e de espaço (LAVELLE, 1996; BROWN et al., 2006). Dentre os fatores determinantes da fauna do solo, o clima encontra-se no nível hierárquico mais elevado, caracterizando os regimes hídricos e de temperatura, que interferem no tipo de solo e de vegetação. Estes dois últimos fatores, por sua vez, definem a natureza e a abundância dos constituintes minerais e orgânicos do solo e, conseqüentemente, o nível de fertilidade do solo, influenciado também pelo tipo de material de origem. O homem também representa um fator determinante da abundância e riqueza de espécies de minhocas, pois define o tipo de uso do solo e as práticas de manejo associadas à produção agrícola (BROWN; DOMÍNGUEZ, 2010).

De modo geral, as minhocas são consideradas benéficas e importantes para a manutenção da fertilidade e sustentabilidade do solo, independentemente de sua origem nativa, exótica ou peregrina (LIMA; BRUSSAARD, 2010). Estes efeitos positivos são associados ao comportamento e à mobilidade das minhocas,

principalmente pela construção de galerias e liberação de excrementos na superfície do solo. Segundo Peixoto e Marochi (1996), normalmente, o aumento populacional e indícios da atividade de minhocas são associados à melhoria na fertilidade e qualidade do solo, bem como na produtividade agrícola, embora poucos dados de pesquisa tenham comprovado isto no campo (BROWN; DOMÍNGUEZ, 2010).

Do ponto de vista biológico, as práticas agrícolas provocam mudanças em grandes extensões territoriais, por meio da retirada da vegetação natural presente para implantação de monocultivos, interferindo nos complexos nichos ecológicos e na cadeia alimentar de diversos organismos edáficos (DE-POLLI; PIMENTEL, 2005). Os sistemas de uso, manejo e preparo do solo afetam a estrutura dos grupos taxonômicos dominantes da macrofauna edáfica (MARCHÃO et al., 2009; LIMA et al., 2010), sendo que a abundância e a biomassa de minhocas tendem a diminuir, independentemente das técnicas de manejo empregadas (PEIGNÉ et al., 2009). Determinadas práticas agrícolas, além de promoverem a redução da densidade de minhocas, podem proporcionar condições edáficas para a substituição de espécies nativas por espécies exóticas, melhor adaptadas a condições edáficas menos favoráveis (GONZÁLEZ et al., 2006; FERNANDES et al., 2010).

Em ecossistemas naturais e agrícolas, a ciclagem de nutrientes está diretamente relacionada com a atividade de organismos e microrganismos presentes no solo, sendo determinante para a manutenção da sustentabilidade dos ambientes. A abundância e diversidade dos organismos que compõem a cadeia alimentar decompositora de um ecossistema determinam a velocidade e a magnitude dos processos de mineralização e imobilização de nutrientes, favorecendo a assimilação de elementos pelas plantas (COLEMAN; WHITMAN, 2005; CORREIA; OLIVEIRA, 2005; LAVELLE et al., 2006; ANDERSON, 2009). Dentre esses organismos, os pertencentes à macrofauna edáfica (diâmetro > 2,0 mm), como as minhocas, são capazes de realizar grandes deslocamentos de resíduos orgânicos e partículas minerais pelo perfil do solo, sendo influenciados pela qualidade e quantidade dos resíduos vegetais superficiais (WARREN; ZOU, 2002; LIMA et al., 2010). Portanto, assim como a atividade de minhocas é capaz de modificar o ambiente edáfico, é possível que as características do ambiente favoreçam a ocorrência e a diversidade da comunidade de minhocas nos ecossistemas.

A hipótese deste trabalho foi que a ocorrência de espécies de minhocas nativas, exóticas e peregrinas em ecossistemas é influenciada pelo uso, manejo e pelas características físicas e químicas do solo. Neste sentido, o objetivo do trabalho foi determinar a influência de fatores edáficos, uso e manejo do solo na ocorrência de minhocas em ecossistemas naturais e alterados do Rio Grande do Sul.

4.3 Material e métodos

4.3.1 Locais amostrados

As minhocas foram coletadas em diversos ecossistemas do Estado do Rio Grande do Sul (RS), através de levantamento qualitativo. Foram amostrados 15 ecossistemas: fragmento de mata nativa (17), campo nativo (13), cultivos anuais (8) mata ciliar (7), pastagem cultivada (6), monocultivos de eucalipto (12), pinus (3) e acácia negra (2), várzea em pousio (2), beira de córrego (2), pomar de citros (1), gramado residencial (1), encosta de açúde (1), locais para deposição de resíduos domésticos (1) e animais (1). Estas amostragens foram realizadas em 29 municípios do Estado do RS, totalizando 77 locais amostrados.

Os ecossistemas amostrados localizam-se nos municípios das regiões: Centro-oeste (Cacequi, Dilermando de Aguiar, Formigueiro, Itaara, Jaguari, Júlio de Castilhos, Mata, Nova Esperança do Sul, Santa Maria, Santiago, São Francisco de Assis, São Vicente do Sul, Tupanciretã), Fronteira Sudoeste (Bagé, Caçapava do Sul, Hulha Negra), Fronteira Oeste (Alegrete, Barra do Quaraí, Itaqui, Maçambará, Rosário do Sul, Santana do Livramento, São Borja, São Gabriel, Uruguaiana, Vila Nova do Sul), Fronteira Noroeste (Santa Rosa, Santo Cristo) e Missões (Roque Gonzales).

4.3.2 Coleta dos indivíduos

Para conhecer a diversidade de minhocas existente em cada uma das áreas avaliadas, realizou-se amostragem qualitativa através da abertura de buracos aleatórios (mínimo de dez por ecossistema). A profundidade da amostragem variou entre 30 a 50 cm, dependendo da categoria ecológica das espécies de minhocas presentes. A triagem do solo foi realizada no campo e as minhocas coletadas foram imediatamente armazenadas em etanol 70%.

As coletas foram realizadas no período de setembro de 2009 a fevereiro de 2012, preferencialmente nos meses chuvosos. No laboratório, as minhocas foram transferidas para frascos contendo solução de formaldeído a 4% (TALAVERA, 1987). A identificação morfológica das espécies foi realizada por meio do uso de chaves de identificação e descrição de famílias, gêneros e espécies de acordo com Righi (1990, 1995) e Blakemore (2002).

A frequência de ocorrência das espécies de minhocas em solos com diferenças em relação aos parâmetros de fertilidade avaliados, foi determinada pelo número de vezes que cada espécie foi encontrada em cada ambiente.

4.3.3 Caracterização dos solos e da vegetação das regiões amostradas

Amostras de solo da camada 0 a 20cm foram coletadas em cada ponto amostrado com o auxílio de pá de corte. O material foi enviado ao laboratório para determinação de características e propriedades físicas e químicas. As amostras deformadas de solo foram secas ao ar, destorroadas manualmente, tamisadas em peneiras com abertura de 2,0 mm e armazenadas em potes plásticos com tampa.

Foram determinados o valor de pH, a textura, o teor de nutrientes (cálcio, magnésio, fósforo, potássio), o conteúdo de matéria orgânica, a soma de bases e a capacidade de troca de cátions ($CTC_{efetiva}$ e $CTC_{pH7,0}$).

O valor de pH foi determinado em água, na proporção 1:1, conforme metodologia proposta por Tedesco et al. (1995). Foram considerados valores de pH em água muito baixo ($\leq 5,0$), baixo (5,1 – 5,4), médio (5,5 – 6,0) e alto ($> 6,0$).

A textura do solo foi determinada pelo método da pipeta (EMBRAPA, 1997), visando quantificar as frações granulométricas dos constituintes do solo. As classes texturais, baseadas no teor de argila do solo, foram classificadas em: 1 ($> 60\%$), 2 (41 - 60%), 3 (21 - 40%) e 4 ($\leq 20\%$).

Os teores de cálcio e magnésio extraídos por KCl 1 mol L⁻¹ foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica e o teor de alumínio trocável extraído por KCl 1 mol L⁻¹, determinado através de titulação com NaOH, conforme Tedesco et al. (1995). Os teores de cálcio (cmol_c dm⁻³) foram classificados

como baixo ($\leq 2,0$), médio ($2,1 - 4,0$) e alto ($> 4,0$), assim como os teores de magnésio ($\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$): baixo ($\leq 0,5$), médio ($0,6 - 1,0$) e alto ($> 1,0$).

Os teores de fósforo e potássio extraídos por Mehlich-1 foram determinados por colorimetria e fotometria de chama, respectivamente. As análises realizadas seguiram metodologias descritas em Tedesco et al. (1995). Os teores de fósforo (mg dm^{-3}) foram classificados em cinco faixas: muito baixo ($\leq 5,0$), baixo ($5,1 - 10,0$), médio ($10,1 - 20,0$), alto ($20,1 - 40,0$) e muito alto ($> 40,0$). Os teores de potássio ($\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$) foram classificados em faixas de acordo com o valor de $\text{CTC}_{\text{pH}7,0}$. Quando $\text{CTC}_{\text{pH}7,0} > 15$: muito baixo (≤ 30), baixo ($31 - 60$), médio ($61 - 90$), alto ($91 - 180$) e muito alto (> 180); quando $\text{CTC}_{\text{pH}7,0}$ entre $5,1$ e $15,0$: muito baixo (≤ 20), baixo ($21 - 40$), médio ($41 - 60$), alto ($61 - 120$) e muito alto (> 120); quando $\text{CTC}_{\text{pH}7,0} \leq 5,0$: muito baixo (≤ 15), baixo ($16 - 30$), médio ($31 - 45$), alto ($46 - 90$) e muito alto (> 90).

O teor de matéria orgânica do solo (MO) foi analisado por oxidação úmida, utilizando dicromato de potássio em meio sulfúrico ($0,4 \text{ N}$). A determinação foi realizada por titulação com sulfato ferroso amoniacal ($0,1 \text{ N}$), segundo Embrapa (1997). Os níveis de matéria orgânica foram classificados como baixo ($\leq 2,5 \%$), médio ($2,6 - 5,0 \%$) e alto ($> 5,0 \%$).

A capacidade de troca de cátions efetiva ($\text{CTC}_{\text{efetiva}}$) foi obtida pela soma das bases Ca^{2+} , Mg^{2+} e K^+ mais Al^{3+} (CQFS-RS/SC, 2004). Os valores de $\text{CTC}_{\text{efetiva}}$ (%) foram classificados em: muito baixo ($< 1,0$), baixo ($1,0 - 10,0$), médio ($10,1 - 20,0$) e alto ($> 20,0$). A capacidade de troca de cátions em pH 7 ($\text{CTC}_{\text{pH}7,0}$) foi estimada pela soma de bases mais H + Al. Foram considerados três níveis de valores de $\text{CTC}_{\text{pH}7,0}$ ($\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$): baixo ($\leq 5,0$), médio ($5,1 - 15$) e alto ($> 15,0$).

Girardi-Deiro e Gomes (2003) descreveram a vegetação dos ecossistemas das regiões Sudoeste e Sudeste do RS. Os municípios de Uruguaiana, Quaraí, áreas pertencentes a Alegrete, Santana do Livramento e Itaqui situam-se na zona conhecida como campos duros e pedregosos com solo de pouca profundidade. Estes campos são limpos, com elevado número de espécies vegetais de porte baixo, de valor forrageiro, que proporcionam boa cobertura do solo. Os municípios de Bagé e Hulha Negra fazem parte da região conhecida como campos finos de solos férteis de maior profundidade. Os campos são produtivos e apresentam áreas com partes limpas e outras invadidas, principalmente, por espécies dos gêneros *Eupatorium*,

Baccharis e *Eryngium*. Em geral, os solos são medianamente profundos e apresentam boa fertilidade, sendo aptos para a agricultura. (GIRARDI-DEIRO; GOMES, 2003).

São Gabriel, Rosário do Sul, áreas de Santana do Livramento e Alegrete estão localizados em uma zona típica de transição entre os campos grossos da Depressão Central e os campos finos da Campanha gaúcha, conhecida como campos médios e grossos sobre solos profundos. Os campos são relativamente sujos e estão localizados sobre arenito, sendo suscetíveis à degradação por arenização (GIRARDI-DEIRO; GOMES, 2003).

A região conhecida como campos duros sobre solos com afloramentos rochosos, associados com mata arbustiva compreende os municípios da serra do sudeste, onde predominam solos litólicos entremeados com várzeas aluvionais. Os campos estão associados a uma mata arbustiva-arbórea com espécies como o chachal (*Allophylus eduli* Radlk), a pitangueira (*Eugenia uniflora* L.), aroeiras (*Schinus* spp.), vassouras (*Baccharis* spp.), entre outras. Nas partes elevadas, o campo é pouco denso e a cobertura de gramíneas é rala. Nos vales e ao longo dos cursos d'água, o solo é mais profundo e há densa vegetação campestre (GIRARDI-DEIRO; GOMES, 2003).

Nos municípios localizados na região Noroeste do Estado (Santa Rosa, Santo Cristo e Roque Gonzales), predominam solos antigos e profundos, de excelente aptidão agrícola (STRECK et al., 2002).

4.3.4 Caracterização das condições climáticas das regiões amostradas

O Estado do RS apresenta as estações do ano bem definidas: inverno, primavera, verão e outono. De acordo com a classificação de Wladimir Köppen, o clima do RS se enquadra na zona fundamental C, apresentando dois tipos climáticos: Cfa (verões quentes) e Cfb (verões amenos). A letra C indica que o território gaúcho situa-se na faixa de climas subtropicais ou temperados, com temperatura do mês mais frio próxima a 3 °C. O clima Cf significa temperado úmido, com precipitações pluviais médias razoavelmente bem distribuídas durante todos os

meses do ano, de forma que não há estação seca nem estação chuvosa bem caracterizada (MORENO, 1961; BERLATO; FONTANA, 2003).

A variedade Cfa caracteriza-se por apresentar temperatura do mês mais quente superior a 22 °C e temperatura do mês mais frio entre 3 e 18 °C. A variedade Cfb é caracterizada por apresentar temperatura do mês mais quente inferior a 22°C e a do mês mais frio superior a 3 °C. O clima Cfa é dominante no Estado, enquanto que o Cfb aparece nas regiões de maiores altitudes como a Serra do Nordeste, os Campos de Cima da Serra e o Escudo Riograndense (Serra do Sudeste) (BERLATO; FONTANA, 2003).

A temperatura média para o Estado é de 18 °C, sendo o clima variável nas regiões de acordo com a altitude e a proximidade da costa marítima. Janeiro e fevereiro são os meses mais quentes, quando se registram temperaturas em torno dos 40 °C. O inverno é rigoroso, sendo julho o mês mais frio, com temperaturas negativas atingindo -3,0°C (PEZZA; AMBRIZZI, 1999).

O regime pluviométrico do Estado do RS é regular e as chuvas são bem distribuídas durante todo o ano. No entanto, existe a probabilidade de ocorrer estiagens nos meses do verão (dezembro a fevereiro), prejudicando as culturas agrícolas (AGUIAR, 2005). A média pluviométrica anual do Estado do RS é de 1.700mm, embora haja regiões mais ou menos chuvosas (MALUF, 2000).

No Estado do RS, o valor de umidade relativa do ar é muito elevado. No verão e na primavera, os valores oscilam entre 68% e 85%. No outono e no inverno, os valores variam entre 76% e 90%, sendo relativamente estáveis durante as quatro estações do ano. As partes mais elevadas do Estado localizam-se na região Nordeste, com altitudes superiores a 600m, podendo atingir 1.300m (BERLATO; FONTANA, 2003).

4.4 Resultados e discussão

Vinte e uma espécies de minhocas foram encontradas no Estado do RS, as quais foram agrupadas em doze gêneros e seis famílias (Tabela 4.1).

Dez novas espécies de minhocas foram encontradas, pertencentes aos gêneros: *Glossoscolex* (6), *Fimoscolex* (1), *Kerriona* (1) e *Eukerria* (1), e uma espécie de hábito aquático pertencente à família Criodrilidae, com possibilidade de corresponder a um novo gênero. Além das espécies novas, a coleta de exemplares dos gêneros *Ocnerodrilus* e *Kerriona* representou novos registros de espécies para o RS (Tabela 4.1).

No solo, as minhocas podem apresentar distribuição espacial agrupada, representada por manchas que podem variar de um a 50 metros de diâmetro, com possível diferença marcante na distribuição de espécies (POIER; RICHTER, 1992). No entanto, como as manchas não são estáticas, nem sempre são observadas correlações entre a ocorrência de espécies com as características químicas e físicas do solo (ROSSI et al., 1997; JIMÉNEZ et al., 2001). Anderson (2009) sugere que, raramente é possível identificar o papel dos invertebrados edáficos como determinantes de processos edáficos em escala de parcela e ecossistema (hectares) e em maiores escalas, porque seus efeitos acabam sendo superados por outros controles biofísicos.

Neste trabalho, foram observadas diferenças nas características edáficas e no tipo de vegetação dos ambientes onde foram coletadas as diferentes espécies de minhocas. A maioria das espécies foi coletada em solos com teores de argila de até 40% (classes texturais 3 e 4). As espécies do gênero *Eukerria*, por terem sido coletadas em ambiente de planície, encontravam-se em solos de classes texturais 2 e 3, com teores de argila em torno de 20 a 60%. A espécie exótica *A. gracilis* foi encontrada em solos das quatro classes texturais (Figura 4.1). Isso se deve a essa espécie apresentar facilidade para colonizar novas áreas e adaptabilidade a diferentes tipos de solos e ambientes (BROWN et al., 2006; FERNANDES et al., 2010).

Tabela 4.1 - Ocorrência de minhocas em ecossistemas do Rio Grande do Sul.

| Gênero/Espécie | Ecossistemas | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|--------------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | CN | FMN | MN* | ME | MA | MP | MC | BC | B | GR | PC | PO | L | VP | RD | RA |
| <i>Amyntas corticis</i> | X | X | | | | | X | | | | X | | | | | |
| <i>Amyntas gracilis</i> | X | X | | X | | X | X | X | | | X | X | X | | X | X |
| <i>Amyntas rodericensis</i> | | | | | | X | | | | | | | | | | |
| <i>Aporrectodea trapezoides</i> | | | | | | X | | | | | | | | | | |
| <i>Eukerria</i> n. sp. 1 | | | | | | | | | X | | X | | | X | | |
| <i>Eukerria saltensis</i> | | | X | | | | | | | | | | X | | | |
| <i>Fimoscolex</i> n. sp. 1 | | X | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 1 | | X | | X | X | | | | | | | | | | | |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 2 | X | | | | | | | | | X | X | | | | | |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 3 | X | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 4 | | | | | | | | | | | X | | | | | |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 5 | | X | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 6 | X | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Glossoscolex</i> sp. | X | X | | | | X | | | | | X | | X | | | |
| <i>Glossoscolex uruguayensis</i> ** | | | | | | | X | | | | | | | | | |
| Juvenis de Glossoscolecidae | X | X | | X | X | | | | | | | | | | | |
| <i>Kerriana</i> n. sp. 1 | | | | | | | | | | | | | | X | | |
| <i>Metaphire californica</i> | | X | | | | | X | | | | | | | | | |
| <i>Microscolex dubius</i> | | | X | X | | | | | | | | | | | | |
| Nova espécie de Criodrilidae | | | | | | | | | X | | | | | | | |
| <i>Ocnerodrilus</i> sp. | | | | | | | | | | | X | | | | | |
| <i>Pontoscolex corethrurus</i> | X | X | | X | | X | X | X | | | | | X | | | |
| <i>Urobenus brasiliensis</i> | X | X | X | X | | | | | | | | | | | | |
| Número total de espécies | 9 | 10 | 3 | 6 | 2 | 5 | 5 | 2 | 2 | 1 | 7 | 1 | 4 | 2 | 1 | 1 |

Ecossistemas: CN = campo nativo, FMN = fragmento de mata nativa, MN = mata nativa, ME = monocultivo de eucalipto, MA = monocultivo de acácia negra, MP = monocultivo de pinus, MC = mata ciliar, BC = beira de córrego, B = banhado, GR = gramado residencial, PC = pastagem cultivada, PO = pomar de citros, L = lavoura, VP = várzea em pousio, RD = local de deposição de resíduos domésticos, RA = local de deposição de dejetos animais.

*Parque Estadual do Espinilho, Barra do Quaraí, RS.

***Glossoscolex uruguayensis uruguayensis*

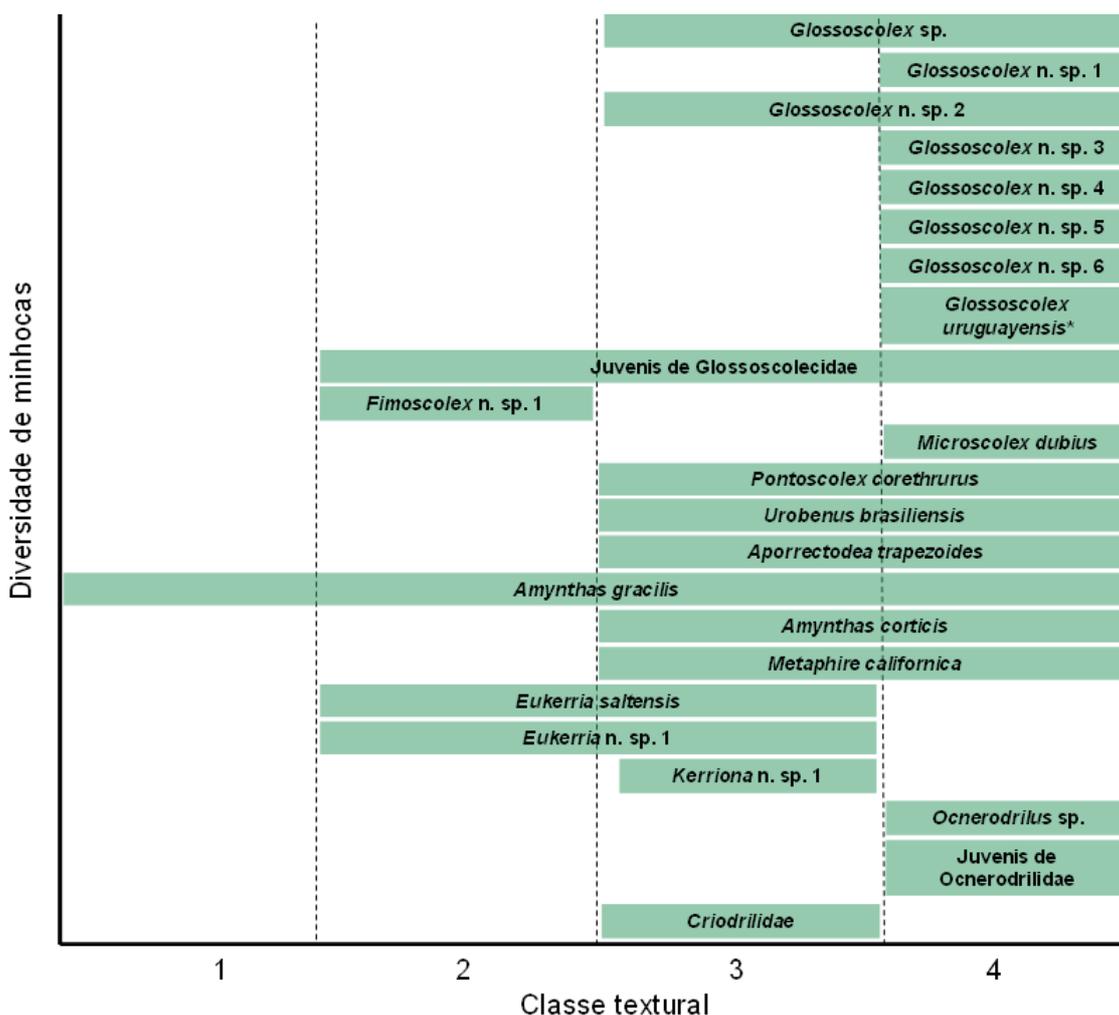


Figura 4.1 – Diversidade de minhocas de acordo com a classe textural do solo onde foram coletadas. Classe textural baseada no teor de argila do solo: 1 (> 60%), 2 (41 - 60%), 3 (21 - 40%) e 4 (≤ 20%). **Glossoscolex uruguayensis uruguayensis*.

Minhocas juvenis da família Glossoscolecidae foram encontradas em solos com teores de argila inferiores a 60% (classes texturais 2, 3 e 4). Exemplos do gênero *Fimoscolex* foram coletados em solo contendo 43% de argila (Figura 4.1). De acordo com Fragoso et al. (1999), solos com elevados teores de argila (≥ 70%) podem não ser apropriados para *P. corethrurus*. Os dados encontrados neste trabalho estão de acordo com esta afirmação, pois esta espécie foi encontrada em solos de classe textural 3 e 4, contendo até 40% de argila (Figura 4.1).

Existem 429 espécies de Glossoscolecidae na América do Sul, sendo o gênero *Glossoscolex* o mais diversificado (CHRISTOFFERSEN, 2010). As espécies

do gênero *Glossoscolex* são todas endêmicas do continente sul-americano (CHRISTOFFERSEN, 2007). Neste trabalho, a maioria dos exemplares coletados e das novas espécies encontradas pertence ao gênero *Glossoscolex* (Tabela 4.1).

Christoffersen (2007) compilou as informações disponíveis sobre a diversidade e a distribuição de minhocas do gênero *Glossoscolex* na América do Sul. Segundo o autor, as minhocas correspondem a um negligenciado grupo zoológico em um megadiverso continente amostrado apenas superficialmente.

A espécie nativa *Glossoscolex uruguayensis uruguayensis* foi encontrada em solos com valores médios de $CTC_{pH7,0}$ e elevados teores de cálcio e potássio. O pH dos solos variaram entre baixo e alto, os teores de fósforo entre muito baixo e médio, o teor de magnésio entre médio e alto, e o conteúdo de matéria orgânica e a $CTC_{efetiva}$ entre baixo e médio (Tabelas 4.2, 4.3, 4.4 e 4.5).

G. uruguayensis uruguayensis Cordero (1943), sinônimo de *G. uruguayensis* Cordero (1943), possui distribuição na Argentina, no Uruguai e no Brasil, cuja ocorrência já havia sido registrada no município de São Leopoldo (RS) (CHRISTOFFERSEN, 2007). Segundo Ljungström (1972), a espécie *G. uruguayensis* Cordero (1943) é sinônimo de *G. corderoi* Righi (1968).

As demais espécies do gênero *Glossoscolex* podem não apresentar seletividade a solos em relação à acidez, aos teores de fósforo, potássio, cálcio, magnésio, matéria orgânica e CTC. Os juvenis da família Glossoscolecidae apresentaram este mesmo comportamento, com exceção do teor de fósforo e do conteúdo de matéria orgânica, sendo encontrados em solos contendo baixos teores de fósforo e conteúdo de matéria orgânica variando entre baixo e médio (Tabelas 4.2, 4.3, 4.4 e 4.5).

Maior número de espécies de minhocas foi observado em solos com valores de pH muito baixos, teores de matéria orgânica de até 5% (Tabela 4.2), teores de fósforo muito baixos e altos níveis de potássio (Tabela 4.3), cálcio e magnésio (Tabela 4.4).

A ocorrência da espécie nativa *Urobenus brasiliensis* esteve associada a ambientes pouco alterados pelo homem, sendo encontrada, principalmente, em fragmentos de mata nativa. Por ser epigéica e se alimentar de serrapilheira, necessita de matéria orgânica para sobreviver. No entanto, neste trabalho, *U. brasiliensis* foi encontrada em solos contendo teores baixos, médios e altos de

matéria orgânica (Tabela 4.2). O pH dos solos variaram entre muito baixo, médio e alto, os teores de cálcio e a $CTC_{pH7,0}$ entre médio e alto. Esta espécie pode não apresentar seletividade a solos em relação aos teores de fósforo, potássio e magnésio. Os valores de $CTC_{efetiva}$ dos solos variaram entre baixo, médio e alto (Tabelas 4.2, 4.3, 4.4 e 4.5).

Tabela 4.2 – Frequência de ocorrência das espécies de minhocas em solos com diferentes valores de pH e conteúdos de matéria orgânica.

| Gênero/espécie | pH | | | | Matéria orgânica | | |
|------------------------------------|-----------|----------|----------|----------|------------------|-----------|----------|
| | MB | B | M | A | B | M | A |
| <i>Amyntas corticis</i> | 1 | 1 | 3 | - | - | 4 | 1 |
| <i>Amyntas gracilis</i> | 7 | 4 | 8 | 6 | 12 | 10 | 3 |
| <i>Aporrectodea trapezoides</i> | - | - | 1 | - | - | 1 | - |
| <i>Eukerria</i> n. sp. 1 | 3 | - | - | - | 2 | 1 | - |
| <i>Eukerria saltensis</i> | 1 | - | 1 | 1 | 2 | 1 | - |
| <i>Fimoscolex</i> n. sp. 1 | - | 1 | - | - | - | 1 | - |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 1 | 2 | 1 | 1 | - | 2 | 1 | 1 |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 2 | 2 | - | - | - | 1 | 1 | - |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 3 | 1 | - | - | - | 1 | - | - |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 4 | 1 | - | - | - | - | 1 | - |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 5 | 1 | - | - | - | - | 1 | - |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 6 | - | 1 | - | - | 1 | - | - |
| <i>Glossoscolex</i> sp. | 1 | 1 | 1 | 3 | 5 | - | 1 |
| <i>Glossoscolex uruguayensis</i> * | - | 1 | - | 1 | 1 | 1 | - |
| Juvenis de Glossoscolecidae | 3 | 2 | 1 | - | 4 | 2 | - |
| <i>Kerria</i> n. sp. 1 | 1 | - | - | - | - | - | 1 |
| <i>Metaphire californica</i> | 2 | - | - | 1 | 2 | 1 | - |
| <i>Microscolex dubius</i> | 1 | - | - | 1 | 1 | 1 | - |
| Nova espécie de Criodrilidae | 1 | - | - | - | 1 | - | - |
| <i>Ocnerodrilus</i> sp. | 1 | - | - | - | - | 1 | - |
| <i>Pontoscolex corethrurus</i> | 8 | 2 | 1 | 1 | 8 | 4 | - |
| <i>Urobenus brasiliensis</i> | 1 | - | 5 | 1 | 2 | 4 | 1 |
| Total de espécies | 18 | 9 | 9 | 8 | 15 | 17 | 6 |

**Glossoscolex uruguayensis uruguayensis*. Valor do pH em água: MB = muito baixo ($\leq 5,0$), B = baixo (5,1 – 5,4), M = médio (5,5 – 6,0) e A = alto ($> 6,0$). Matéria orgânica (%): B = baixo ($\leq 2,5$), M = médio (2,6 – 5,0) e A = alto ($> 5,0$).

Tabela 4.3 – Frequência de ocorrência das espécies de minhocas em solos com diferentes teores de fósforo e potássio.

| Gênero/espécie | Fósforo | | | | | Potássio | | | | |
|------------------------------------|-----------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|----------|
| | MB | B | M | A | MA | MB | B | M | A | MA |
| <i>Amyntas corticis</i> | 2 | 1 | - | - | 1 | 1 | - | - | - | - |
| <i>Amyntas gracilis</i> | 7 | 6 | 3 | 2 | 8 | 1 | 3 | - | 10 | 12 |
| <i>Aporrectodea trapezoides</i> | - | - | - | - | 1 | - | - | - | 1 | - |
| <i>Eukerria</i> n. sp. 1 | 1 | 1 | 1 | - | - | - | - | 2 | 1 | - |
| <i>Eukerria saltensis</i> | 1 | - | - | 1 | 1 | - | 1 | 1 | - | 1 |
| <i>Fimoscolex</i> n. sp. 1 | 1 | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 1 | 1 | - | - | 2 | 1 | - | - | - | 2 | 2 |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 2 | 1 | 1 | - | - | - | - | 1 | 1 | - | - |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 3 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 4 | - | 1 | - | - | - | - | - | 1 | - | - |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 5 | 1 | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 6 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - |
| <i>Glossoscolex</i> sp. | - | 2 | - | 2 | 2 | - | 1 | 1 | 3 | 1 |
| <i>Glossoscolex uruguayensis</i> * | 1 | - | 1 | - | - | - | - | - | 1 | 1 |
| Juvenis de Glossoscolecidae | 5 | 1 | - | - | - | 1 | - | 2 | 1 | 2 |
| <i>Kerriona</i> n. sp. 1 | - | 1 | - | - | - | - | - | - | 1 | - |
| <i>Metaphire californica</i> | 2 | - | - | 1 | - | - | - | - | 3 | - |
| <i>Microscolex dubius</i> | 2 | - | - | - | - | - | 1 | 1 | - | - |
| Nova espécie de Criodrilidae | - | - | 1 | - | - | - | - | - | 1 | - |
| <i>Ocnerodrilus</i> sp. | - | 1 | - | - | - | - | - | 1 | - | - |
| <i>Pontoscolex corethrurus</i> | 3 | 4 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 4 | 4 | 1 |
| <i>Urobenus brasiliensis</i> | 4 | 2 | - | 2 | - | - | 1 | 2 | 1 | 4 |
| Total de espécies | 16 | 11 | 5 | 7 | 7 | 5 | 7 | 11 | 14 | 8 |

**Glossoscolex uruguayensis uruguayensis*. Teores de fósforo (mg dm^{-3}): MB = muito baixo ($\leq 5,0$), B = baixo ($5,1 - 10,0$), M = médio ($10,1 - 20,0$), A = alto ($20,1 - 40,0$) e MA = muito alto ($> 40,0$). Teores de potássio ($\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$) se $\text{CTC}_{\text{pH}7,0} > 15$: MB = muito baixo (≤ 30), B = baixo ($31 - 60$), M = médio ($61 - 90$), A = alto ($91 - 180$) e MA = muito alto (> 180); se $\text{CTC}_{\text{pH}7,0}$ entre 5,1 e 15,0: MB = muito baixo (≤ 20), B = baixo ($21 - 40$), M = médio ($41 - 60$), A = alto ($61 - 120$) e MA = muito alto (> 120); se $\text{CTC}_{\text{pH}7,0} \leq 5,0$: MB = muito baixo (≤ 15), B = baixo ($16 - 30$), M = médio ($31 - 45$), A = alto ($46 - 90$) e MA = muito alto (> 90).

A nova espécie do gênero *Kerriona* foi encontrada em solo de várzea com valor de pH muito baixo, baixo teor de fósforo e altos teores de potássio, cálcio, magnésio e matéria orgânica (Tabelas 4.2, 4.3 e 4.4).

Tabela 4.4 – Frequência de ocorrência das espécies de minhocas em solos com diferentes teores de cálcio e magnésio.

| Gênero/espécie | Cálcio | | | Magnésio | | |
|---|----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|
| | B | M | A | B | M | A |
| <i>Amyntas corticis</i> | 1 | - | 4 | 1 | - | 4 |
| <i>Amyntas gracilis</i> | 4 | 5 | 17 | 6 | 4 | 16 |
| <i>Aporrectodea trapezoides</i> | - | 1 | - | - | 1 | - |
| <i>Eukerria</i> n. sp. 1 | - | - | 3 | - | - | 3 |
| <i>Eukerria saltensis</i> | - | - | 3 | - | - | 3 |
| <i>Fimoscolex</i> n. sp. 1 | 1 | - | - | 1 | - | - |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 2 | - | - | 2 | - | - | 2 |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 3 | - | 1 | - | 1 | - | - |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 4 | - | - | 1 | - | - | 1 |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 5 | - | 1 | - | - | 1 | - |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 6 | 1 | - | - | 1 | - | - |
| <i>Glossoscolex</i> sp. | 2 | 4 | - | 2 | 3 | 1 |
| <i>Glossoscolex uruguayensis uruguayensis</i> | - | - | 2 | - | 1 | 1 |
| Juvenis de Glossoscolecidae | 3 | 1 | 2 | 2 | 1 | 3 |
| <i>Kerriana</i> n. sp. 1 | - | - | 1 | - | - | 1 |
| <i>Metaphire californica</i> | 2 | - | 1 | 2 | - | 1 |
| <i>Microscolex dubius</i> | - | 1 | 1 | - | 1 | 1 |
| Nova espécie de Criodrilidae | - | - | 1 | - | - | 1 |
| <i>Ocnerodrilus</i> sp. | - | - | 1 | - | - | 1 |
| <i>Pontoscolex corethrurus</i> | 3 | 5 | 4 | 3 | 6 | 3 |
| <i>Urobenus brasiliensis</i> | - | 2 | 6 | 2 | - | 6 |
| Total de espécies | 9 | 10 | 16 | 11 | 9 | 17 |

Teores de cálcio ($\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$): B = baixo ($\leq 2,0$), M = médio (2,1 – 4,0) e A = alto ($> 4,0$). Teores de magnésio ($\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$): B = baixo ($\leq 0,5$), M = médio (0,6 – 1,0) e A = alto ($> 1,0$).

Exemplares do gênero *Ocnerodrilus* foram coletados em solo ácido (pH muito baixo), com baixos valores de fósforo e $\text{CTC}_{\text{efetiva}}$, teores médios de potássio, matéria orgânica e $\text{CTC}_{\text{pH}7,0}$, porém com elevados teores de cálcio e magnésio (Tabelas 4.2, 4.3, 4.4 e 4.5).

Ocnerodrilus occidentalis (Eisen, 1878), espécie epigéica de hábito aquático, foi encontrada em um canal de água localizado em uma floresta de pinus em Gran Canaria (Ilhas Canárias) (TALAVERA, 2007). Os fatores edáficos indicam que os

solos onde vivem exemplares de *O. occidentalis* são úmidos, levemente alcalinos, pobres em matéria orgânica e moderadamente oxigenados (TALAVERA, 1990).

Tabela 4.5 – Frequência de ocorrência das espécies de minhocas em solos com diferentes valores de $CTC_{pH7,0}$ e $CTC_{efetiva}$.

| Gênero/espécie | $CTC_{pH7,0}$ | | | MB | $CTC_{efetiva}$ | | |
|------------------------------------|---------------|-----------|-----------|----------|-----------------|----------|----------|
| | B | M | A | | B | M | A |
| <i>Amyntas corticis</i> | - | 2 | 4 | - | 2 | 1 | 2 |
| <i>Amyntas gracilis</i> | 1 | 12 | 13 | - | 12 | 6 | 8 |
| <i>Aporrectodea trapezoides</i> | - | 1 | - | - | 1 | - | - |
| <i>Eukerria</i> n. sp. 1 | - | 1 | 2 | - | 1 | 1 | 1 |
| <i>Eukerria saltensis</i> | - | 2 | 1 | - | 2 | - | 1 |
| <i>Fimoscolex</i> n. sp. 1 | - | - | 1 | - | 1 | - | - |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 1 | - | 4 | - | - | 4 | - | - |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 2 | - | 1 | 1 | - | 1 | 1 | - |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 3 | - | 1 | - | - | 1 | - | - |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 4 | - | 1 | - | - | 1 | - | - |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 5 | - | 1 | - | - | 1 | - | - |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp. 6 | 1 | - | - | - | 1 | - | - |
| <i>Glossoscolex</i> sp. | 2 | 4 | - | - | 6 | - | - |
| <i>Glossoscolex uruguayensis</i> * | - | 2 | - | - | 1 | 1 | - |
| Juvenis de Glossoscolecidae | 2 | 2 | 1 | - | 4 | 1 | - |
| <i>Kerria</i> n. sp. 1 | - | 1 | - | - | - | 1 | - |
| <i>Metaphire californica</i> | - | 2 | 1 | - | 2 | - | 1 |
| <i>Microscolex dubius</i> | - | 2 | - | - | 2 | - | - |
| Nova espécie de Criodrillidae | - | - | 1 | - | - | - | 1 |
| <i>Ocnerodrilus</i> sp. | - | 1 | - | - | 1 | - | - |
| <i>Pontoscolex corethrurus</i> | 1 | 10 | - | - | 10 | 1 | - |
| <i>Urobenus brasiliensis</i> | - | 4 | 4 | - | 4 | 1 | 3 |
| Total de espécies | 5 | 19 | 10 | 0 | 20 | 9 | 7 |

**Glossoscolex uruguayensis uruguayensis*. Valores de $CTC_{pH7,0}$ ($cmol_c dm^{-3}$): B = baixo ($\leq 5,0$), M = médio (5,1 – 15) e A = alto ($> 15,0$). Valores de $CTC_{efetiva}$ (%): MB = muito baixo ($< 1,0$), B = baixo (1,0 – 10,0), M = médio (10,1 – 20,0) e A = alto ($> 20,0$).

Os organismos presentes em uma determinada área são reflexos das inter-relações entre características do solo, clima e vegetação. Em solos agrícolas, além destas variáveis, o tipo de uso e manejo adotado, bem como o uso de insumos e a

introdução de novas espécies vegetais também interferem na população de organismos edáficos, refletindo na diversidade de espécies (FRAGOSO et al., 1999). Os dados observados neste trabalho estão de acordo com as afirmações de Fragoso et al. (1999), sendo verificada baixa diversidade de minhocas em áreas de lavoura agrícola e a ocorrência de espécies adaptadas a ambientes antropizados, tais como *P. corethrurus* e *A. gracilis* (Tabela 4.1).

Segundo levantamento realizado por Bartz (2011) no Estado do Paraná, algumas espécies nativas de minhocas sobrevivem em áreas agrícolas manejadas sob sistema plantio direto, embora em baixas densidades. Neste trabalho, apenas espécies exóticas foram encontradas em áreas de lavoura, o que pode ser um indicativo de que o sistema agrícola adotado pelos agricultores nas áreas avaliadas está causando impactos negativos sobre a comunidade de organismos do solo.

Embora o sistema de plantio direto (SPD) seja reconhecido como um sistema agrícola de baixo impacto ambiental, Domínguez et al. (2010) acreditam que, quando não realizado de forma satisfatória (produção de palhada suficiente e rotação com culturas de cobertura), esse sistema pode resultar na degradação física, química e biológica do solo. Comparando áreas agrícolas manejadas em SPD e pastagens naturais, Domínguez et al. (2010) observaram redução na abundância de minhocas, o que atribuíram ao intenso uso de agroquímicos, e alterações na comunidade de macrofauna edáfica nas áreas em SPD, provavelmente por causa da alta compactação e ao menor conteúdo de matéria orgânica.

Os solos habitados pelas espécies exóticas *A. gracilis* e *A. corticis*, bem como pela espécie nativa peregrina *P. corethrurus* apresentaram variações nos teores de nutrientes, valor de pH e conteúdo de matéria orgânica (Tabelas 4.2, 4.3 e 4.4). Provavelmente, a presença dessas espécies esteja relacionado à sua alta adaptabilidade à maioria dos habitats e tipos de solo, o que explica a elevada disseminação que apresentam em nível mundial. O trabalho realizado por Fernandes et al. (2010) sugere que minhocas do gênero *Amyntas* apresentam potencial para bioindicação de ambientes perturbados em áreas de Floresta Atlântica e para colonização de novos ambientes.

As espécies *A. gracilis* e *Aporrectodea caliginosa* apresentam ampla tolerância quanto ao clima e a tipos de solo. No entanto, não estão definidas as preferências em relação ao conteúdo de matéria orgânica do solo (FALCO; MOMO,

2010). Neste trabalho, *A. gracilis* foi encontrada em solos contendo teores baixos, médios e altos de matéria orgânica (Tabela 4.2).

Avaliando a seletividade de habitats das espécies exóticas *A. gracilis* e *A. caliginosa*, em relação ao conteúdo de matéria orgânica do solo e à presença de folhas de carvalho (*Quercus robur*), Falco e Momo (2010) observaram, em condições de laboratório, que as espécies respondem de forma diferenciada às alterações de ambiente aos quais foram expostas. A espécie *A. gracilis* demonstrou preferência pelo solo com cobertura de folhas de carvalho, um comportamento típico de minhoca epi-endogéica. No entanto, não foi observada interação significativa entre o conteúdo de matéria orgânica do solo e a presença de folhas. Esta espécie não apresentou resposta diferenciada ao teor de matéria orgânica dos solos avaliados (solo 1: 5,1% de M.O. e solo 2: 3,27% de M.O.), corroborando com os dados observados neste trabalho (Tabela 4.2).

Exemplares de *Aporrectodea trapezoides* (Lumbricidae) foram coletados em monocultivo de pinus, cujo solo apresentava valores médios de pH, cálcio, magnésio, matéria orgânica (2,8%) e $CTC_{pH7,0}$. Os teores de fósforo e potássio encontravam-se muito alto e alto, respectivamente, e o valor de $CTC_{efetiva}$ estava baixo (Tabelas 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 e 4.5).

A. trapezoides é uma espécie anécica dominante em florestas de pinus nas Ilhas de Tenerife e Gran Canaria (Ilhas Canárias, Espanha), a qual tolera bem variações edáficas em ambientes expostos a condições climáticas adversas e alterados pela ocupação humana (TALAVERA, 2007). Segundo o mesmo autor, esta espécie foi encontrada em solos das Ilhas Canárias, apresentando as seguintes características: valores de pH entre 5,9 e 7,3; teores de matéria orgânica entre 1,5 e 18,5; teores de cálcio variando entre 3,4 e 21,5; e teores de potássio entre 0,4 e 4,5.

Microscolex dubius foi a única espécie da família Acanthodrilidae coletada neste trabalho. Esteve presente em solos com baixos teores de argila ($\leq 20\%$), níveis de fósforo muito baixos, com variações no valor de pH (muito baixo e alto), nos teores de matéria orgânica (baixo e médio), potássio (baixo e médio), cálcio e magnésio (médio e alto) (Figura 4.1, Tabelas 4.2, 4.3 e 4.4).

O clima é um fator que influencia a ocorrência de espécies das famílias Acanthodrilidae e Lumbricidae. Segundo James e Brown (2006), a distribuição de minhocas da família Acanthodrilidae (principalmente *Microscolex* spp.), assim como

da Lumbricidae (com exceção das espécies utilizadas para vermicompostagem, *Eisenia fetida* e *E. andrei*) é restrita à região sul do Brasil, particularmente ao Estado do RS, onde o clima subtropical é mais frio e semelhante ao clima das regiões de origem destas minhocas no hemisfério norte.

A espécie exótica *Metaphire californica* foi encontrada em solos com distintas variações no valor de pH, demonstrando que, possivelmente, não seja sensível a este parâmetro de solo. A $CTC_{efetiva}$ e os teores de cálcio e magnésio dos solos habitados por esta espécie variaram entre baixo e alto, e o conteúdo de matéria orgânica variou entre baixo e médio. O teor de potássio dos solos foi alto e os valores de $CTC_{pH7,0}$ variaram entre médio e alto (Tabelas 4.2, 4.3, 4.4 e 4.5).

Fragoso et al. (1999) estabeleceram condições edáficas consideradas limite para a presença de *M. californica*. Segundo os autores, esta espécie tolera solos com limite inferior de pH igual a 5,2, contendo entre 24 e 28% de argila, valores máximos de $5,8 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ de cálcio (Ca) e $3,5 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ de magnésio (Mg). Os dados obtidos neste trabalho concordam em parte com os apresentados por Fragoso et al. (1999). *M. californica* foi encontrada em solo com pH 4,3 e 16% de argila, demonstrando que, possivelmente, esta espécie apresenta amplitude de tolerância a solos mais ácidos e arenosos (Tabela 4.2, Figura 4.1). Em relação aos teores de Ca e Mg, os dados do presente trabalho corroboraram com Fragoso et al. (1999), sendo que o solo apresentou $1,1$ e $0,4 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ de Ca e Mg respectivamente (Tabela 4.4).

Os exemplares da nova espécie da família Criodrillidae foram coletados em solo que apresentava valor de pH muito baixo, baixo conteúdo de matéria orgânica, teor médio de fósforo e elevados teores de potássio, cálcio, magnésio, $CTC_{efetiva}$ e $CTC_{pH7,0}$ (Tabelas 4.2, 4.3, 4.4 e 4.5).

Os solos onde foram coletadas minhocas da espécie *Eukerria saltensis* apresentaram valores de pH muito baixo, médio e alto, baixo percentual de matéria orgânica e elevados teores cálcio e magnésio. O teor de potássio variou entre baixo, médio e muito alto, o teor de fósforo entre muito baixo, alto e muito alto, a $CTC_{efetiva}$ variou entre baixa e alta e a $CTC_{pH7,0}$ entre média e alta (Tabelas 4.2, 4.3, 4.4 e 4.5). Esta espécie foi encontrada em áreas nativas (mata nativa) e antropizadas (lavoura) (Tabela 4.1).

Minhocas da espécie *E. saltensis* habitam, geralmente, solos encharcados ou irrigados, cursos de água, esgotos, cultivos de arroz, cana-de-açúcar e pastagens, podendo sobreviver em solos argilosos (BLAKEMORE et al., 2006). Quando presentes em cultivos irrigados, a drenagem do solo e a implantação de culturas de sequeiro resultam na redução da população desta espécie (STEVENS, 2003).

A ocorrência de *E. saltensis*, espécie semi-aquática originária da América do Sul e disseminada mundialmente pelo homem (BLAKEMORE et al., 2006) tem sido reportada no Japão (BLAKEMORE et al., 2006) e na Austrália, em áreas cultivadas com a rotação arroz/pastagem (BLACKWELL; BLACKWELL, 1989). A presença de elevadas densidades desta espécie em áreas de cultivo de arroz na Austrália, tem sido associada a danos à cultura do arroz (STEVENS; WARREN, 2000).

Em Samford (Austrália), exemplares de *E. saltensis* foram coletados em solo argiloso muito úmido, na profundidade de 5 a 10cm e em zona ativa de raízes, estando associada a outras espécies de minhocas, inclusive *Aporrectodea trapezoides* (BLAKEMORE et al., 2006). *E. saltensis* foi encontrada em cultivo de arroz intensamente alterado no Uruguai, associada à zona radicular de plantas de arroz, podendo desempenhar papel importante na fertilidade e produtividade destes sistemas agrícolas (GROSSO et al., 2006).

A nova espécie do gênero *Eukerria* foi coletada em três diferentes ecossistemas: banhado, pastagem cultivada e várzea em pousio (Tabela 4.1). Os solos destes ambientes apresentavam as seguintes características: pH muito baixo, altos teores de cálcio e magnésio, teores de fósforo entre muito baixo e médio, teores de potássio e $CTC_{pH7,0}$ entre médio e alto, conteúdo de matéria orgânica variando entre baixo e médio, e valores de $CTC_{efetiva}$ variando entre baixo, médio e alto (Tabelas 4.2, 4.3, 4.4 e 4.5). Com exceção da pastagem cultivada, o solo das demais áreas apresentava elevado teor de umidade.

Estudos indicam que alguns fatores ambientais são responsáveis e determinantes do êxito de espécies exóticas em adaptar-se a novos habitats, inserindo-se permanentemente neles. Dentre os fatores principais estão a temperatura, a umidade (SATCHELL, 1967; LAL, 1988; MOMO et al., 1993), o conteúdo de matéria orgânica (MOMO et al., 1993), sendo que o valor de pH, os conteúdos de fósforo e cálcio, o nível de compactação e o grau de perturbação do

solo (DECAËNS; JIMÉNEZ, 2002), o tipo e a extensão da cobertura vegetal (FALCO et al., 1995) também são fatores relevantes.

A diversidade e a extensão da cobertura vegetal relacionam-se diretamente com a temperatura, a umidade e o conteúdo de matéria orgânica do solo. A cobertura permanente do solo fornece alimento continuamente e proteção contra predadores, além de reduzir flutuações na temperatura do solo (LAVELLE; SPAIN, 2001; SILVA et al., 2006). Essa condição pode favorecer o crescimento e o desenvolvimento das minhocas já estabelecidas (PAOLETTI, 1999).

A atividade de minhocas, além de alterar a estrutura física do solo, pode promover mudanças na fertilidade, através da concentração de nutrientes na superfície do solo pela intensa deposição de coprólitos. Segundo Fiuza et al. (2011), a maior qualidade química dos coprólitos é explicada pelo efeito de concentração de carbono orgânico total (COT) e pelo aumento da atividade microbiana, que acelera os processos de mineralização, aumentando a saturação por bases e reduzindo os teores de alumínio trocável (Al^{3+}).

De acordo com Oliveira e Santos (2009), as minhocas interferem nas características químicas da matéria orgânica, reduzindo o alumínio, aumentando a soma de bases e a CTC, fazendo com que determinados nutrientes tornem-se mais disponíveis para plantas e microrganismos. Segundo Kiehl (1985), a mistura da matéria orgânica com excreções intestinais e urinárias das minhocas, resulta em um material mais avançado na decomposição, favorecendo o processo de mineralização dos nutrientes.

Neste trabalho, não foi avaliado o teor de nutrientes de coprólitos das minhocas coletadas. No entanto, é possível que a atividade das minhocas, principalmente a ingestão de alimentos e a eliminação de excrementos, tenha promovido alterações na superfície do solo, onde a maioria dos coprólitos são eliminados. Como as amostras de solo foram coletadas na camada de 0 a 20cm, é provável que estes efeitos não tenham sido observados significativamente na caracterização química dos solos, devido à homogeneização da amostra.

No Brasil, questões relativas à conservação de espécies nativas tendem a ser relacionadas com o tamanho da minhoca, com a dimensão da área e a fragmentação do seu habitat original. Infelizmente, pouco se conhece sobre a biologia das minhocas e as necessidades relativas ao ambiente onde a maioria das

espécies estão presentes. O período é de descoberta e descrição de novas espécies no Brasil (JAMES; BROWN, 2010).

Com a constante transformação de habitats e destruição de ambientes originais (preservados), existe a preocupação de assegurar a preservação de espécies nativas de minhocas no país. De acordo com James e Brown (2010), a efetiva conservação da diversidade de minhocas depende, primeiramente, de uma adequada caracterização da sensibilidade das espécies à perturbação do ambiente, da situação atual e das tendências de preservação da integridade destes habitats.

Viana e Pinheiro (1998) discutem a definição de fragmentos florestais prioritários para a conservação da diversidade. Os autores sugerem que o elemento chave para a recuperação qualitativa de paisagens visando a conservação da biodiversidade é a utilização de fragmentos florestais como “ilhas de biodiversidade” e a interligação destes através de corredores de alta porosidade. Além dos grandes fragmentos, devem ser priorizados fragmentos pequenos (<10 ha), que sejam raros na paisagem, como aqueles localizados em topografias planas e suaves, em solos férteis e bem drenados, próximos a vias de transporte. Em muitos casos, estes fragmentos apresentam pequenas populações de espécies ameaçadas de extinção.

Neste sentido, a caracterização edafo-ambiental dos ecossistemas habitados por minhocas, à semelhança do trabalho desenvolvido neste estudo, é uma ferramenta fundamental e aliada da preservação da diversidade de oligoquetas.

Os resultados obtidos neste trabalho reforçam a importância da manutenção da integridade de ecossistemas naturais (campo nativo, mata nativa e fragmentos) e da qualidade dos solos de cultivos agrícolas e florestais. Pois a descoberta de novas espécies em ecossistemas do Estado do RS sugere a necessidade de preservação dos ambientes para garantir a ocorrência de minhocas e evitar a sua extinção, antes mesmo do comportamento destes organismos no ecossistema ser conhecido pelos pesquisadores.

Assim, novos levantamentos da diversidade de minhocas em agroecossistemas do RS são necessários para avaliar o comportamento e complementar o estudo da relação entre a ocorrência de espécies e as características edáficas dos ambientes.

4.5 Conclusões

No Estado do Rio Grande do Sul, nos diferentes ecossistemas avaliados, foram encontradas 21 espécies de minhocas.

Foi observada maior ocorrência de espécies de minhocas em solos com valores de pH muito baixos, teores de matéria orgânica de até 5%, teores de fósforo muito baixos e altos níveis de potássio, cálcio e magnésio.

O grau de perturbação dos ecossistemas e o uso do solo interferem na presença de minhocas, seguido pelas características físicas e químicas do solo.

4.6 Referências bibliográficas

AGUIAR, R. Estiagem: como conviver com esse fenômeno? **Extensão Rural e Desenvolvimento Sustentável**, Porto Alegre, v. 1, n. 4, p. 11-14, nov./dez. 2005.

AIRA, M.; DOMÍNGUEZ, J. Microbial and nutrient stabilization of two animal manures after the transit through the gut of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny, 1826). **Journal of Hazardous Materials**, Buffalo, v. 161, n. 2-3, p. 1234-1238, Jan. 2009.

ANDERSON, J. M. Why should we care about soil fauna? **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 8, p. 835-842, Aug. 2009.

BARTZ, M. L. C. **Ocorrência e taxonomia de minhocas em agroecossistemas no Paraná, Brasil**. 2011. 175f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

BERLATO, M. A.; FONTANA, D. C. **El Niño e La Niña: impactos no clima, na vegetação e na agricultura do Rio Grande do Sul; aplicações de previsões climáticas na agricultura**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2003. 110p.

BLACKWELL, P. S.; BLACKWELL, J. The introduction of earthworms to an ameliorated, irrigated duplex soil in south-eastern Australia and the influence on macropores. **Australian Journal of Soil Research**, Collingwood, v. 27, n. 4, p. 807-814, 1989.

BLAKEMORE, R. J. **Cosmopolitan earthworms – an eco-taxonomic guide to the peregrine species of the world**. Kippax: VermEcology. CD-ROM, 2002.

BLAKEMORE, R. J.; ITO, M. T.; KANEKO, N. Alien earthworms in the Asia/Pacific region with a checklist of species and the first records of *Eukerria saltensis* (Oligochaeta : Ocnerodrilidae) and *Eiseniella tetraedra* (Lumbricidae) from Japan, and *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae) from Okinawa. In: KOIKE, F. et al. (Eds). **Assessment and Control of Biological Invasion Risks**. Shoukadoh Book Sellers, Kyoto, Japan and IUCN, Gland, Switzerland, 2006. p. 173-181.

BHADAURIA, T.; SAXENA, K. G. Role of earthworms in soil fertility maintenance through the production of biogenic structures. **Applied and Environmental Soil Science**, Perth, v. 2010, p. 1-7, 2010.

BROWN, G. G. et al. Biodiversity and function of soil animals in Brazilian agroforestry systems. In: GAMA-RODRIGUES, A. C. et al. (Eds.). **Sistemas agroflorestais: bases científicas para o desenvolvimento sustentado**. UENF, Campos dos Goytacazes, 2006, p. 217-242.

BROWN, G. G. et al. Exotic, Peregrine, and Invasive Earthworms in Brazil: Diversity, Distribution, and Effects on Soils and Plants. **Caribbean Journal of Science**, Puerto Rico, v. 42, n. 3, p. 339-358, Dec. 2006.

BROWN, G. G.; DOMÍNGUEZ, J. Uso das minhocas como bioindicadoras ambientais: princípios e práticas – o 3º Encontro Latino Americano de Ecologia e Taxonomia de Oligoquetas (ELAETAO3). **Acta Zoológica Mexicana** (n.s.), Xalapa, v. 26, Número Especial 2, p. 1-18, Oct. 2010.

CENTRO ESTADUAL DE METEOROLOGIA (CemetRS). **Atlas climático do Rio Grande do Sul**. FEPAGRO, Porto Alegre, 2012 (versão online).

CHRISTOFFERSEN, M. L. Biodiversity and distribution of the Glossoscolex genus-group (Annelida, Clitellata, Lumbricina, Glossoscolecidae) in South America. **Neotropical Biology and Conservation**, São Leopoldo, v. 2, n. 3, p. 155-160, Sept./Dec. 2007.

CHRISTOFFERSEN, M. L. Continental biodiversity of South American oligochaetes: the importance of inventories. **Acta Zoológica Mexicana** (n.s.), Xalapa, v. 26, Número Especial 2, p. 35-46, Oct. 2010.

COLEMAN, D. C.; WHITMAN, W. B. Linking species richness, biodiversity and ecosystem function in soil systems. **Pedobiologia**, v. 49, n. 6, p. 479-497, Nov. 2005.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO – CQFS-RS/SC. Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Porto Alegre, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo/Núcleo Regional Sul, 2004. 400p.

CORREIA, M. E. F.; OLIVEIRA, L. C. M. de. Importância da fauna de solo para a ciclagem de nutrientes. In: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. (Eds.). **Processos biológicos no sistema solo - planta: ferramentas para uma agricultura sustentável**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005, p. 77-99.

DECAËNS, T.; JIMÉNEZ, J. J. Earthworm communities under an agricultural intensification gradient in Colombia. **Plant and Soil**, Hague, v. 240, n. 1, p. 133-143, Mar. 2002.

DE-POLLI, H.; PIMENTEL, M. S. Indicadores de qualidade do solo. In: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. (Eds.). **Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005, p.17-28.

DOMÍNGUEZ, A.; BEDANO, J. C.; BECKER, A. R. Negative effects of no-till on soil macrofauna and litter decomposition in Argentina as compared with natural grasslands. **Soil and Tillage Research**, Beckenham, v. 110, n. 1, p. 51-59, Sept. 2010.

EDWARDS, C. A.; ARANCON, N. Q. Interactions among organic matter, earthworms, and microorganisms in promoting plant growth. In: MAGDOFF, F.; RAY, R. W. **Soil organic matter in sustainable agriculture**. 2004. p. 327-376.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Manual de métodos de análises de solo. 2.ed. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997. 212p.

FALCO, L.; MOMO, F.; CRAIG, E. Asociaciones de lombrices de tierra y su relación con la cobertura vegetal en suelos forestados. **Revista Chilena de Historia Natural**, Santiago, v. 68, n. 4, p. 523-528, Dec. 1995.

FALCO, L. B.; MOMO, F. Selección de hábitat: efecto de la cobertura y tipo de suelo em lombrices de tierra. **Acta Zoológica Mexicana** (n.s.), Xalapa, v. 26, Número Especial 2, p. 179-187, Oct. 2010.

FERNANDES, J. O.; UEHARA-PRADO, M.; BROWN, G. G. Minhocas exóticas como indicadores de perturbação antrópica em áreas de Floresta Atlântica. **Acta Zoológica Mexicana** (n.s.), Xalapa, v. 26, Número Especial 2, p. 211-217, Oct. 2010.

FIUZA, S. da S.; KUSDRA, J. F.; FURTADO, D. T. Caracterização química e atividade microbiana de coprólitos de *Chibui bari* (Oligochaeta) e do solo adjacente. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 35, n. 3, p. 723-728, maio/jun. 2011.

FRAGOSO, C.; KANYONYO, J.; MORENO, A.; SENAPATI, B. K.; BLANCHART, E.; RODRIGUEZ, C. A survey of tropical earthworms: taxonomy, biogeography and environmental plasticity. In: LAVELLE, P.; BRUSSAARD, L.; HENDRIX, P. (Coord.) **Earthworm Management in Tropical Agroecosystems**. Oxon: CAB International, 1999. p. 01-25.

GIRARDI-DEIRO, A. M.; GOMES, K. E. Descrição do ecossistema das regiões sudoeste e sudeste do Rio Grande do Sul. In: OLIVEIRA, N. M. de. **Sistemas de Produção 2: Sistemas de criação de ovinos nos ambientes ecológicos do sul do Rio grande do Sul**. Embrapa. Centro de Pesquisa de Pecuária dos Campos Sulbrasilieiros, Bagé, 2003. p. 33-38.

GONZÁLEZ, G. et al. Earthworm invasions in the tropics. **Biological Invasions Belowground: Earthworms as Invasive Species**, Georgia, v. 8, n. 6, p. 1247-1256, Sept. 2006.

GROSSO, E.; JORGE, G.; BROWN, G. G. Exotic and native earthworms in various land use systems of Central, Southern and Eastern Uruguay. **Caribbean Journal of Science**, Puerto Rico, v. 42, n. 3, p. 294-300, Dec. 2006.

JAMES, S. W.; BROWN, G. G. Earthworm ecology and diversity in Brazil. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). **Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems**. Wallingford: CAB International, 2006. p. 56-116.

JAMES, S. W.; BROWN, G. G. Rediscovery of *Fimoscolex sporadochaetus* Michaelsen 1918 (Clitellata: Glossoscolecidae), and considerations on the endemism and diversity of Brazilian earthworms. **Acta Zoológica Mexicana** (n.s.), Xalapa, v. 26, Número Especial 2, p. 47-58, Oct. 2010.

JIMÉNEZ, J. J.; ROSSI, J. P.; LAVELLE, P. Spatial distribution of earthworms in acid-soil savannas of the eastern plains of Colombia. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.17, n. 3, p. 267-278, July 2001.

JOUQUET, P. et al. Soil invertebrates as ecosystem engineers: intended and accidental effects on soil and feedback loops. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 32, n. 2, p. 153- 164, June 2006.

KIEHL, E. J. **Fertilizantes Orgânicos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1985. p. 20-33.

LAL, R. Effects of macrofauna on soil properties in tropical ecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 24, n. 1-3, p. 101-116, Nov. 1988.

LAVELLE, P.; SPAIN, A. V. **Soil ecology**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2001.

LAVELLE, P. et al. Soil invertebrates and ecosystem services. **European Journal of Soil Biology**, Rouen, v. 42, s. 1, p. 3-15, Nov. 2006.

LAVELLE, P. Diversity of soil fauna and ecosystem function. **Biology International**, v. 9, n. 33, p. 3-16, 1996.

LIMA, A. C. R. de; BRUSSAARD, L. Earthworms as soil quality indicators: local and scientific knowledge in rice management systems. **Acta Zoológica Mexicana** (n.s.), Xalapa, v. 26, Número Especial 2, p. 109-116, Oct. 2010.

LIMA, S. S. de et al. Relação entre macrofauna edáfica e atributos químicos do solo em diferentes agroecossistemas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 3, p. 322-331, mar. 2010.

LJUNGSTRÖM, P. O. Biology of *Glossoscolex uruguayensis* (Glossoscolecidae, Oligochaeta). A new species for Argentina. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, Tübingen, v. 7, n. 2, p. 195-205, 1972.

MALUF, J. R. T. Nova classificação climática do Estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v. 8, n. 1, p. 141-150, 2000.

MARCHÃO, R. L. et al. Soil macrofauna under integrated crop-livestock systems in a Brazilian Cerrado Ferralsol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 8, p. 1011-1020, Aug. 2009.

MOMO, F. R.; GIOVANETTI, C. M.; MALACALZA, L. Relación entre la abundancia de distintas especies de lombrices de tierra (Annelids, Oligochaeta) y algunos parámetros fisicoquímicos en un suelo típico de la estepa pampeana. **Ecología Austral**, Buenos Aires, v. 3, n. 1, p. 7-14, Ago. 1993.

MOMO, F. R.; FALCO, L. B. Meso fauna del suelo. Biología y ecología. In: ALBANESI, A. et al. (Eds.). **Microbiología agrícola**. Un aporte de la investigación argentina. Editorial de la Universidad Nacional de Santiago del Estero, Santiago del Estero, 2003. p. 51-58.

MORENO, J. A. **Clima do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul, 1961. 42p.

NUNES, D. H. et al. Minhocas como bioindicadoras da qualidade ambiental. Um estudo de caso na região de Jaguapitã, PR, Brasil. In: BROWN, G. G.; FRAGOSO, C. (Eds.). **Minhocas na América Latina: Biodiversidade e ecologia**. Londrina: Embrapa Soja, 2007. p. 467-480.

OLIVEIRA, E. M. de.; SANTOS, M. J. dos. Influência das minhocas sobre as características químicas de composto, vermicomposto e solo. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 6, n. 1, p. 74-81, jan./abr. 2009.

PAOLETTI, M. G. The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 74, p. 137–155, 1999.

PEIGNÉ, J. et al. Earthworm populations under different tillage systems in organic farming. **Soil and Tillage Research**, Beckenham, v. 104, n. 2, p. 207-214, July 2009.

PEIXOTO, R. T. dos G.; MAROCHI, A. I. A influência da minhoca *Pheretima* sp. nas propriedades de um latossolo vermelho escuro álico e no desenvolvimento de culturas em sistema de plantio direto, em Arapoti-PR. **Revista Plantio Direto**, Passo Fundo, v. 35, p. 23-25, 1996.

PEZZA, A. B.; AMBRIZZI, T. Um estudo das flutuações de temperatura para o período de inverno na América do Sul, correlacionando a Patagônia com o sul do Brasil. **Revista Brasileira de Meteorologia**, São José dos Campos, v. 14, n. 1, p. 23-34, 1999.

POIER, K. R.; RICHTER, J. Spatial distribution of earthworms and soil properties in an arable loess soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 24, n. 12, p. 1601–1608, Dec. 1992.

PULLEMAN, M. M. et al. Earthworms and management affect organic matter incorporation and microaggregate formation in agricultural soils. **Applied Soil Ecology**, Stillwater, v. 29, n. 1, p. 1-15, May 2005.

RIGHI, G. **Minhocas de Mato Grosso e de Rondônia**. Brasília: SCT/PR-CNPq. Programa do Trópico Úmido, Programa Polonoroeste, Relatório de Pesquisa n° 12. 1990. 157p.

RIGHI, G. Colombian earthworms. In: VAN DER HAMMEN, T. (Ed). **Studies on Tropical Andean Ecosystems**, Vol. 4, Cramer (Borntraeger), Berlin-Stuttgart, 1995. p. 485–607.

ROSSI, J. P.; LAVELLE, P.; ALBRECHT, A. Relationships between spatial pattern of the endogeic earthworm *Polypheretima elongata* and soil heterogeneity. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 3-4, p. 485-488, Mar./Apr. 1997.

SATCHELL, J. E. Lumbricidae. In: BURGESS, A.; RAW, F. (Eds.). **Soil biology**. Academic Press, London, 1967. p. 259-322.

SILVA, R. F. da et al. Macrofauna invertebrada do solo sob diferentes sistemas de produção em Latossolo da Região do Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 4, p. 697-704, abr. 2006.

STEVENS, M. M. **Improving bloodworm, earthworm and snail control in rice**. RIRDC Publication No 03/083, Rural Industries Research and Development Corporation, Canberra, Austrália, 2003.

STEVENS, M. M.; WARREN, G. N. Laboratory studies on the influence of the earthworm *Eukerria saltensis* (Beddard) (Oligochaeta: Ocnerodrilidae) on overlying water quality and rice plant establishment. **International Journal of Pest Management**, Cardiff, v. 46, n. 4, p. 303-310, 2000.

STRECK, E. V. et al. **Solos do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: EMATER/RS; UFRGS, 2002. 126p.

TALAVERA, J. A. Considerations about *Ocnerodrilus occidentalis* (Oligochaeta: Ocnerodrilidae) in the Canary Islands. **Bonner Zoologische Beiträge**, Bonn, v. 41, n. 1, p. 81-87, März 1990.

TALAVERA, J. A. Pine forest earthworms from Canary Islands (Tenerife and Gran Canaria). **Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae**, Gödöllo, v. 53, n. 2, p. 157–167, 2007.

TEDESCO, M. J. et al. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: Departamento de Solos, UFRGS, 1995, 174p.

TER BRAAK, C. J. F. The analysis of vegetation-environment relationships by canonical correspondence analysis. **Plant Ecology**, Perth, v. 69, n. 1-3, p. 69-77, 1987.

TER BRAAK, C. J. F.; SMILAUER, P. **CANOCO reference manual and user's guide to Canoco for Windows**: Software for canonical community ordination (version 4). New York: Microcomputer Power, 1998.

VIANA, V. M.; PINHEIRO, L. A. F. V. Conservação da biodiversidade em fragmentos florestais. Série técnica IPEF, v. 12, n. 32, p. 25-42, dez. 1998.

WARREN, M. W.; ZOU, X. Soil macrofauna and litter nutrients in three tropical tree plantations on a disturbed site in Puerto Rico. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 170, n. 1-3, p. 161-171, Oct. 2002.

5 CAPÍTULO III – IDENTIFICAÇÃO DE MINHOCAS UTILIZANDO GENES DO DNA MITOCONDRIAL (COI E 16S mtDNA) E NUCLEAR (28S rDNA)

5.1 Resumo

A identificação das espécies de minhocas pode ser determinada por meio da caracterização morfológica ou molecular. O objetivo deste trabalho foi identificar espécies de minhocas por meio do uso dos genes mitocondriais subunidade I da citocromo c oxidase (COI) e 16S, e do gene nuclear 28S. A partir da extração do DNA das minhocas foram realizadas reações de PCR com sequências dos genes analisados, cujo produto amplificado foi purificado e sequenciado. As sequências obtidas foram comparadas com sequências depositadas no *GenBank* – NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). O dendrograma filogenético foi construído utilizando-se o algoritmo *Neighbor-joining* com o teste de *bootstrap* com 1000 repetições. Os genes COI mtDNA, 16S mtDNA e 28S rDNA mostraram-se eficientes para a identificação de espécies de minhocas conhecidas, cujas sequências nucleotídicas encontram-se disponibilizadas no banco de dados do *GenBank*. A carência de dados relativos às sequências nucleotídicas de algumas espécies e gêneros de minhocas (*Glossoscolex* sp., *Fimoscolex* sp. e Criodrilidae spp.) impossibilitou a identificação de alguns exemplares de minhocas coletados neste estudo.

Palavras-chave: Identificação molecular; oligoquetas; sistemática filogenética.

5.2 Introdução

As minhocas são organismos essencialmente edáficos e importantes para a manutenção da sustentabilidade de ecossistemas naturais e agrícolas (LAVELLE et al., 2006). O Brasil possui clima favorável à ocorrência de minhocas. No entanto, existem muitas regiões e biomas que ainda não foram avaliados quanto à diversidade desses organismos (BROWN; JAMES, 2007). Avaliações em ecossistemas de regiões nos Estados do Paraná (BARTZ, 2011; LIMA, 2011), de São Paulo (BROWN; JAMES, 2006), do Mato Grosso (BARTZ et al., 2009) e do Rio Grande do Sul (LIMA; RODRÍGUEZ, 2007; este trabalho) revelaram a presença de novas espécies de minhocas, ressaltando a importância de levantamentos para avaliar a diversidade de oligoquetas.

A morfologia é uma característica importante para a identificação de organismos e, em muitos casos, pode proporcionar uma rápida e confiável caracterização. No entanto, a identificação de minhocas com base em caracteres morfológicos é limitada devido à complexidade e ao reduzido número de taxonomistas no mundo. A identificação de indivíduos por meio de análises do DNA apresenta a vantagem de ser um processo rápido e altamente sensível, não estando sujeito a possíveis erros ocasionados por variações fenotípicas, estágio de desenvolvimento do organismo e ação do ambiente (RICHARD et al., 2010). Por ser uma investigação direta da constituição genotípica, a análise molecular oferece ainda a vantagem de permitir a detecção da variação em nível de DNA (SIQUEIRA et al., 2010).

Avanços têm sido observados na biologia molecular, resultando na deposição de sequências de DNA em bancos de dados públicos. A disponibilização destes dados permite a realização de estudos comparativos de genomas ou sequências gênicas (SIQUEIRA et al., 2010). Entretanto, existem muitas espécies de minhocas que ainda não foram analisadas por meio de técnicas moleculares, ou suas sequências ainda não foram depositadas em bancos de dados públicos. Como são sensíveis na detecção da diversidade genética de indivíduos, as ferramentas moleculares podem complementar os métodos clássicos de identificação de espécies baseados na caracterização morfológica (BUSO, 2005).

Chang et al. (2009) observaram inúmeros erros em sequências depositadas em bancos de dados, o que pode resultar em equívocos na identificação dos organismos. Por este motivo, a identificação morfológica não deve ser descartada no processo de identificação dos indivíduos coletados. É importante que o DNA das espécies de minhocas seja caracterizado através do estudo de diferentes regiões do genoma, incluindo genes conservados e que revelem variabilidade inter e intra-específica, para que as sequências nucleotídicas sejam depositadas em banco de dados públicos, possibilitando estudos moleculares comparativos.

Um fragmento da sequência nucleotídica do DNA mitocondrial da subunidade I do gene citocromo c oxidase (mtDNA COI), com 658 pares de base, têm sido proposto como padrão para identificação molecular de espécies animais (HEBERT et al., 2003). Este método conhecido como *barcode*, foi proposto como um sistema de identificação de espécies de minhocas e como um método para detecção de supostas novas espécies. Através dele é possível discriminar uma grande variedade de espécies, considerando-se que a variação intra-específica nesta sequência é muito mais baixa do que a variação interespecífica (HEBERT et al., 2003; TAVARES; BAKER, 2008). De acordo com Siqueira et al. (2010), o gene mtDNA COI pode conter informações filogenéticas relevantes, sendo fundamental, associado a outros genes nucleares, para estudos de filogenia e genética populacional de minhocas.

Além do gene mtDNA COI, outras regiões do genoma têm sido analisadas em estudos de genética populacional e identificação de minhocas, tais como: gene 5.8S, espaço interno transcrito (ITS) (SIQUEIRA et al., 2010), gene 18S (POP et al., 2007) e gene 28S do DNA nuclear ribossomal (rDNA) (JAMIESON et al., 2002), além dos genes do DNA mitocondrial 12S (JAMIESON et al., 2002; KLARICA et al., 2012), 16S (JAMIESON et al., 2002; POP et al., 2007; CHANG et al., 2008; KLARICA et al., 2012), subunidade II da citocromo c oxidase (COII) (KLARICA et al., 2012) e subunidade I de NADH desidrogenase (CHANG et al., 2008). Segundo Klarica et al. (2012), os genes COI e COII do mtDNA apresentam maior variação intraespecífica do que os genes mitocondriais 12S e 16S. As regiões 18S, 5.8S e 28S do DNA nuclear (rDNA) são consideradas muito conservadas.

Neste estudo, exemplares de minhocas coletados no Estado do Rio Grande do Sul foram analisados por meio de técnicas moleculares visando sua identificação.

O objetivo do trabalho foi identificar espécies de minhocas através do uso dos genes mitocondriais subunidade I da citocromo c oxidase (COI) e 16S, e do gene nuclear 28S.

5.3 Material e métodos

5.3.1 Obtenção das espécies de minhocas

Dentre os exemplares de minhocas coletados no Estado do Rio Grande do Sul (RS), apenas 15 foram analisados por técnicas moleculares, visando sua identificação (Tabela 5.1). Foram selecionados para análise neste estudo, exemplares coletados na forma juvenil, alguns correspondentes a novas espécies de minhocas e outros para confirmação da identificação morfológica.

Tabela 5.1 - Caracterização dos locais onde foram coletadas as espécies de minhocas.

| Identificação | Ecossistema | Coordenadas geográficas | |
|------------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------|
| <i>Amyntas corticis</i> | campo nativo | 28° 09' 43,30" S | 55° 00' 25,20" O |
| <i>Amyntas gracilis</i> | lavoura de milho | 27° 50' 48,81" S | 54° 38' 44,93" O |
| <i>Amyntas rodericensis</i> | monocultivo de pinus | 30° 54' 35,44" S | 53° 25' 13,46" O |
| Criodrilidae n. sp. | banhado | 27° 50' 52,31" S | 54° 38' 43,08" O |
| <i>Eukerria</i> n. sp. 1 | banhado | 27° 50' 52,31" S | 54° 38' 43,08" O |
| <i>Eukerria saltensis</i> | fragmento de mata nativa | 30° 11' 03,80" S | 57° 29' 43,60" O |
| <i>Fimoscolex</i> n. sp.1 | fragmento de mata nativa | 28° 41' 31,00" S | 55° 54' 09,30" O |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp.1 | monocultivo de eucalipto | 29° 38' 58,90" S | 54° 32' 34,70" O |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp.2 | campo nativo | 29° 49' 15,80" S | 57° 04' 56,70" O |
| <i>Glossoscolex</i> n. sp.6 | campo nativo | 30° 47' 23,72" S | 55° 22' 08,77" O |
| <i>Metaphire californica</i> | mata ciliar | 29° 17' 30,80" S | 54° 51' 23,90" O |
| <i>Microscolex dubius</i> | fragmento de mata nativa | 30° 11' 03,80" S | 57° 29' 43,60" O |
| <i>Microscolex dubius</i> | monocultivo de eucalipto | 28° 55' 12,20" S | 56° 06' 41,00" O |
| <i>Ocnerodrilus</i> sp. | pastagem cultivada | 29° 43' 05,32" S | 53° 42' 25,19" O |
| <i>Urobenus brasiliensis</i> | fragmento de mata nativa | 27° 50' 49,77" S | 54° 38' 42,04" O |

Os exemplares de minhocas coletados no campo foram imediatamente armazenados em etanol 70%. No laboratório, as minhocas foram limpas externamente com etanol 100% e transferidas para frascos contendo esse reagente, os quais foram mantidos sob refrigeração a 4 °C.

5.3.2 Extração do DNA

Fragmentos de tecido da região caudal foram retirados de exemplares fixados em etanol 100% e mantidos sob refrigeração a 4 °C (SIQUEIRA et al., 2010). A extração de DNA foi realizada seguindo-se o protocolo de precipitação salina descrito por Miller et al. (1988), adaptado conforme descrição a seguir. Para cada amostra, um fragmento de tecido medindo 0,4 x 0,4 cm foi transferido para tubo tipo Eppendorf, de 1,5 µL, ao qual foi adicionado 500 µL de tampão SE (75mM NaCl, 25mM EDTA, pH 8,0), 25 µL de SDS a 20% e 20 µL de proteinase K a 20 mg mL⁻¹.

Após incubar a 56 °C por período necessário para ocorrer a total digestão dos tecidos (SIQUEIRA et al., 2010), adicionou-se dois décimos do volume total de NaCl 5M e centrifugou-se durante 10 minutos na velocidade de 18.894 g. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo tipo Eppendorf, de 1,5 µL, onde foi adicionado o dobro do volume de etanol 100% gelado.

O tubo foi colocado em freezer a -20 °C durante 20 minutos. Posteriormente, foi centrifugado a 18.894 g, em centrífuga refrigerada e o sobrenadante foi descartado. Lavou-se o pellet duas vezes com etanol 70% gelado a -20 °C. Uma vez desprezado o etanol 70%, o tubo permaneceu à temperatura ambiente durante 15 minutos para possibilitar a evaporação do etanol restante. O DNA foi ressuspenso com 30 µL de tampão TE (10mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,4).

5.3.3 Amplificação de fragmentos por Reação da Cadeia de Polimerase

Foram amplificadas três regiões distintas do DNA das minhocas, duas do DNA mitocondrial (16S rRNA e COI) e uma do DNA nuclear (28S rDNA), utilizando-se três pares de oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do DNA das minhocas.

| Oligonucleotídeos iniciadores | Sequência 5' a 3' | Gene | Autor |
|-------------------------------|----------------------------|------------|----------------------|
| HCO2198 | TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA | COI | Folmer et al. (1994) |
| LCO1490 | GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG | COI | Folmer et al. (1994) |
| 16SAR | CGCCTGTTTATCAAAAACAT | 16S rRNAH | Palumbi (1996) |
| 16SBR | CCGGTCTGAACTCAGATCACGT | 16S rRNA H | Palumbi (1996) |
| C1 | ACCCGCTGAATTTAAGCAT | 28S rDNA | Lê et al. (1993) |
| D2 | TCCGTGTTTCAAGACGG | 28S rDNA | Lê et al. (1993) |

O programa de amplificação utilizado em todas as reações, para os três pares de oligonucleotídeos iniciadores, foi composto por uma desnaturação a 94 °C durante 4 minutos, seguida por 25 ciclos compostos por uma desnaturação inicial a 94 °C durante 1 minuto, anelamento a 50 °C durante 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto e meio, seguido por uma etapa de extensão final a 72 °C durante 5 minutos.

As reações de PCR tiveram como volume final 26 µL, sendo 4,88 µL de água ultra pura; 2,6 µL de Tampão 10x; 0,8 µL de cloreto de Mg (1,5 mM); 2,6 µL de BSA (2,5 mg mL⁻¹); 2,6 µL de DNTP (2,5 mM); 4 µL de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,52 µL de Taq DNA polimerase (5 unidades µL⁻¹) e 4 µL da amostra de DNA. A qualidade das amplificações foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,2%. Os géis foram visualizados e fotografados através do sistema Canon Snot S2IS.

5.3.4 Purificação, sequenciamento e análise das sequências de DNA

Os produtos da PCR foram purificados com o kit “DNA Purification Kit UltraClean PCR Clean-up” Mobio Laboratories. O sequenciamento do DNA foi realizado em Sequenciador Automático de DNA - ABI 3500 Genetic Analyzer. As sequências obtidas foram editadas com programa computacional STADEN PACKAGE (STADEN et al., 2000) montando-se uma sequência *consensus* para cada indivíduo. O alinhamento das sequências foi realizado com o algoritmo CLUSTALW (THOMPSON et al., 1994).

Utilizou-se o banco de dados público *GenBank* - NCBI Blast (ALTSCHUL et al., 1997) para a obtenção de sequências de espécies de oligoquetas para o estudo de relações filogenéticas, conforme o gene analisado. A sequência do exemplar da espécie *Urobenus brasiliensis* foi comparada com dados depositados no Global Mirror System of DNA Barcode Data (<http://www.boldmirror.net>) (Tabela 5.3).

Para cada gene analisado, foi construído um dendrograma filogenético a partir da comparação das sequências nucleotídicas das minhocas do RS com sequências de minhocas disponíveis nos bancos de dados. Os dendrogramas filogenéticos foram construídos por meio do algoritmo *Neighbor-joining* (SAITOU; NEI, 1987), utilizando-se o método de distância p e assumindo-se taxas evolutivas uniformes. A confiabilidade do resultado dessa topologia foi testada por *bootstrap*¹¹ no programa MEGA 5.0 (KUMAR et al., 2008) com 1000 repetições.

O método de *Neighbor-joining* produz a mesma topologia das árvores construídas com o método de *Minimum Evolution*, quando a variabilidade ou o número de nucleotídeos analisados é grande (>500). Se existirem diferenças, geralmente, estas são estatisticamente não-significantes. Além disso, a distância p tende a produzir topologias adequadas quando a variabilidade é grande, como no gene mtDNA COI (NEI, 1996).

¹¹ Os valores de *bootstrap* são um índice de suporte e representam as porcentagens de casos nos quais os grupos aparecem no dendrograma resultante. Esses valores indicam se a filogenia tem ou não suporte. Valores iguais ou acima de 90 são considerados ótimos (STEARNS; HOEKSTRA, 2003).

Tabela 5.3 - Relação de espécies e sequências obtidas nos bancos de dados *GenBank* e Global Mirror System of DNA Barcode Data para a construção de dendrogramas filogenéticos para os genes mtDNA COI, mtDNA 16S e rDNA 28S, com os respectivos números de acesso.

| Organismo | Número de acesso* | Referência |
|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| gene mtDNA COI | | |
| <i>Amyntas corticis</i> | AB542463 | Minamiya et al. (2010) |
| <i>Amyntas corticis</i> | EF077550 | Huang et al. (2006) |
| <i>Amyntas corticis</i> | EF077548 | Huang et al. (2006) |
| <i>Amyntas gracilis</i> | AB542484 | Minamiya et al. (2010) |
| <i>Amyntas gracilis</i> | AB542485 | Minamiya et al. (2010) |
| Glossoscolecidae sp. | GU013890 | Porco (2009) |
| Glossoscolecidae sp. | GU013898 | Porco (2009) |
| Glossoscolecidae sp. | GU013914 | Porco (2009) |
| Glossoscolecidae sp. | GU013944 | Porco (2009) |
| Glossoscolecidae sp. | GU013957 | Porco (2009) |
| Glossoscolecidae sp. | GU013958 | Porco (2009) |
| Glossoscolecidae sp. | GU013964 | Porco (2009) |
| Glossoscolecidae sp. | GU013967 | Porco (2009) |
| Ocnerodrilidae sp. | GU013966 | Porco (2009) |
| Ocnerodrilidae sp. | GU013971 | Porco (2009) |
| Ocnerodrilidae sp. | GU013976 | Porco (2009) |
| Ocnerodrilidae sp. | GU013977 | Porco (2009) |
| Ocnerodrilidae sp. | GU013978 | Porco (2009) |
| <i>Urobenus brasiliensis</i> | ewsjc727-10/Brasil2010 -138** | Brown et al. (2010) |
| <i>Hirudo verbana</i> | JN104644 | Utevsky e Trontelj (2011) |
| <i>Hirudo orientalis</i> | JN104646 | Utevsky e Trontelj (2011) |
| <i>Hirudo medicinalis</i> | HQ333518 | Kvist et al. (2010) |
| <i>Ctenocardia fornicata</i> | EU733113 | Kirkendale (2008) |
| gene mtDNA 16S | | |
| <i>Amyntas corticis</i> | AB474289 | Minamiya et al. (2008) |
| <i>Amyntas corticis</i> | AB474290 | Minamiya et al. (2008) |
| <i>Amyntas rodericensis</i> | HQ232534 | Buckley et al. (2010) |
| <i>Metaphire abdita</i> | EF490527 | Huang et al. (2007) |
| <i>Metaphire californica</i> | AB474335 | Minamiya et al. (2008) |
| <i>Metaphire tschiliensis</i> | EF490525 | Huang et al. (2007) |
| <i>Pontoscolex corethrurus</i> | FQ704774 | Genoscope (2011) |
| <i>Pontoscolex corethrurus</i> | FQ704778 | Genoscope (2011) |
| <i>Pontoscolex corethrurus</i> | FQ704780 | Genoscope (2011) |
| <i>Enchytraeus albidus</i> | EF442026 | Tartaglia e Shain (2007) |
| <i>Enchytraeus buchholzi</i> | EF442027 | Tartaglia e Shain (2007) |
| <i>Enchytraeus buchholzi</i> | EF443156 | Tartaglia e Shain (2007) |
| gene rDNA 28S | | |
| <i>Amyntas rodericensis</i> | HQ232671 | Buckley et al. (2010) |
| <i>Amyntas rodericensis</i> | AY101562 | Jamielson et al. (2003) |
| <i>Eukerria saltensis</i> | AY048496 | Jamielson et al. (2001) |
| Glossoscolecidae sp. | AY048507 | Jamielson et al. (2001) |
| <i>Microscolex dubius</i> | HQ232742 | Buckley et al. (2010) |
| Ocnerodrilidae sp. | HQ232640 | Buckley et al. (2010) |
| <i>Hirudo troctina</i> | GQ368772 | Phillips e Siddall (2009) |
| <i>Hirudo verbana</i> | CQ368772 | Phillips e Siddall (2009) |
| <i>Hirudo medicinalis</i> | EU100079 | Borda et al. (2007) |
| <i>Hirudo orientalis</i> | EF733022 | Utevsky et al. (2007) |

*Número de acesso no *GenBank* - National Center of Biotechnology Information (NCBI) (site:www.ncbi.nlm.nih.gov)

**Número de acesso no Global Mirror System of DNA Barcode Data (GMS-DBD) (site:http://www.boldmirror.net)

5.4 Resultados e discussão

O método utilizado para a extração do DNA das minhocas, adaptado de Miller et al. (1988), resultou em quantidade de DNA suficiente para a amplificação das regiões do genoma estudadas. A amplificação das regiões dos genes 28S rDNA, 16S mtDNA e COI mtDNA das espécies de minhocas gerou fragmentos de DNA com tamanho variável entre 670 a 780, 640 a 670 e 680 a 720 pares de bases (pb), respectivamente.

Dentre os genes mitocondriais, as subunidades I e II do gene citocromo c oxidase (COI e COII) apresentam maior variação intraespecífica do que a subunidade 16S (KLARICA et al., 2012), sendo portanto, úteis para avaliação de variação genética entre indivíduos da mesma espécie. O estudo destes genes pode, também, facilitar a identificação de espécies distintas que apresentam morfologia semelhante em estudos de diversidade.

No dendrograma filogenético com base na comparação do gene COI, observou-se que os indivíduos de *Amyntas corticis* agruparam-se em um mesmo ramo, assim como os de *Amyntas gracilis*. O exemplar do gênero *Ocnerodrilus*, pertencente à família Ocnerodrilidae, formou um agrupamento monofilético com as sequências nucleotídicas de dois indivíduos da mesma família, disponíveis no banco de dados do *GenBank* (Ocnerodrilidae sp. GU013978 e Ocnerodrilidae sp. GU013971). O alto valor de *bootstrap* (=100) indicou que o resultado está bem suportado (Figura 5.1).

A análise de agrupamento das novas espécies de minhocas dos gêneros *Glossoscolex* e *Fimoscolex*, pertencentes à família Glossoscolecidae, foi dificultada por não ter sido encontrado registro de sequências de nucleotídeos destes gêneros no *GenBank*. As espécies *Glossoscolex* n. sp. 2 e *Fimoscolex* n. sp. 1 aproximaram-se, filogeneticamente, de sequências nucleotídicas de organismos da família Glossoscolecidae depositadas no banco de dados (Figura 5.1).

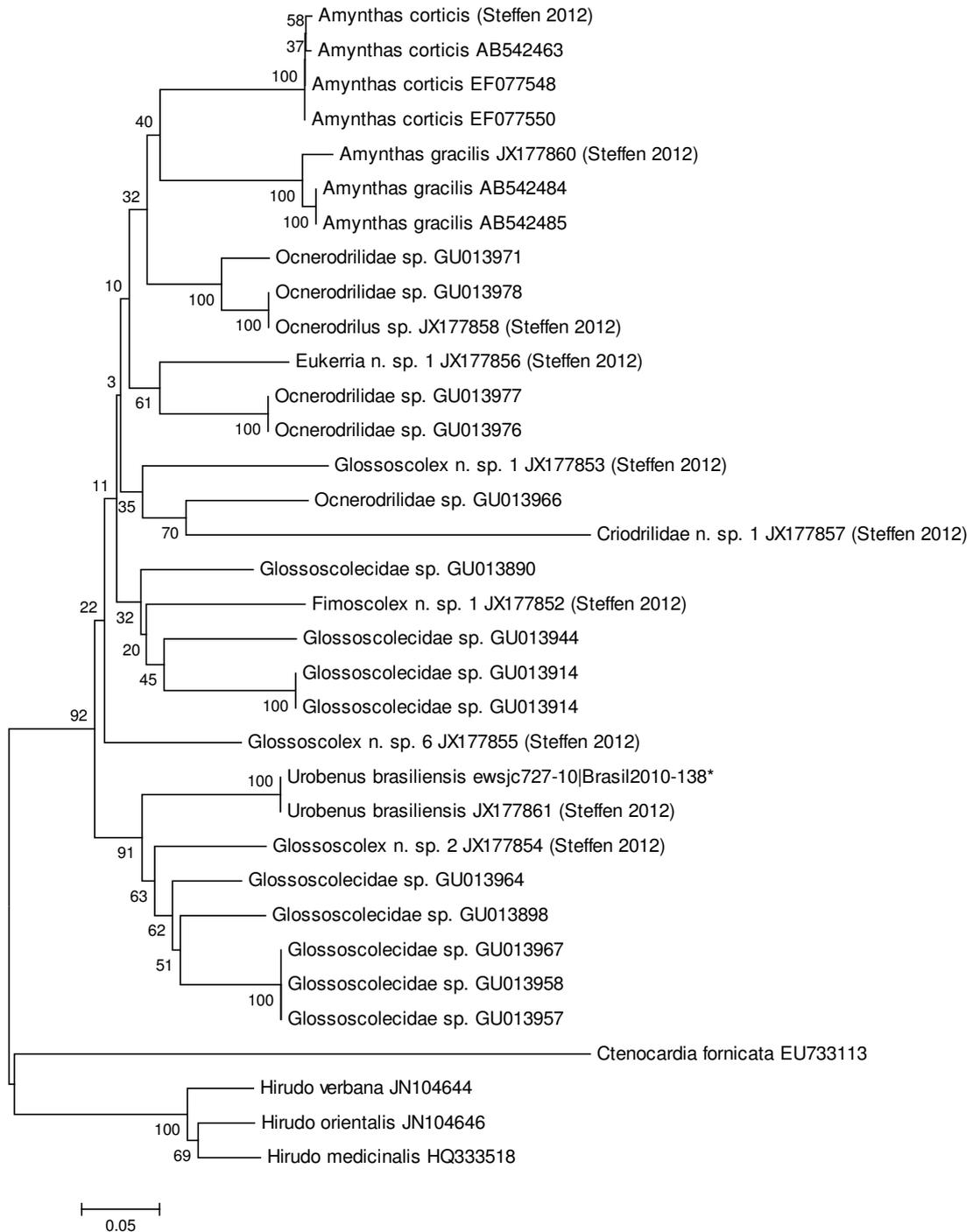


Figura 5.1 - Dendrograma filogenético baseado no algoritmo *Neighbor-joining* da região do gene mitocondrial subunidade I da citocromo c oxidase (COI) de espécies de minhocas coletadas no Estado do Rio Grande do Sul e de sequências de minhocas obtidas a partir do banco de dados *GenBank* e no Global Mirror System of DNA Barcode Data. O número acima ou abaixo das ramificações representa o valor de *bootstrap* com base em 1000 repetições. A espécie *Ctenocardia fornicata* e as espécies do gênero *Hirudo* foram inseridas como *outgroup*.

Dentre as minhocas nativas brasileiras, o gênero *Glossoscolex* é o mais diversificado, apresentando 54 espécies/subespécies. Algumas espécies deste gênero são, morfologicamente, muito semelhantes, o que dificulta sua identificação. Além disso, possuem a característica de se diversificarem no mesmo tipo de habitat, porém em áreas separadas por barreiras geográficas, gerando novas espécies (BROWN; JAMES, 2007). Nestes casos, em que há um grande número de espécies do mesmo gênero e a distinção de espécies baseada em caracteres morfológicos é dificultada, o uso de técnicas moleculares pode ser uma ferramenta útil para a identificação das minhocas.

Foi observada a formação de um grupo monofilético entre as espécies de *Urobenus brasiliensis*, as quais apresentaram similaridade de 100% (Figura 5.1).

Assim como para o gênero *Glossoscolex*, não foi encontrado o registro de sequências de organismos de gêneros pertencentes à família Criodrilidae para a região do gene mtDNA COI. As espécies *Glossoscolex* n. sp. 1 e *Glossoscolex* n. sp. 6, assim como a nova espécie da família *Criodrilidae* não apresentaram identidade com os demais organismos selecionados do banco de dados (Figura 5.1).

O dendrograma filogenético construído com base nas sequências do gene 16S demonstrou a formação de diferentes agrupamentos (*clusters*), englobando as espécies analisadas (Figura 5.2). Foi observada alta identidade entre os organismos da espécie *Amyntas rodericensis*, suportada pelo elevado valor de *bootstrap* (=100). O exemplar de *Metaphire californica* se aproximou do organismo da mesma espécie depositado no banco de dados, formando um grupo monofilético. Os organismos desta espécie permaneceram distantes, filogeneticamente, das espécies *M. abdita* e *M. tschiliensis* (Figura 5.2).

A minhoca da espécie *Amyntas corticis* coletada neste trabalho agrupou-se aos demais organismos dessa espécie, formando um agrupamento monofilético (Figura 5.2).

Conforme observado para o gene mtCOI, não foi possível realizar comparações entre as sequências nucleotídicas dos indivíduos do gênero *Glossoscolex* coletados no RS e sequências disponíveis no *GenBank*, por causa da à carência de dados. A análise de sistemática filogenética revelou proximidade entre os organismos das espécies *Glossoscolex* n. sp. 1 e *Glossoscolex* n. sp. 6 (Figura 5.2).

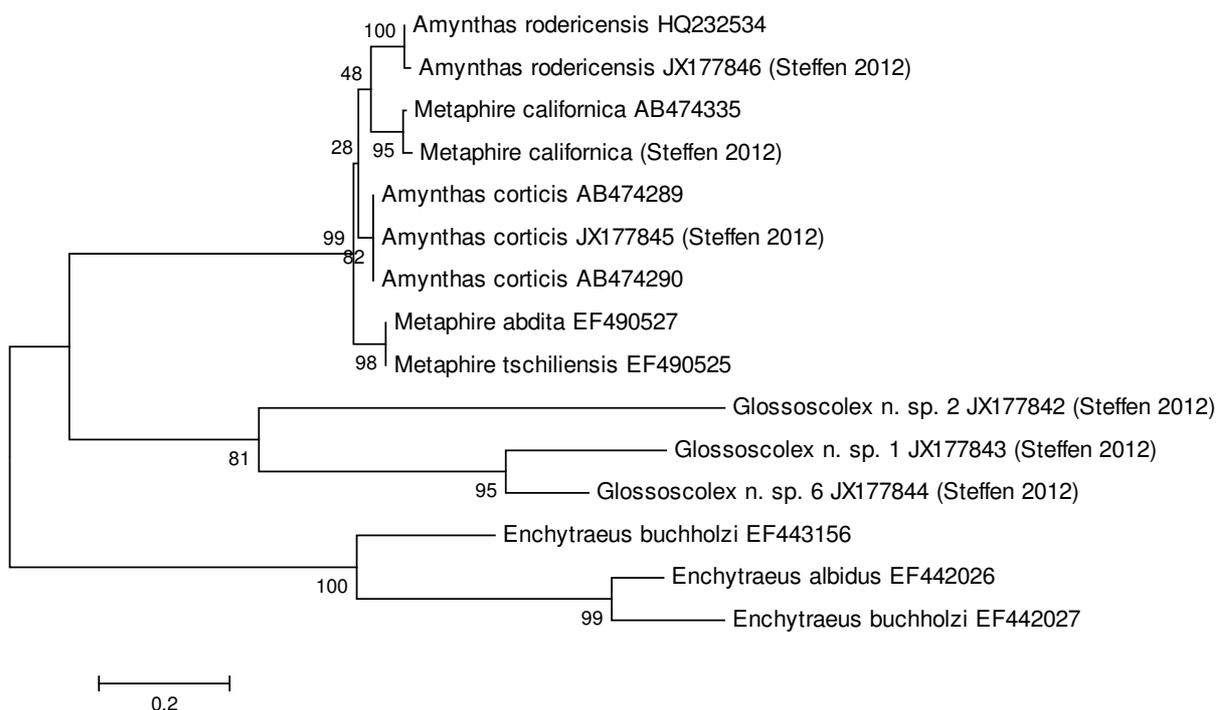


Figura 5.2 - Dendrograma filogenético baseado no algoritmo *Neighbor-joining* da região da subunidade 16S do mtDNA de espécies de minhocas coletadas no Estado do Rio Grande do Sul e de sequências de minhocas obtidas a partir do banco de dados *GenBank*. O número acima ou abaixo das ramificações representa o valor de *bootstrap* com base em 1000 repetições. As espécies do gênero *Enchytraeus* foram inseridas como *outgroup*.

As sequências nucleotídicas da subunidade 16S do DNA mitocondrial são consideradas padrão na determinação de relações filogenéticas (HEAD et al., 1998; KIRK et al., 2004). Estas agrupam um conjunto de características necessárias a um bom marcador molecular: distribuição universal, estrutura e função conservada entre os táxons, ausência de transferência lateral e tamanho suficiente para estudos de filogenia (cerca de 1500 nucleotídeos) (AMANN; LUDWIG, 2000). Esta região do DNA mitocondrial, assim como o gene 28S do DNA nuclear, são consideradas regiões muito conservadas do genoma (NAVAJAS et al., 1999; KLARICA et al., 2012).

No dendrograma filogenético construído com base nas sequências do gene nuclear 28S, observou-se um agrupamento monofilético formado pelos organismos da espécie *Eukerria saltensis*. As sequências nucleotídicas dos organismos de *E.*

saltensis aproximaram-se do organismo da família Ocnerodrilidae disponível no banco de dados do *GenBank* (Figura 5.3).

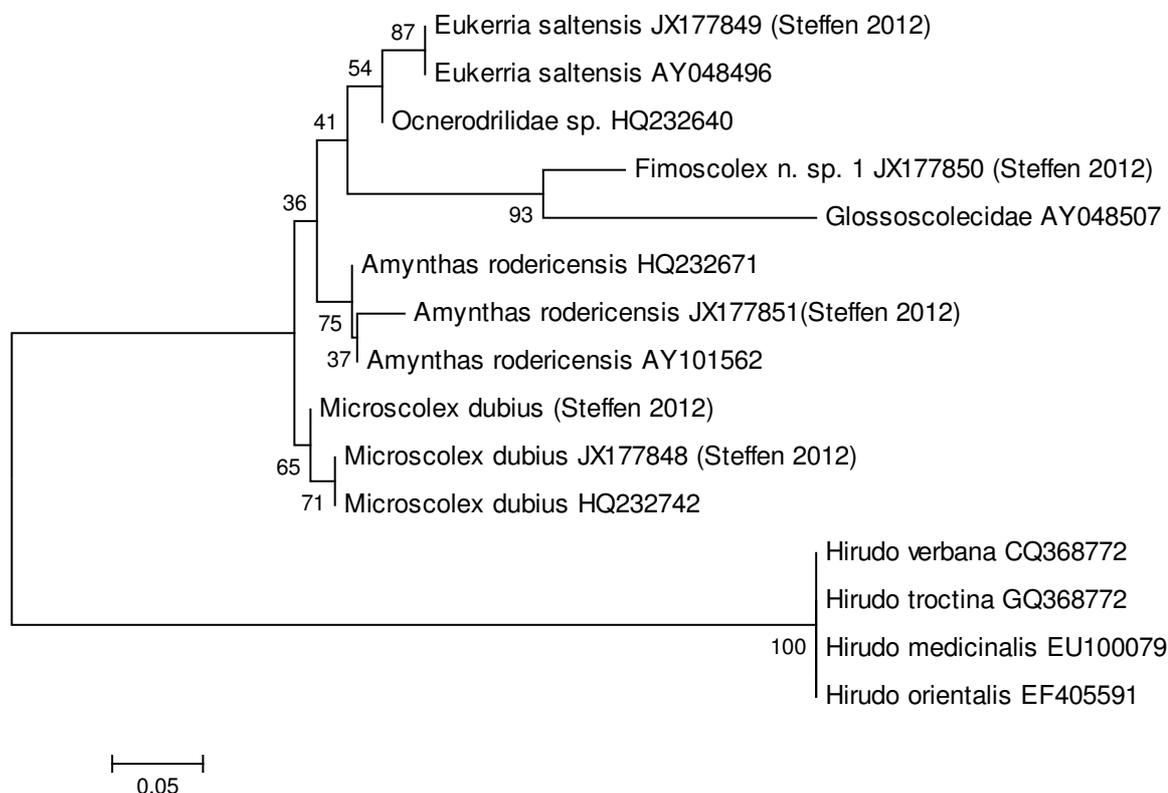


Figura 5.3 - Dendrograma filogenético baseado no algoritmo *Neighbor-joining* da região da subunidade 28S do rDNA de espécies de minhocas coletadas no Estado do Rio Grande do Sul e de sequências de minhocas obtidas a partir do banco de dados *GenBank*. O número acima ou abaixo das ramificações representa o valor de *bootstrap* com base em 1000 repetições. As espécies do gênero *Hirudo* foram inseridas como *outgroup*.

O exemplar de *E. saltensis* analisado foi coletado em fragmento de mata nativa no município de Barra do Quaraí (Tabela 5.3). Por estar em fase juvenil, a caracterização morfológica possibilitou sua identificação apenas no nível de família (Ocnerodrilidae). No entanto, por meio das análises moleculares, foi possível obter a identificação do exemplar no nível de espécie (*E. saltensis*), a qual foi suportada pelo valor de *bootstrap* (Figura 5.3).

A identificação de minhocas com base em caracteres morfológicos é complexa e possível somente quando os espécimes são adultos e estão bem-preservedos. Nos casos em que o material a ser identificado foi mal conservado, as minhocas encontram-se em estágio juvenil ou mutiladas, o uso de marcadores moleculares representa uma oportunidade de identificação dos exemplares (KLARICA et al., 2012).

O organismo referente à nova espécie do gênero *Fimoscolex* coletado no RS formou, separadamente, um agrupamento com indivíduo da família Glossoscolecidae (Glossoscolecidae sp. AY048507). Não houve comparação entre organismos do mesmo gênero, por não terem sido encontrados registros de sequências de organismos pertencentes ao gênero *Fimoscolex* no banco de dados do *GenBank* (Figura 5.3).

Outro agrupamento foi formado pelas espécies de *Amyntas rodericensis*. Os exemplares de *Microscolex dubius* coletados no Estado do RS aproximaram-se filogeneticamente do organismo da mesma espécie cadastrado no banco de dados (Figura 5.3).

As sequências de nucleotídeos obtidas neste trabalho foram submetidas ao *GenBank*. Representam os primeiros registros de sequências de organismos pertencentes aos gêneros *Glossoscolex* e *Fimoscolex* depositadas nesse banco de dados público.

Sequências nucleotídicas da região do gene mitocondrial COI de algumas espécies de minhocas coletadas neste trabalho foram depositadas no banco de dados Global Mirror System of DNA Barcode Data pelo pesquisador Samuel Wooster James (Tabela 5.4).

A análise do DNA mitocondrial apresenta a vantagem de ser facilmente amplificado e a tendência de acumular mutações mais rapidamente do que algumas regiões nucleares. No entanto, o gene codificador de proteínas COI apresenta tipicamente variações específicas (TAVARES; BAKER, 2008). Analisando a variabilidade genética de minhocuçus da espécie *Rhinodrilus alatus* Righi (1971), Siqueira et al. (2010) observaram que as sequências produzidas para a subunidade I do gene mtDNA da COI mostraram abundante variação intra e interespecífica entre os minhocuçus.

Tabela 5.4 - Código de depósito no Global Mirror System of DNA Barcode Data (GMS-DBD) de sequências obtidas da região do gene mitocondrial da subunidade I da citocromo c oxidase (COI) de minhocas coletadas no Rio Grande do Sul.

| Código de depósito | Exemplar de minhoca |
|-----------------------------|------------------------------|
| ewsjc810-10 brasil2010-221* | <i>Glossoscolex</i> sp. |
| ewsjc813-10 brasil2010-224 | <i>Ocnerodrilus</i> sp. |
| ewsjc815-10 brasil2010-226 | <i>Eukerria</i> sp. |
| ewsjc816-10 brasil2010-227 | <i>Glossoscolex</i> sp. |
| ewsjc817-10 brasil2010-228 | <i>Ocnerodrilus</i> sp. |
| ewsjc819-10 brasil2010-230 | <i>Glossoscolex</i> sp. |
| ewsjc822-10 brasil2010-233 | <i>Urobenus brasiliensis</i> |

*Global Mirror System of DNA Barcode Data (GMS-DBD) (site: <http://www.boldmirror.net>)

A análise do DNA mitocondrial apresenta a vantagem de ser facilmente amplificado e a tendência de acumular mutações mais rapidamente do que algumas regiões nucleares. No entanto, o gene codificador de proteínas COI apresenta tipicamente variações específicas (TAVARES; BAKER, 2008). Analisando a variabilidade genética de minhocuçus da espécie *Rhinodrilus alatus* Righi (1971), Siqueira et al. (2010) observaram que as sequências produzidas para a subunidade I do gene mtDNA da COI mostraram abundante variação intra e interespecífica entre os minhocuçus.

O uso da metodologia de código de barras (DNA *barcode*) em análises genéticas de organismos do solo está crescendo rapidamente e existe um apelo por parte da comunidade de biólogos à adoção deste método pelos pesquisadores (ROUGERIE et al., 2009). Chang e James (2011) avaliaram publicações referentes a estudos filogenéticos de minhocas, discutindo os resultados obtidos e os métodos utilizados. Segundo os autores, embora estudos relacionados ao DNA *barcode* estejam aumentando, eles destacam a importância do uso de três genes adequados para análises intergenéricas, ou seja, dentro de famílias, que são: 28S rDNA (DNA nuclear), 16S e 12S rRNA (DNA mitocondrial).

Considerando os valores de *bootstrap*, os quais conferem suporte às informações representadas nos dendrogramas filogenéticos, os genes mitocondriais COI e 16S mostraram ser mais eficientes para a identificação das espécies de minhocas.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem a necessidade de realização de estudos complementares do DNA das novas espécies de minhocas encontradas no Estado do RS, visando obter informações mais conclusivas sobre sua identificação. O presente trabalho também apontou a carência de dados no *GenBank*, relativos à caracterização do genoma de alguns gêneros e de algumas espécies de minhocas.

Contudo, para que as ferramentas moleculares sejam mais utilizadas no processo de identificação de minhocas, é fundamental que novos estudos de sistemática filogenética sejam realizados, com o maior número possível de espécies de minhocas, e que os resultados obtidos sejam depositados em bancos de dados. Estando acessíveis aos pesquisadores, os dados moleculares possibilitarão a comparação das sequências nucleotídicas e a identificação de exemplares de minhocas.

5.5 Conclusões

Os genes mitocondriais 16S e subunidade I da citocromo c oxidase (COI), assim como o gene nuclear 28S, podem ser utilizados para identificação molecular de minhocas. O gene mitocondrial COI foi o mais eficiente.

Através da utilização do gene COI é possível identificar as espécies *Amyntas corticis*, *Amyntas gracilis*, *Eukerria saltensis*, *Ocnerodrilus* sp. e *Urobenus brasiliensis*. O uso do gene mitocondrial 16S possibilita a identificação das espécies *Amyntas corticis*, *A. rodericensis* e *Metaphire californica*, e o gene 28S rDNA, a identificação das espécies *Amyntas rodericensis*, *Eukerria saltensis* e *Microscolex dubius*.

5.6 Referências bibliográficas

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Southampton, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, Sept. 1997.

AMANN, R. I.; LUDWIG, W. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 24, n. 5, p. 555-565, Dec. 2000.

BARTZ, M. L. C. **Ocorrência e taxonomia de minhocas em agroecossistemas no Paraná, Brasil**. 2011. 175f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

BARTZ, M. L. C.; PASINI, A.; BROWN, G. G. Earthworms from Mato Grosso, Brazil, and new records of species from the state. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 8, p. 934-939, Ago. 2009.

BROWN, G. G.; JAMES, S. W. Earthworm biodiversity in São Paulo state, Brazil. **European Journal of Soil Biology**, Rouen, v. 42, n. 1, p. 145-149, Nov. 2006.

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.

BUSO, G. S. C. Marcadores moleculares e análise filogenética. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Série Documentos N^o. 136. CENARGEN, Brasília. 2005.

CHANG, C.-H.; LIN, S.-M.; CHEN, J.-H. Molecular systematics and phylogeography of the gigantic **earthworms** of the Metaphire formosae species group (Clitellata, Megascolecidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Detroit, v. 49, n. 3, p. 958-968, Dec. 2008.

CHANG, C.-H.; ROUGERIE, R.; CHEN, J.-H. Identifying earthworms through DNA barcodes: Pitfalls and promise. **Pedobiologia**, Berlin, v. 52, n. 3, p. 171-180, Mar. 2009.

CHANG, C.-H.; JAMES, S. A critique of earthworm molecular phylogenetics. **Pedobiologia**, Berlin, v. 54, Supplement, p. 3-9, Dec. 2011.

FOLMER, O. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, Newcastle, v. 3, n. 5, p. 294-299, Oct. 1994.

HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, R. W. Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecology**, New York, v. 35, n. 1, p. 1-21, Jan. 1998.

HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society. Serie B: Biological Sciences**, London, v. 270, p. 313-322, Feb. 2003.

HUANG, J. et al. Identifying earthworms through DNA barcodes. **Pedobiologia**, Berlin, v. 51, n. 4, p. 301-309, Oct. 2007.

JAMIESON, B. G. M. et al. Phylogeny of the Megascolecidae and Crassicitellata (Annelida, Oligochaeta): combined versus partitioned analysis using nuclear (28S) and mitochondrial (12S, 16S) rDNA. **Zoosystema**, Paris, v. 24, n. 4, p. 707-734, Dec. 2002.

KIRK, J. L. et al. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 58, n. 2, p. 169-188, Aug. 2004.

KLARICA, J. et al. Comparing four mitochondrial genes in earthworms – Implications for identification, phylogenetics, and discovery of cryptic species. **Soil Biology and Biochemistry**, Brisbane, v. 45, p. 23-30, Feb. 2012.

KUMAR, S. et al. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Briefings in Bioinformatics**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 299-306, July 2008.

LAVELLE, P. et al. Soil invertebrates and ecosystem services. **European Journal of Soil Biology**, Braunschweig, v. 42, n. 1, p. 3-15, Nov. 2006.

LÊ, H. L. V.; LECOINTRE, G.; PERASSO, R. A 28S rRNA based phylogeny of the Gnathostomes: first steps in the analysis of conflict and congruence with

morphologically based cladograms. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Detroit, v. 2, n. 1, p. 31–51, Mar. 1993.

LIMA, A. C. R. de; RODRÍGUEZ, C. Earthworm diversity from Rio Grande do Sul, Brazil, with a new native Criodrilid genus and species (Oligochaeta: Criodrilidae). **Megadrilologica**, Canadá, v. 11, n. 2, p. 9- 18, 2007.

LIMA, O. G. de. **Indicadores físicos, químicos e biológicos da qualidade do solo em plantios florestais e floresta ombrófila mista na Embrapa Florestas, Colombo - PR**. 2011. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MILLER, A. S.; DYKES, D. D.; POLESKI, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human cells. **Nucleic Acids Research**, Southampton, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.

NAVAJAS, M. et al. Sequence variation of ribosomal Internal Transcribed Spacers (ITS) in commercially important Phytoseiidae mites. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 23, n. 11, p. 851-859, Nov. 1999.

NEI, M. Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. **Annual Review in Genetics**, Palo Alto, v. 30, p. 371-403, Dec. 1996.

PALUMBI, S. R. Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction. In: HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B. K. (Eds.). **Molecular Systematics**, 2nd ed. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, 1996. p. 205-247.

POP, A. A. et al. Application of 16S, 18S rDNA and COI sequences in the molecular systematics of the earthworm family Lumbricidae (Annelida, Oligochaeta). **European Journal of Soil Biology**, Braunschweig, v. 43, s. 1, p. 43-52, Nov. 2007.

RICHARD, B. et al. Re-integrating earthworm juveniles into soil biodiversity studies: species identification through DNA barcoding. **Molecular Ecology Resources**, San Antonio, v. 10, n. 4, p. 606-614, July 2010.

ROUGERIE, R. et al. DNA barcodes for soil animal taxonomy. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 8, p. 789-802, Aug. 2009.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 4, n. 4, p. 406-425, July 1987.

SIQUEIRA, F. de F. et al. Análise filogenética do minhocoçu *Rhinodrillus alatus*, Righi 1971 (Glossoscolecidae: Annelida) baseada em sequências dos genes de RDNA 5.8S, do espaço interno transcrito (ITS1) e da subunidade I da Citocromo C Oxidase mitocondrial. **Acta Zoológica Mexicana** (n.s.), Xalapa, v. 26, Número Especial 2, p. 59-77, Oct. 2010.

STADEN, R.; BEAL, K. F.; BONFIELD, J. K. The Staden Package, 1998. **Methods in Molecular Biology**, v. 132, p.115-130, 2000.

STEARNS, S. C.; HOEKSTRA, R. F. **Evolução**: uma introdução. São Paulo: Atheneu Editora, 2003. 379p.

TAVARES, E. S.; BAKER, A. J. Single mitochondrial gene barcodes reliably identify sister-species in diverse clades of birds. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 8, p. 81-95, Mar. 2008.

THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, Nov. 1994.

6 CAPÍTULO IV - NEW SPECIES OF *GLOSSOSCOLEX* (CLITELLATA: GLOSSOSCOLECIDAE) FROM RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL¹²

6.1 Abstract

Six new species of Oligochaeta of the genus *Glossoscolex* from Rio Grande do Sul State, Brazil are described in this paper: *Glossoscolex (Glossoscolex) knapperae* n. sp., *G. (G.) pastivus* n. sp., *G. (G.) pampas* n. sp., *G. (G.) riograndensis* n. sp., *G. (G.) nativus* n. sp. and *G. (G.) parvus* n. sp. All new species are part of the *truncatus* species group of *Glossoscolex (Glossoscolex)* (male pores in xvii). A table of characters is presented in order to clarify the differences among the species described and related species. Habitat and soil associations of the new species are given.

Keywords: Earthworms; South Brazil; Glossoscolecidae.

6.2 Resumo

Seis novas espécies de Oligochaeta do gênero *Glossoscolex* do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil são descritas neste trabalho: *Glossoscolex (Glossoscolex) knapperae* n. sp., *G. (G.) pastivus* n. sp., *G. (G.) pampas* n. sp., *G. (G.) riograndensis* n. sp., *G. (G.) nativus* n. sp. and *G. (G.) parvus* n. sp. Todas novas espécies são parte do grupo de espécies *truncatus* de *Glossoscolex (Glossoscolex)* (poros masculinos em xvii). Uma tabela com as características das espécies descritas e das espécies de *Glossoscolex* é apresentada nos comentários, de modo que seja possível identificar as diferenças morfológicas entre elas. Também estão incluídas informações das novas espécies com associações de habitat e tipos de solo onde foram encontradas.

Palavras-chave: Minhocas; Sul do Brasil; Glossoscolecidae.

¹² As descrições das espécies de minhocas foram realizadas pelos pesquisadores Marie Luise Carolina Bartz e Samuel Wooster James. Este capítulo foi escrito por Marie L. C. Bartz, com colaboração de Samuel W. James, Gerusa Pauli Kist Steffen e George Gardner Brown.

6.3 Introduction

In the course of collections of earthworms made throughout the State of Rio Grande do Sul (RS), Brazil by researchers of the Federal University of Santa Maria (UFSM), many unidentifiable earthworms of the genus *Glossoscolex* were discovered.

Surveys conducted in the State of RS, from the 1920s until the year 2010, indicated the existence of at least 44 species of earthworms have been identified, 15 native (34%) and 29 exotic (66%). The species are grouped into six families, and most of them belong to the family Lumbricidae (12 species) and Glossoscolecidae (11 species). So far, there were registered only five species of the genus *Glossoscolex*: *G. catharinensis* Michaelsen 1918, *G. grandis* Michaelsen 1892, *G. truncatus* Rosa 1895, *G. uruguayensis uruguayensis* Cordero 1943 and *G. wiengreeni* Michaelsen 1897.

The objective of this study was to present a description of six new species of native earthworms of the genus *Glossoscolex* collected in ecosystems of the State of RS, Brazil.

6.4 Material and methods

Specimens were obtained by digging and hand sorting in sites with natural vegetation (swamp, native grassland, fragments of forest) and also with human impact, such as annual crops (oats) and pastures.

Specimens were killed in 70% ethanol and fixed in 4% formaldehyde. In some cases duplicates or tissue samples were preserved in absolute ethanol for later DNA extraction and DNA sequencing. Long-term storage of fixed material was in 70-80% ethanol. All anatomical observations were conducted by dorsal dissection under a stereomicroscope, and illustrations were prepared by *camera lucida* (Figures 6.1 and 6.2). The collection numbers refer to the Coleção de Oligochaetas Fritz Müller (COFM) at Embrapa Florestas in Colombo, Paraná State. Taxonomy largely follows Righi (1971, 1978, 1995) and Zicsi and Csuzdi (1999) and the Table 6.1 summarize main characters of the new *Glossoscolex* species and some similar described species.

For some sites soil samples were also collected in the 0-20 cm upper layer and submitted to physical (clay) and chemical: pH, cation exchange capacity (CEC), exchangeable aluminum (Al), calcium (Ca), magnesium (Mg), potassium (K), phosphorus (P), sulfur (S), boron (B), copper (Cu), zinc (Zn) and organic matter (OM) analyses following standard methodologies described in Tedesco et al. (1995) (Table 6.2).

6.5 Descriptions

6.5.1 Glossoscolecidae (MICHAELSEN, 1900)

6.5.1.1 Genus *Glossoscolex* (LEUCKART, 1835) in Froriep (1835)

Diagnosis. Setae in 8 longitudinal lines. One pair of intraclitellar male pores, rarely preclitellar, or a single intraclitellar male pore, but always paired copulatory bulbs. One pair of calciferous glands in 11th or 12th segment with composite-tubular structure. Sexual system metandric and metagynic; seminal vesicles in general long; a pair of copulatory bulbs connecting sperm ducts and the external male genital pores; spermathecae absent.

Type species. *Glossoscolex giganteus* Leuckart, 1836 (in Oken, 1836).

6.5.1.1.1 Subgenus *Glossoscolex* (LEUCKART, 1835) in Froriep (1835)

Diagnosis. One pair of intraclitellar male pores associated with a pair of intracelomic copulatory bulbs.

Type species. *Glossoscolex (Glossoscolex) giganteus* Leuckart 1836 (in Oken, 1836)

6.5.1.1.1.1 *Glossoscolex (Glossoscolex) knapperae* n. sp. Bartz & James (Figures 6.1a and 6.1b)

Holotype. COFM BRRS0028 one adult, amputee. Type locality: Near a creek, next to a native grassland in Minas do Camaquã, Caçapava do Sul, Rio Grande do

Sul, Brazil, 29° 39' 36.9" S 54° 30' 09.5" W, 161 masl. 05 December 2010, G.P.K. Steffen & R.B. Steffen colls.

Etymology. The species is named in honor to the researcher Christa Knapper.

Description. Dimensions amputee by 5.5 mm at x, 6.1 mm at clitellum, 4.6 mm at xxx. Body cylindrical and slightly flattened. Setae closely paired throughout; setal formula aa:ab:bc:cd:dd = 8.8:0.3:1:0.2:6.8. Setae quite visible preclitellar. Prostomium zygotobic. Rosy, clitellum slightly brownish. Ovipores not visible; male pores 3 mm apart on xvii within slits in paired elevated porophores; clitellum annular, xv-xxv (Figures 6.1a and 6.1b). Nephropores just above B.

Septa 6/7-10/11 equally thick and muscular, septa 13/14/15/16 highly expanded with a circumesophageal barrier to make a sac, knobby outside and fuzzy inside. Alimentary canal with cylindrical gizzard in vi; esophagus with high chevron-patterned lamellae vii-xi, valvular in xiv, intestinal origin xxiii; typhlosole origin xxiii, simple lamina xxiii-xxvi, zig-zag with ventral edge bent over to form pockets xxvii-xxxvi, after xxxvii gradually becoming simple lamina. Calciferous glands paired xii, composite-tubular type, heart shaped, pedunculated; blood vessels to gland include large branch of dorsal vessel to approximate center of each gland, two coalescing vessels from ventral gland margin to extra-esophageal vessel. Holonephric, vesiculate; ducts to body wall near level of B.

Vascular system with ventral trunk, single dorsal trunk, lateral vessels in vii-ix, latero-esophageal hearts in x-xi. Extra-esophageal vessel from pharyngeal glands, along ventral-lateral face of gizzard, esophagus back to calciferous glands; supraesophageal vessel in x-xi.

Ovaries, ovarian funnels free in xiii; spermathecae absent. Male sexual system metandric, testes and funnels in single midventral subesophageal sac in xi; seminal vesicles absent; vasa deferentia long, looped from xi, form S on body wall in route to ventrolateral outside of large reniform muscular copulatory bulbs; bulbs extend over xvi-xvii. Copulatory bulbs with thin muscular outer layer, dense, delicate corrugated glandular inner surface with small lumen leading to male pore at approximate center of bulb connection to body wall; no transverse muscle bands crossing over bulbs.

Remarks. *Glossoscolex (Glossoscolex) knapperae* belongs to the *Glossoscolex (Glossoscolex) truncatus* Rosa, 1895 group as defined in Cordero (1943) and Righi (1978). The group includes species with male pores in xvii, except

the subgenus *Praedrillus* (Righi 1971) with male pores in xvi, xvi/xvii and xvi and clitellum beginning behind the male pores. The differences between *G. (G.) knapperae* and *G. (G.) truncatus* Rosa 1895 are as follows, with the characteristics of the latter in parentheses: clitellum annular xv-xxv (annular xvi-xxv), hearts of xi free (hearts of xi enclosed in testes sacs), testes sacs single midventral subesophageal (testes sacs circumesophageal), septa 12/13/14 highly expanded (no such development in septa 12/13/14), seminal vesicle absent (present and tubular elongated) (Table 6.1).

Glossoscolex (Glossoscolex) knapperae corresponds to *Glossoscolex* n. sp. 3, as cited in chapters 1 and 2 this thesis.

6.5.1.1.1.2 *Glossoscolex (Glossoscolex) pastivus* n. sp. Bartz & James (Figures 6.1c and 6.1d)

Holotype. COFM BRRS0029 one adult. Type locality. Cultivated pasture, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, 29° 43' 05.32" S 53° 42' 25.19" W, 79 masl. 09 November 2010, G.P.K. Steffen & R.B. Steffen colls.

Paratype. COFM BRRS0030 one adult. Same locality as holotype.

Etymology. The species is named due its occurrence in pastures.

Description. Dimensions: holotype - 134 mm by 9.0 mm at x, 10.0 mm at clitellum, 7.0 mm at xxx, 194 segments; paratype - 126 mm by 9.0 mm at x, 10.0 mm at xvii and 7.0 mm at xxx, 209 segments. Body cylindrical and slightly flattened. Setae ab commence on xxii, but just ab are visible, cd visible after clitellum. Setae closely paired throughout; setal formula aa:ab:bc:cd = 8.7:0.2:1:0.1 at xxx, dd > 1/2 circumference throughout. Prostomium prolobous, post-setal secondary annulations present viii-xiv and after clitellum. Unpigmented/whitish, clitellum slightly pink. Ovipores in b 7 mm apart on xiv; male pores 6.7 mm apart on xvii within paired oval dimpled porophores; clitellum saddle to just above b, xv-xxii (Figures 6.1c and 6.1d). Nephropores near ab line.

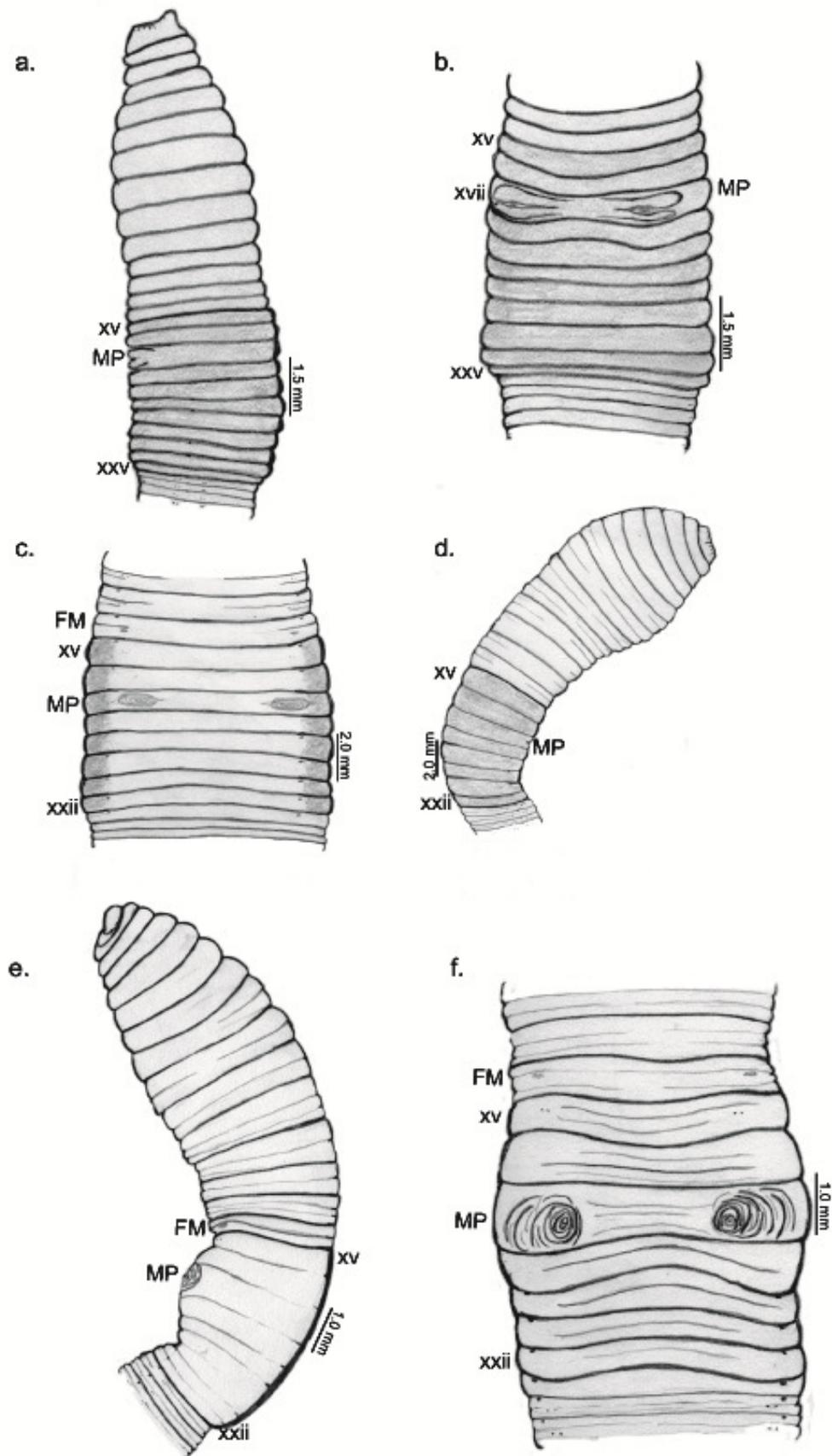


Figure 6.1 - New species of *Glossoscolex*. **a,b.** *Glossoscolex (Glossoscolex) knapperae* n. sp. **c,d.** *Glossoscolex (Glossoscolex) pastivus* n. sp. **e,f.** *Glossoscolex (Glossoscolex) pampas* n. sp. FM = female pores; MP = male pores.

Septa 5/6 thin, 6/7-10/11 equally thick and, muscular, septum 11/12 absent. Alimentary canal with large cylindrical gizzard in vi; esophagus with high lamellae in chevron pattern vii-ix, valvular in xiv, intestinal origin xv; typhlosole origin xvi-xxviii simple lamina, xix-xxviii, zig-zag with ventral edge bent over to form pockets, after xxix becoming triple lamina. Calciferous glands paired xii, under seminal vesicles, composite-tubular type, oval, pedunculated; blood vessels to gland include large branch of dorsal vessel to approximate center of each gland. Holonephric, vesiculate; ducts to body wall near level of b.

Vascular system with ventral trunk, single dorsal trunk, lateral vessels in vii-ix, latero-esophageal hearts in x-xi, last pair (xi) enclosed in test sac. Extra-esophageal vessel from pharyngeal glands, along ventral-lateral face of gizzard, esophagus back to calciferous glands; supraesophageal vessel in x-xi.

Ovaries, ovarian funnels free in xiii; spermathecae absent. Male sexual system metandric, testes and funnels in single midventral subesophageal sac in xi; medial to hearts of xi pass narrow tubes to seminal vesicles; seminal vesicles expanded in xii, penetrate septa and range posteriorly along intestine to xvii-xviii; seminal vesicles lobulated occupying xi to xvii (surrounding testes sacs in xi); vasa deferentia long, looped from xi, form dense zig-zag on body wall en route to front face of flattened short oval muscular copulatory bulbs, join bulbs in xvi, the with inner face of the bulbs are quite flattened, bulbs extend over xvi-1/3 xix. Copulatory bulbs with thin muscular outer layer, dense, delicate corrugated glandular inner surface with small lumen leading to male pore at approximate center of bulb connection to body wall; many thin muscle bands crossing transversly over bulbs.

Remarks. *Glossoscolex (Glossoscolex) pastivus* is similar to *Glossoscolex (G.) colonorum* Michaelsen 1918. The differences between *G. (G.) pastivus* and *G. (G.) colonorum* are as follows, with the characteristics of the latter in parentheses: length 126-134 mm (112-175 mm), number of segments 194-209 (175-323), setae beginning in xxii (setae beginning in segment vii), seminal vesicles lobulated xxi-xxviii (irregular stripes xxii-xvii), copulatory bulbs flattened short oval with flattened inner face (globular flattened) (Table 6.1). *Glossoscolex (G.) pastivus* belongs to the *truncatus* group, defined in Michaelsen (1918) and Righi (1978).

Glossoscolex (Glossoscolex) pastivus corresponds to *Glossoscolex* n. sp. 4, as cited in chapters 1 and 2 this thesis.

6.5.1.1.1.3 *Glossoscolex (Glossoscolex) pampas* n. sp. Bartz & James (Figures 6.1e and 6.1f)

Holotype. COFM BRRS0031 one adult, cultivated pasture, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, 29° 43' 05.32'' S 53° 42' 25.19'' W, 79 masl. 09 November 2010, G.P.K. Steffen & R.B. Steffen colls.

Paratype. COFM BRRS0032 one adult. Same locality as holotype.

Other material. COFM BRRS0034 two adults, native grassland, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil, 29° 49' 15.8'' S 57° 04' 56.7'' W, 59 masl. 08 September 2010, G.P.K. Steffen & R.B. Steffen colls. COFM BRRS0036 one adult, residential lawn, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, 29° 41' 53.19'' S 53° 45' 20.57'' W, 121 masl. 22 November 2009, G.P.K. Steffen & R.B. Steffen colls. COFM BRRS0037 three adults, black oats, Itaara, Rio Grande do Sul, Brazil, 29° 38' 55.50'' S 53° 44' 41.38'' W, 438 masl. 02 March 2012, G.P.K. Steffen & R.B. Steffen colls. COFM BRRS0035 one adult and three subadult, cultivated pasture, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, 29° 43' 05.32'' S 53° 42' 25.19'' W, 79 masl. 15 December 2012, G.P.K. Steffen & R.B. Steffen colls. COFM BRRS0033 two adults, cultivated pasture, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, 29° 43' 05.32'' S 53° 42' 25.19'' W, 79 masl. 03 October 2011, G.P.K. Steffen & R.B. Steffen colls.

Etymology. The species is named due its occurrence in cultivated pastures and native grasslands and is the latin name for "campeiro".

Description. Dimensions: Holotype - 176 mm by 7.0 mm at x, 8.0 mm at clitellum, 6.5 mm at xl, 274 segments; paratype - 199 mm by 8.1 mm at x, 8.3 mm at clitellum, 6.3 mm at xl, 268 segments. Body cylindrical. Setae closely paired throughout; setal formula aa:ab:bc:cd = 4.9:0.1:1:0.1 at xxx, dd > 1/2 circumference throughout. Setae quite visible before clitellum. Prostomium proepilobous, post-setal secondary annulations present vii-xxiv and after clitellum. Unpigmented/withish. Ovipores in ab in xiv. Male pores 3.8 mm apart on xvii within paired round papillae; segment xvii much narrowed; clitellum saddle, xv-xxii (Figures 6.3a and 6.3b). Nephropores just above b.

Septa 6/7-10/11 equally thick and muscular, septa 13/14/15/16 highly expanded with a circumesophageal barrier to make a sac, knobby outside and fuzzy

inside. Alimentary canal with barrel shaped gizzard in vi; esophagus with high chevron-patterned lamellae vii-xi, valvular in xiii, intestinal origin xiv; typhlosole origin xiv, in xv-xix is very wavy simple lamina, xx-xxi zig-zag with ventral edge bent over to form pockets, after xxii gradually becoming simple triple lamina. Calciferous glands paired xii, egg shaped, anterior face flattened and attached to septum 11/12, short pedunculated, composite-tubular type; blood vessels to gland include large branch of dorsal vessel to approximate center of each gland. Holonephric, vesiculate; ducts to body wall near level of b.

Vascular system with ventral trunk, single dorsal trunk, lateral vessels in vii-ix, esophageal hearts in x-xi, last hearts enclosed in test sacs. Extra-esophageal vessel from pharyngeal glands, along ventral-lateral face of gizzard, esophagus back to calciferous glands; supraesophageal vessel in x-xi.

Ovaries, ovarian funnels free in xiii. Male sexual system metandric, testes and funnels in single midventral subesophageal sac in xi; medial to hearts of xi pass narrow tubes to seminal vesicles; seminal vesicle lobulated, like butterflies wings, in xi-xii, surrounding testes sacs; vasa deferentia long, looped from xi, form dense zig-zag on body wall en route to middle ventro-anterior face of muscular short oval copulatory bulbs; bulbs extend over xv-xviii. Copulatory bulbs with thin muscular outer layer, dense, delicate corrugated glandular inner surface with small lumen leading to male pore at approximate center of bulb connection to body wall; no transverse muscle bands crossing over bulbs, inner face of bulb attached to body wall.

Remarks. *Glossoscolex (Glossoscolex) pampas* is similar to *Glossoscolex (G.) colonorum* Michaelsen 1918. The differences between *G. (G.) pampas* and *G. (G.) colonorum* are as follows, with the characteristics of the latter in parentheses: length 126-134 mm (112-175 mm), number of segments 176-199 (175-323), setae not visible before clitellum (setae beginning in segment vii), seminal vesicles lobulated xi-xii (irregular stripes xxii-xvii), copulatory bulbs short oval (globular flattened). *G. (G.) pampas* is also very similar to *G. (G.) pastivus*, the differences are in the extension of the seminal vesicles xi-xii (xxi- xxviii), extension of the typhlosole pocket part xx-xxi (xix-xxviii), and specially the form of the male pores round papillae (oval dimples porophores) (Table 6.1). *Glossoscolex (G.) pampas* belongs to the *truncatus* group, defined in Michaelsen (1918) and Righi (1978).

Glossoscolex (Glossoscolex) pampas corresponds to *Glossoscolex* n. sp. 2, as cited in chapters 1, 2 and 3 this thesis.

6.5.1.1.1.4 *Glossoscolex (Glossoscolex) riograndensis* n. sp. Bartz & James (Figures 6.2a and 6.2b)

Holotype. COFM BRRS0038 one adult, fragment of native forest, Rosário do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil, 30° 02' 07,7" S 54° 34' 51,8" W, 105 masl. 09 November 2011, G.P.K. Steffen & R.B. Steffen colls.

Paratype. COFM BRRS0039 one adult. Same locality as holotype.

Other material. COFM BRRS0040 one adult and 2 subadults, fragment of native forest, Rosário do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil, 30° 02' 07,7" S 54° 34' 51,8" W, 105 masl. 09 November 2011, G.P.K. Steffen & R.B. Steffen colls. COFM BRRS0041 four adults and two subadults, fragment of native forest, Rosário do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil, 30° 02' 07,7" S 54° 34' 51,8" W, 174 masl. 09 November 2009, G.P.K. Steffen & R.B. Steffen colls. COFM BRRS0042 four adults and two subadults, black acacia plantation, Rosário do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil, 30° 05' 50,7" S 54° 37' 53,4" W, 151 masl. 09 November 2009, G.P.K. Steffen & R.B. Steffen colls.

Etymology. The species is named due its occurrence at the State of Rio Grande do Sul, Brazil.

Description. Dimensions: Holotype - 54 mm by 3.7 mm at x, 4.0 mm at clitellum, 3.5 mm at xl, 195 segments; paratype - 53 mm by 4.1 mm at x, 4.2 mm at clitellum, 3.7 mm at xl, 125 segments. Body cylindrical. Setae closely paired throughout; setal formula aa:ab:bc:cd = 2.7:0.1:0.3:0.1 at xxx, dd > 1/2 circumference throughout. Setae not visible before clitellum. Prostomium prolobous. Unpigmented/whitish. Ovipores in a in xiv. Male pores 2.8 mm apart on xvii within paired round elevations (like a mound); clitellum saddle, xv-xxiii (Figures 6.2a and 6.2b). Nephropores just above b.

Septa 6/7-10/11 equally thick and muscular. Alimentary canal with barrel shaped gizzard in vi; esophagus with high chevron-patterned lamellae vii-xi, valvular

in xii, intestinal origin xiii; typhlosole origin xiii, in xiii-xxv zig-zag with ventral edge bent over to form pockets, xxvi-xlii straight lamina in Z form occupying half of the diameter of the intestine, after xliii gradually becoming simple S form lamina. Calciferous glands paired xii, heart shaped, pedunculated, composite-tubular type; blood vessels to gland include large branch of dorsal vessel to approximate center of each gland. Holonephric, vesiculate; ducts to body wall near level of c.

Vascular system with ventral trunk, single dorsal trunk, lateral vessels in vii-ix, esophageal hearts in x-xi. Extra-esophageal vessel from pharyngeal glands, along ventral-lateral face of gizzard, esophagus back to calciferous glands; supraesophageal vessel in x-xi.

Ovaries, ovarian funnels free in xiii. Male sexual system metandric, testes and funnels in U shaped sac in xii projected to-xiii; medial to hearts of xii pass narrow tubes to seminal vesicles; seminal vesicles tubular while passing through xii-xiii, in xii the edges of the seminal vesicles are connected to the testes sacs and in xii passing under testes sacs, after xiii seminal vesicle tubular with lobulated edges ranging posteriorly along intestine farther than lxii; vasa deferentia long, looped from seminal vesicles in xii, form dense zig-zag on body wall en route to middle-anterior face of muscular round, slightly oval copulatory bulbs; bulbs extend over xvi-xviii. Copulatory bulbs with thin muscular outer layer, dense, delicate corrugated glandular inner surface with small lumen leading to male pore at approximate center of bulb connection to body wall; no transverse muscle bands crossing over bulbs, under face of bulb attached to body wall.

Remarks. *Glossoscolex (Glossoscolex) riograndensis* is similar to *Glossoscolex (G.) uruguayensis uruguayensis* Cordero 1943. The differences between *G. (G.) riograndensis* and *G. (G.) uruguayensis uruguayensis* are as follows, with the characteristics of the latter in parentheses: length 53-54 mm (170-221 mm), number of segments 125-195 (230-285), clitellum extension xv-xxiii (xv-xxii), test sacs U shaped sac in xii-xiii (U shaped in xi), seminal vesicles big tubular with lobulated edges until lxii (big lobulated until xiv), copulatory bulbs round, slightly oval (big oval) (Table 6.1). *Glossoscolex (G.) riograndensis* belongs to the *truncatus* group, defined in Michaelsen (1918) and Righi (1978).

Glossoscolex (Glossoscolex) riograndensis corresponds to *Glossoscolex* n. sp. 1, as cited in chapters 1, 2 and 3 this thesis.

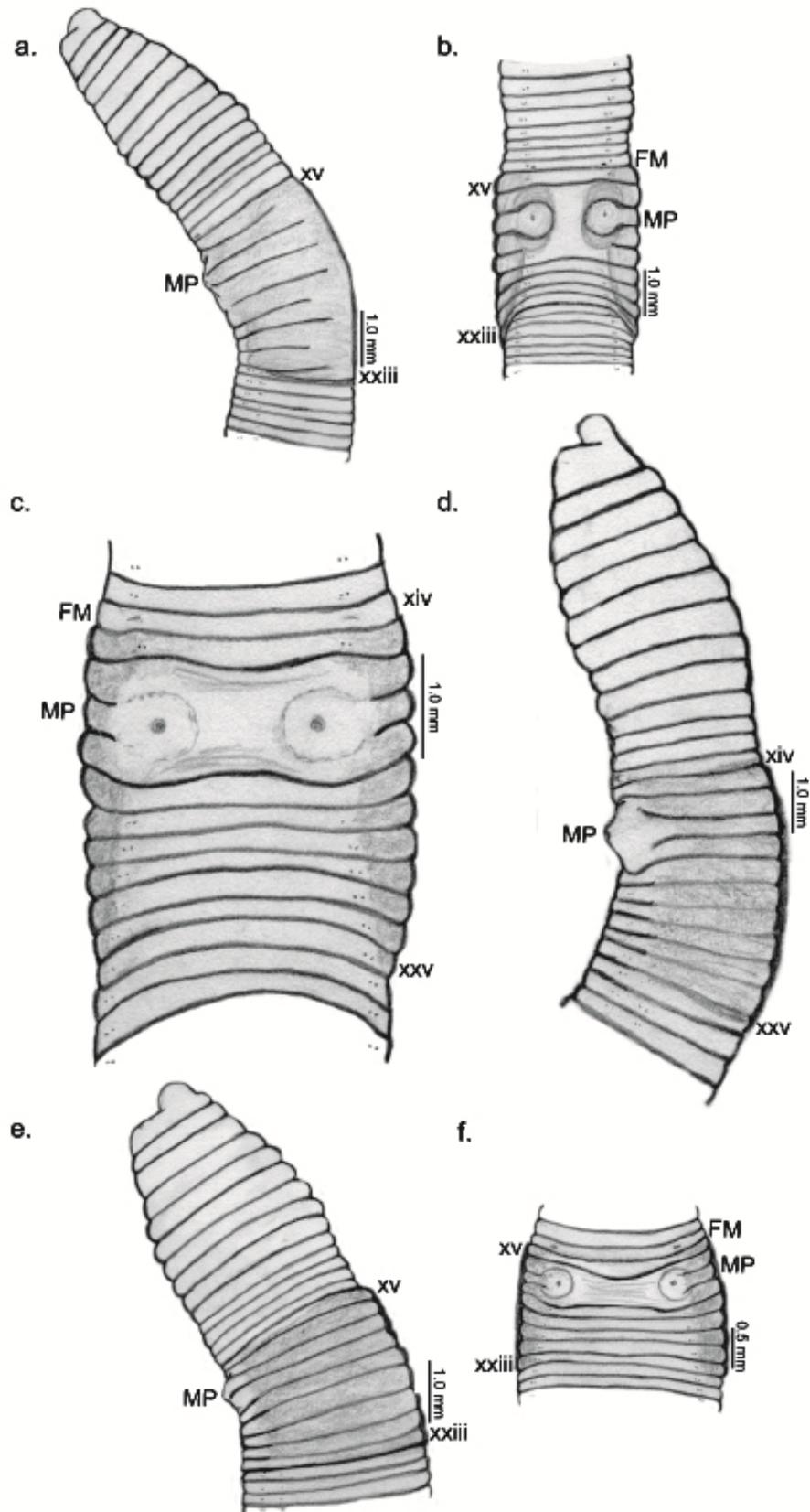


Figure 6.2 - New species of *Glossoscolex*. **a,b.** *Glossoscolex (Glossoscolex) riograndensis* n. sp. **c,d.** *Glossoscolex (Glossoscolex) nativus* n. sp. **e,f.** *Glossoscolex (Glossoscolex) parvus* n. sp. FM = female pores; MP = male pores.

6.5.1.1.1.5 *Glossoscolex (Glossoscolex) nativus* n. sp. Bartz & James (Figures 6.2c and 6.2d)

Holotype. COFM BRRS0043 one adult, native grassland, Santana do Livramento, Rio Grande do Sul, Brazil, 29° 46' 23,1" S 54° 05' 43,1" W, 181 masl. 19 August 2010, M.P. Pontelli coll.

Paratype. COFM BRRS0044 one adult. Same locality as holotype.

Etymology. The species is named from latin for "native", a native species from the State of Rio Grande do Sul, Brazil.

Description. Dimensions: Holotype - 48 mm by 3.2 mm at x, 4.0 mm at clitellum, 3.8 mm at xl, 169 segments; paratype - 53 mm by 4.1 mm at x, 4.2 mm at clitellum, 3.7 mm at xl, 180 segments. Body cylindrical. Setae closely paired throughout; setal formula aa:ab:bc:cd = 2.6:0.1:0.4:0.1 at xxx, dd > 1/2 circumference throughout. Setae not visible before clitellum. Prostomium prolobous. Unpigmented. Ovipores almost invisible, in ab. Male pores 1.9 mm apart on xvii within paired round elevations (like a mound); clitellum saddle, 1/2 xiv-1/2 xxv in the dorsal face, ventral xv-1/2 xxv (Figures 6.2c and 6.2d). Nephropores after clitellum in line of b.

Septa 6/7-10/11 equally thick and muscular. Alimentary canal with barrel shaped gizzard in vi; esophagus with high chevron-patterned lamellae vii-xi, valvular in xii, intestinal origin xiii; typhlosole origin xiii, in xiii-xxvii zig-zag with ventral edge bent over to form pockets, after xxviii simple wavy lamina. Calciferous glands paired xii, flat bean shaped, pedunculated, composite-tubular type; blood vessels to gland include large branch of dorsal vessel to approximate center of each gland. Holonephric, vesiculate; ducts to body wall near level of b.

Vascular system with ventral trunk, single dorsal trunk, lateral vessels in vii-ix, esophageal hearts in x-xi. Extra-esophageal vessel from pharyngeal glands, along ventral-lateral face of gizzard, esophagus back to calciferous glands; supraesophageal vessel in x-xi.

Ovaries, ovarian funnels free in xiii. Male sexual system metandric, testes and funnels in U shaped sac in xii projected to xiii; medial to hearts of xii pass narrow tubes to seminal vesicles; seminal vesicle tubular with lobulated edges pass through xi-xii range posteriorly along intestine farther than lxxiv; vasa deferentia long, looped

from seminal vesicles in xii, form dense zig-zag on body wall en route to middle-anterior face of muscular round copulatory bulbs; bulbs extend over xvi-xviii. Copulatory bulbs with thin muscular outer layer, dense, delicate corrugated glandular inner surface with small lumen leading to male pore at approximate center of bulb connection to body wall; transverse muscle bands crossing over bulbs on the anterior and posterior faces.

Remarks. *Glossoscolex (Glossoscolex) nativus* is similar to *Glossoscolex (G.) uruguayensis uruguayensis* Cordero 1943. The differences between *G. (G.) riograndensis* and *G. (G.) uruguayensis uruguayensis* are as follows, with the characteristics of the latter in parentheses: length 48-53 mm (170-221 mm), number of segments 169-180 (230-285), clitellum extension $\frac{1}{2}$ xiv- $\frac{1}{2}$ xxv (xv-xxii), test sacs U shaped sac in xii-xiii (U shaped in xi), seminal vesicles big tubular with lobulated edges until lxxiv (big lobulated until xiv), copulatory bulbs round (big oval). *G. (G.) nativus* is very similar to *G. (G.) riograndensis*, the differences are the clitellum extension $\frac{1}{2}$ xiv-xv (xv-xxii), seminal vesicle extension xii- lxxii (xi- xiv) (Table 6.1). *Glossoscolex (G.) nativus* belongs to the *truncatus* group, defined in Michaelsen (1918) and Righi (1978).

Glossoscolex (Glossoscolex) nativus corresponds to *Glossoscolex* n. sp. 6, as cited in chapters 1, 2 and 3 this thesis.

6.5.1.1.1.6 *Glossoscolex (Glossoscolex) parvus* n. sp. Bartz & James (Figures 6.2e and 6.2f)

Holotype. COFM BRRS0045 one adult, fragment of native forest, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, 29° 39' 44,89" S 53° 54' 50,36" W, 276 masl. 26 October 2009, G.P.K. Steffen & R.B. Steffen colls.

Paratype. A - COFM BRRS0046 one adult. Same locality as holotype. B - COFM BRRS0047 one subadult. Same locality as holotype.

Other material. COFM BRRS0048 one subadult, fragment of native forest, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, 29° 39' 44,89" S 53° 54' 50,36" W, 276 masl. 26 October 2009, G.P.K. Steffen & R.B. Steffen colls.

Etymology. The species is named from Latin for “small”.

Description. Dimensions: Holotype - 31 mm by 3.5 mm at x, 3.8 mm at clitellum, 3.8 mm at xl, 134 segments; paratypes: A - 33 mm by 3.0 mm at x, 3.7 mm at clitellum, 3.5 mm at xl, 139 segments; B - 36 mm by 3.5 mm at x, 4.0 mm at clitellum, 3.7 mm at xl, 116 segments. Body cylindrical. Setae closely paired throughout; setal formula aa:ab:bc:cd:dd = 3.2:0.1:0.5:0.1:3.8. Setae commence in xi. Prostomium prolobous. Unpigmented.whitish. Ovipores post setal, in a line. Male pores 2.0 mm apart on xvii within paired round elevations (like a mound); clitellum saddle, xv- xxiii (Figures 6.2e and 6.2f). Nephropores after clitellum in line of b.

Septa 6/7-10/11 equally thick and muscular. Alimentary canal with barrel shaped gizzard in vi; esophagus with high chevron-patterned lamellae vii-xi, valvular in xii, intestinal origin xiii; typhlosole origin xiii, in xiii-xxvi zig-zag with ventral edge bent over to form pockets, after xxvii simple wavy lamina. Calciferous glands paired xii, small heart shaped, pedunculated, composite-tubular type; blood vessels to gland include large branch of dorsal vessel to approximate center of each gland. Holonephric, vesiculate; ducts to body wall near level of b. Some nephridia in the anterior segments (vi) full of sperm (or other highly iridescent material).

Vascular system with ventral trunk, single dorsal trunk, lateral vessels in vii-ix, esophageal hearts in x-xi. Extra-esophageal vessel from pharyngeal glands, along ventral-lateral face of gizzard, esophagus back to calciferous glands; supraesophageal vessel in x-xi.

Ovaries, ovarian funnels free in xiii. Male sexual system metandric, testes and funnels in U shaped sac in xii projected to xiii; medial to hearts of xii pass narrow tubes to seminal vesicles; seminal vesicle tubular with lobulated edges pass through xi-xii range posteriorly along intestine farther than lxxiv; vasa deferentia long, looped from seminal vesicles in xii, form dense zig-zag on body wall en route to middle-anterior face of muscular round copulatory bulbs; bulbs extend over xvi-xviii. Copulatory bulbs with thin muscular outer layer, dense, delicate corrugated glandular inner surface with small lumen leading to male pore at approximate center of bulb connection to body wall; transverse muscle bands crossing over bulbs on the anterior and posterior faces.

Remarks. *Glossoscolex (Glossoscolex) parvus* is similar to *Glossoscolex (G.) minor* Zicsi & Czusdi 1999. The differences between *G. (G.) parvus* and *G. (G.) minor*

are as follows, with the characteristics of the latter in parentheses: length 31-36 mm (22-45mm), number of segments 116-139 (198-231), clitellum saddle (annular), clitellum extension xv- xxii (xiv-xxiii), test sacs U shaped sac in xii-xiii (unpaired in xi), seminal vesicles big tubular with lobulated edges until lxxiv (band until l), copulatory bulbs round (elongated). *G. (G.) nativus* is very similar to *G. (G.) riograndensis*, the differences are the length 31-36 (53-54) and specially because the storage of sperm in the anterior nephridia in *G. G. parvus* (Table 6.1). *Glossoscolex (G.) parvus* belongs to the *truncatus* group, defined in Michaelsen (1918) and Righi (1978).

Glossoscolex (Glossoscolex) parvus corresponds to *Glossoscolex* n. sp. 5, as cited in chapters 1 and 2 this thesis.

Table 6.1 - Comparison of characters of the new species (in bold) *Glossoscolex (Glossoscolex)*, the type species for each genus and subgenus and the species compared in the remarks. Genus, subgenus and species in bold are the new species described.

| Genus and subgenus | Species | Author | Length | Segments | Setal ratio | Clitellum | Male pore | Calciferous gland | Testes sacs | Septa 12/13/14 | Last hearts | Seminal vesicle | Copulatory bulbs |
|------------------------------------|----------------------|---------------------|---------|----------|--|------------------------|-----------|-------------------------|--------------------------|-------------------|-------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Glossoscolex (Glossoscolex)</i> | <i>knapperae</i> | Bartz & James | - | - | 8.8:0.3:1:0.2:6.8 | annular, xv-xxv | xvii | heart shaped, xii | unpaired, xi | developed, united | free | absent | reniform, xv-xvii |
| <i>Glossoscolex (Glossoscolex)</i> | <i>nativus</i> | Bartz & James | 48-53 | 169-180 | 2.6:0.1:0.4:0.1, dd > 1/2 Ø | saddle, 1/2 xv-1/2 xxv | xvii | flat bean shaped, xii | 1 pair, U form, xii-xiii | simple | free | tubular, lobular edges, xii-lxxiv | round, xvi-xviii |
| <i>Glossoscolex (Glossoscolex)</i> | <i>riograndensis</i> | Bartz & James | 53-54 | 125-195 | 2.7:0.1:0.3:0.1, dd > 1/2 Ø | saddle, xv-xxiii | xvii | heart shaped, xii | 1 pair, U form, xii-xiii | simple | free | tubular, lobular edges, xii-lxii | round, xvi-xviii |
| <i>Glossoscolex (Glossoscolex)</i> | <i>parvus</i> | Bartz & James | 31-36 | 116-139 | 3.2:0.1:0.5:0.1:3.8 | saddle, xv-xxiii | xvii | small heart shaped, xii | 1 pair, U form, xii-xiii | simple | free | tubular, lobular edges, xii-lxii | round, slightly oval, xvi, xviii |
| <i>Glossoscolex (Glossoscolex)</i> | <i>pastivus</i> | Bartz & James | 126-134 | 194-209 | 8.7:0.2:1:0.1, dd > 1/2 Ø | saddle, xv-xxii | xvii | oval, xii | unpaired, xi | simple | enclosed | lobulated, xi-xvii | flattened short oval, xvi-1/3 xix |
| <i>Glossoscolex (Glossoscolex)</i> | <i>pampas</i> | Bartz & James | 176-199 | 268-274 | 4.9:0.1:1:0.1, dd > 1/2 Ø | saddle, xv-xii | xvii | egg shaped, xii | unpaired, xi | developed, united | enclosed | lobulated, xi-xvii | short oval, xv-xviii |
| <i>Glossoscolex (Glossoscolex)</i> | <i>colonorum</i> | Michaelsen 1918 | 112-175 | 175-323 | aa = 2 1/2 - 3 1/2 bc, dd = ca. 1/2 u. | saddle, xv/xx,xxi | xvii | oval, xi | unpaired, xi | - | - | irregular stripes, xii-xvii | flattened globular |
| <i>Glossoscolex (Glossoscolex)</i> | <i>minor</i> | Zicsi & Csuzdi 1999 | 24-45 | 198-231 | 30:1:10:1:5 0 | annular, xiv-xxiii | xvii | xi/xii | unpaired, xi | - | - | band shaped, xi-50 | elongated, xiv-xix |
| <i>Glossoscolex (Glossoscolex)</i> | <i>truncatus</i> | Rosa 1895 | 80-160 | 200-300 | - | annular, xvi-xxv | xvii | xii | 1 pair, U form, xi | - | enclosed | tubular elongate, xi,xii-xviii | long oval, xvii-xviii |
| <i>Glossoscolex (Glossoscolex)</i> | <i>uruguayensis</i> | Cordero 1943 | 170-221 | 230-285 | 42:1:8:1:52 | saddle, xv-xxii | xvii | oval, xii | 1 pair, U form, xi | incomplete | enclosed | big and lobulated, xi-xiv | big oval, xiv-xviii |

Table 6.2 - Soil chemical and textural attributes from some areas where the new species of *Glossoscolex* occur.

| Specie | COFM N° | Locality in RS | Vegetation | Soil characteristics | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------|----------------------|------|------------------------|-----|-----|-------|-----|------|------|------|-----|-----|------|-----|---|
| | | | | pH | CEC | Ca | Mg | Al | Bases | OM | Clay | S | P | K | Cu | Zn | B | |
| | | | | | | cmolc dm ⁻³ | | | | | | | | | | | | % |
| <i>G. (G.) knapperae</i> | 0028 | Caçapava do Sul | Native grassland | 4.6 | 3.7 | 2.5 | 0.3 | 0.6 | 50 | 2.2 | 9 | 14.7 | 6 | 108 | 5.3 | 3.2 | 0.1 | |
| <i>G. (G.) pastivus</i> | 0029; 0030 | Santa Maria | Cultivated pasture | 4.9 | 8.0 | 5.2 | 2.2 | 0.4 | 55 | 2.8 | 18 | - | 8.4 | 60 | - | - | - | |
| <i>G. (G.) pampas</i> | 0031; 0032; 0033; 0035 | Uruguaiana | Native grassland | 4.8 | 12.2 | 7.3 | 2 | 2.8 | 49 | 1.1 | 30 | 8.6 | 3 | 32 | 4 | 1.8 | 0.1 | |
| <i>G. (G.) riograndensis</i> | 0038;0039; 0040 | Rosário do Sul | Fragment of native forest | 5.9 | 4.2 | 2.5 | 0.9 | 0 | 63 | 1.2 | 19 | 4.6 | 35.8 | 328 | 0.3 | 2.7 | 0.5 | |
| <i>G. (G.) riograndensis</i> | 0041 | Rosário do Sul | Fragment of native forest | 5.4 | 8.7 | 6.2 | 1.7 | 0.1 | 64 | 5.5 | 18 | 10 | 76 | 268 | 0.2 | 10.3 | 0.2 | |
| <i>G. (G.) riograndensis</i> | 0042 | Rosário do Sul | Black acacia plantation | 4.8 | 2.3 | 0.9 | 0.4 | 0.8 | 28 | 1.5 | 14 | 7 | 6 | 80 | 0.4 | 2 | 0.2 | |
| <i>G. (G.) nativus</i> | 0043; 0044 | Santana do Livramento | Native grassland | 5.1 | 1.6 | 0.7 | 0.5 | 0.2 | 38 | 0.8 | 8 | 11.4 | 3 | 68 | 1.3 | 1.4 | 0.3 | |
| <i>G. (G.) parvus</i> | 0045; 0046; 0047; 0048 | Santa Maria | Fragment of native forest | 4.9 | 3.8 | 2.3 | 0.7 | 0.6 | 36 | 2.8 | 14 | 12.6 | 5.3 | 60 | 0.3 | 1.5 | 0.4 | |

6.6 Conclusions

Six new species of Oligochaeta of the genus *Glossoscolex* were described: *Glossoscolex (Glossoscolex) knapperae* n. sp., *Glossoscolex (Glossoscolex) pastivus* n. sp., *Glossoscolex (Glossoscolex) pampas* n. sp., *Glossoscolex (Glossoscolex) riograndensis* n. sp., *Glossoscolex (Glossoscolex) nativus* n. sp. and *Glossoscolex (Glossoscolex) parvus* n. sp.

6.7 References

CORDERO, E. H. Oligoquetos sudamericanos de la familia Glossoscolecidae, 1. El género *Glossoscolex* en el Uruguay, con una synopsis de las especies del grupo *truncatus*. **Comunicaciones Zoológicas del Museo de Historia Natural de Montevideo**, v. 1, n. 2, p. 1-9, 1943.

FRORIEP, L. F. Versammlung deutscher Naturforscher und Aerzte zu Bonn, im September 1835. **Notizen aus dem Gebiete der Natur- und Heilkunde**, v. 46, p. 82-96, 1835.

MICHAELSEN, W. Terricolen der Berliner Zoologischen Sammlung, II. **Archiv für Naturgeschichte**, Berlin, v. 58, p. 209-261, 1892.

MICHAELSEN, W. Organisation einiger neuer oder wenig bekannter Regenwürmer von Westingen und Südmareka. **Zoologisches Jahrbüchern**, Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Thiere, v. 10, p. 359-388, 1897.

MICHAELSEN, W. **Oligochaeta**. Das Tierreich 10. Berlin, R. Frieländer and Sohn, 1-575, 1900.

MICHAELSEN, W. Die Lumbriciden, mit besonderer Berücksichtigung der bisher als Familie Glossoscolecidae zusammengefassten Unterfamilien. **Zoologisches Jahrbücher, Abteilung für Systematik, Ökologie und Geographie der Tiere** v. 41, p. 1-398, 1918.

OKEN, L. Versammlung der Naturforscher und Aerzte zu Bonn im September 1835. **Isis**, v. 46, p. 757-808, 1835.

RIGHI, G. Sobre a Família Glossoscolecidae (Oligochaeta) no Brasil. **Arquivos de Zoologia**, v. 20, n. 1, p. 1-96, 1971.

RIGHI, G. Alguns Oligochaeta Megadrili da Argentina. **Fave**, v. 1, n. 3, p. 167-178, 1978.

RIGHI, G. Colombian earthworms. In: **Studies on Tropical Andean Ecosystems** Vol. 4, ed. T. van der Hammen, Cramer (Borntraeger), Berlin-Stuttgart, p. 485-607, 1995.

ROSA, D. Oligocheti terricoli (Inclusi quelli raccolti nel Paraguay dal Dr. Paul Jordan). **Bolletino dei Museo di Zoologia et Anatomia Comparata di Torino**, v. 10, n. 204, p. 1-3, 1895.

TEDESCO, M. J. et al. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: Departamento de Solos, UFRGS, 1995, 174p.

ZICSI, A.; CSUZDI, C. Neue und bekannte Regenwürmer aus verschiedenen Teilen Südamerikas. **Senckenbergiana Biologica**, v. 78, n. 1/2, p. 123-134, 1999.

7 CAPÍTULO V - EXTRAÇÃO DE MINHOCAS DO SOLO COM SOLUÇÃO ATÓXICA ALTERNATIVA AO FORMALDEÍDO¹⁴

7.1 Resumo

Soluções contendo formaldeído em diferentes concentrações são os extratores químicos mais utilizados na amostragem de minhocas, embora representem riscos potenciais de contaminação ao homem e ao ambiente. O objetivo deste estudo foi determinar a capacidade do extrato de cebola, uma solução de baixo custo e potencial poluente, alternativa ao uso do formaldeído, na extração de minhocas do solo. Primeiramente, foram comparadas soluções de extrato de cebola (*Allium cepa* L.) nas concentrações de 25, 75, 125 e 175 g de cebola por litro de solução com a solução padrão para extração de minhocas, formaldeído 0,5%, em solo argiloso pertencente à classe dos Latossolos. Em uma segunda etapa, após a determinação da concentração de extrato de cebola que apresentou capacidade comparável à solução padrão de formaldeído na extração de minhocas do solo, realizou-se uma avaliação em solo arenoso pertencente à classe dos Argissolos. Em solo argiloso, a solução de extrato de cebola na concentração de 175 g L⁻¹ apresentou capacidade semelhante ou superior à solução de formaldeído 0,5% na extração de minhocas do solo. Em solo arenoso, não foi observada diferença significativa na capacidade das soluções de formaldeído 0,5% e extrato de cebola na concentração de 175 g L⁻¹ na extração de minhocas adultas e na biomassa fresca de minhocas. A solução de extrato de cebola apresentou capacidade superior à solução de formaldeído no número total de minhocas extraídas do solo. A solução contendo extrato de cebola na concentração de 175 g L⁻¹ apresenta capacidade semelhante à solução extratora padrão (formaldeído 0,5%) na extração de minhocas em solos de textura argilosa e arenosa. O extrato de cebola pode ser uma alternativa atóxica, eficiente e de baixo custo, alternativa à solução de formaldeído, para extração de minhocas do solo.

Palavras-chave: Oligoquetas; extratores; *Allium cepa* L.

¹⁴ Trabalho aceito para publicação na Applied Soil Ecology.

7.2 Introdução

Em solos, a avaliação da densidade populacional e biomassa de minhocas pode ser realizada por diferentes métodos de extração, sendo que a coleta manual e o uso de soluções irritantes são frequentemente utilizados (RESSETTI et al., 2008). O formaldeído é utilizado em métodos padrão (ISO 23611-1, 2002) de extração química, por causa da sua elevada eficiência em expulsar minhocas do interior do solo. No entanto, sua utilização como solução extratora tem sido questionada devido ao seu potencial carcinogênico e destrutivo, representando riscos à saúde humana e do ambiente. Por esta razão, buscam-se soluções eficientes para extração de minhocas do solo, porém inofensivas ao homem e à vida animal e vegetal que habita os ecossistemas.

A cebola (*Allium cepa* L.), assim como as demais espécies do gênero *Allium*, caracteriza-se pelo seu teor de compostos sulfurados (SCHUNEMANN et al., 2006). Quando os tecidos frescos da cebola são danificados por corte, trituração ou maceração, ocorre a destruição de milhões de células que liberam seu conteúdo. Os compostos sulfurados 1-propenil-L-cisteína sulfóxido, através de uma reação enzimática catalizada pela alinase, produzem inicialmente, ácidos sulfênicos (ácido 1-propenilsulfênico, ácido pirúvico e amônia) (RANDLE; LANCASTER, 2002; SCHUNEMANN et al., 2006; MUNIZ, 2007). Os ácidos sulfênicos são os intermediários altamente reativos que produzem imediatamente tiosulfatos por reação de condensação (LANZOTTI, 2006). O ácido propenilsulfênico transforma-se espontaneamente em propanotal-S-ácido, composto volátil reconhecidamente irritante (RANDLE; LANCASTER, 2002; SCHUNEMANN et al., 2006). Possivelmente, estes compostos ácidos presentes no interior das células da cebola sejam eficientes na expulsão de minhocas do solo.

O objetivo deste trabalho foi determinar a capacidade do extrato de cebola na extração de minhocas do solo.

7.3 Material e métodos

O estudo foi realizado em dois municípios do Estado do Rio Grande do Sul (Santa Maria e Santo Cristo), em áreas com diferentes classes de solo (Argissolo e Latossolo).

Para testar a eficiência na extração de minhocas, um estudo preliminar foi realizado para definição das concentrações de extrato de cebola que seriam posteriormente comparadas à solução considerada padrão pela ISO 23611-1 (2002), formaldeído 0,5%. Neste ensaio, foram avaliadas as concentrações de 60, 80, 100, 170 e 200 g de cebola por litro de água, utilizando-se quatro repetições por tratamento, em solo de textura arenosa (14% de argila) classificado como Argissolo Vermelho-amarelo, localizado sob pomar de citros no município de Santa Maria (Figura 7.1 A).



Figura 7.1 - Locais onde foram conduzidos os experimentos. (A) Pomar de citros, município de Santa Maria, RS e (B) Lavoura de milho, município de Santo Cristo, RS.

No experimento seguinte, quatro soluções contendo diferentes concentrações de extrato de cebola (25, 75, 125 e 175 g de cebola por litro de água) foram comparadas com a solução de formaldeído a 0,5%, para testar sua eficiência na extração de oligoquetas do solo. Este ensaio foi realizado em solo de textura argilosa (39% de

argila), em lavoura de milho, com 40 dias de implantação, cultivado em sistema de plantio direto no município de Santo Cristo. O solo da área foi classificado como Latossolo Vermelho de textura argilosa (Figura 7.1 B). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e seis repetições.

Posteriormente, comparou-se a viabilidade da solução de extrato de cebola que apresentou maior eficiência na extração de minhocas do solo no ensaio anterior (175 g de cebola por litro de água) com solução de formaldeído 0,5%. Esta avaliação foi realizada no Argissolo sob pomar de citros no município de Santa Maria (Figura 7.1 B). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com dois tratamentos e seis repetições.

A solução de formaldeído 0,5% foi previamente preparada em laboratório por meio da diluição de 20 mL de formaldeído (37%) em quatro litros de água. As soluções contendo extrato de cebola foram preparadas momentos antes da sua aplicação no solo, sendo utilizadas cebolas de coloração branca, variedade Nacional, as quais foram descascadas e pesadas em lotes correspondentes a cada tratamento. Em seguida, cada lote foi fragmentado em liquidificador juntamente com 500 mL de água, durante 60 segundos. Posteriormente, a solução foi filtrada em coador de tecido para retirada do material vegetal e armazenada em recipientes plásticos com capacidade para 5 litros de solução, completando-se o volume para quatro litros.

Os solos nos quais foram conduzidos os experimentos apresentaram as seguintes características: Argissolo (140 g kg⁻¹ de argila; 39 g kg⁻¹ de matéria orgânica; pH H₂O = 6,0; P = 39 mg kg⁻¹; K = 0,56 cmol_c kg⁻¹; Al = 0 cmol_c kg⁻¹; Ca+Mg = 7,60 cmol_c kg⁻¹) e Latossolo (390 g kg⁻¹ de argila; 21 g kg⁻¹ de matéria orgânica; pH H₂O = 5,7; P = 4,5 mg kg⁻¹; K = 0,72 cmol_c kg⁻¹; Al = 0 cmol_c kg⁻¹; Ca+Mg = 24,8 cmol_c kg⁻¹).

Em cada local analisado, foram amostrados seis pontos por tratamento, distantes 5 m entre si para evitar interferência na avaliação. Definido aleatoriamente o primeiro ponto de coleta, foram retirados manualmente os resíduos orgânicos presentes na superfície do solo e, em seguida, fixado um anel metálico de 0,5 m de diâmetro e 0,05 m de altura, totalizando uma área de 0,196 m² (Figura 7.2). O anel foi fixado no solo a uma profundidade de 1 cm.



Figura 7.2 - Anel metálico utilizado na extração de minhocas do solo.

Na sequência, aplicou-se um volume total de quatro litros da solução extratora correspondente ao ponto avaliado na área interna do anel metálico. Durante um período de dez minutos após a completa infiltração da solução (TANCK et al., 2000; ZABORSKI, 2003), procedeu-se a coleta das minhocas expulsas do solo, as quais foram retiradas com o auxílio de pinças e armazenadas em recipientes plásticos, previamente identificados, contendo etanol 70%, para posterior determinação da densidade populacional e biomassa de minhocas.

As minhocas foram transportadas para o laboratório, onde foi realizada a contagem e pesagem dos organismos para determinação da densidade e biomassa fresca de minhocas, respectivamente. Os dados de densidade populacional e biomassa de minhocas foram transformados para área de um metro quadrado. Em seguida, foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, com o auxílio do software SISVAR (FERREIRA, 2000).

Os resultados referentes ao número total de minhocas, minhocas adultas, minhocas jovens e biomassa foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias foram comparadas por análise de variância de regressão, por meio do programa SISVAR (FERREIRA, 2000), utilizando o nível de 5% de significância. Os valores de número total, número de minhocas adultas e biomassa fresca de minhocas extraídas em solo arenoso pelas soluções de formaldeído 0,5% e extrato de cebola na

concentração de 175 g L^{-1} também foram correlacionados através da análise de correlação de Pearson, conforme metodologia descrita por Motta e Wagner (2003).

7.4 Resultados e discussão

No experimento preliminar conduzido para definição das concentrações de extrato de cebola que seriam posteriormente comparadas à solução de formaldeído 0,5%, as soluções contendo 60, 80, 100, 170 e 200 g de cebola por litro de água extraíram, em média, 19, 22, 27, 47 e 38 minhocas (jovens e adultas) por metro quadrado, respectivamente. Estes resultados indicaram que, possivelmente, soluções contendo concentrações iguais ou superiores a 200 g de cebola por litro de água não proporcionariam aumento do número total de minhocas extraídas do solo. Resultados similares foram obtidos por Chan e Munro (2001) ao avaliarem o uso de suspensão de mostarda na extração de minhocas. Os autores observaram que a densidade de minhocas extraídas do solo aumentou com a elevação da concentração da suspensão de mostarda até determinado ponto, quando a capacidade da solução irritante começou a diminuir.

Com base nos resultados obtidos no ensaio preliminar, definiram-se as concentrações de extrato de cebola testadas no experimento seguinte: 25, 75, 125 e 175 g de cebola por litro de solução. A concentração de 175 g foi definida por ser intermediária entre 150 (tratamento que apresentou maior eficiência na extração de minhocas) e 200 g de cebola por litro de solução.

Comparando a solução de formaldeído 0,5% (solução padrão) com as soluções contendo diferentes concentrações de extrato de cebola, observou-se que o extrato de cebola apresenta potencial para ser utilizado na extração de minhocas do solo na concentração de 175 g de cebola por litro de solução (Figura 7.3). Nessa concentração, o extrato de cebola apresentou eficiência semelhante à solução de formaldeído na extração de minhocas adultas e superior na extração de minhocas jovens presentes no solo de textura argilosa (Figura 7.3).

Em relação ao número total e à biomassa fresca de minhocas extraídas do solo pela aplicação das soluções com diferentes concentrações de extrato de cebola, observou-se que à medida em que houve aumento da concentração de extrato de

cebola na solução, ocorreram aumentos no número total de minhocas expulsas do solo e, conseqüentemente, nos valores de biomassa fresca de minhocas (Figura 7.4).

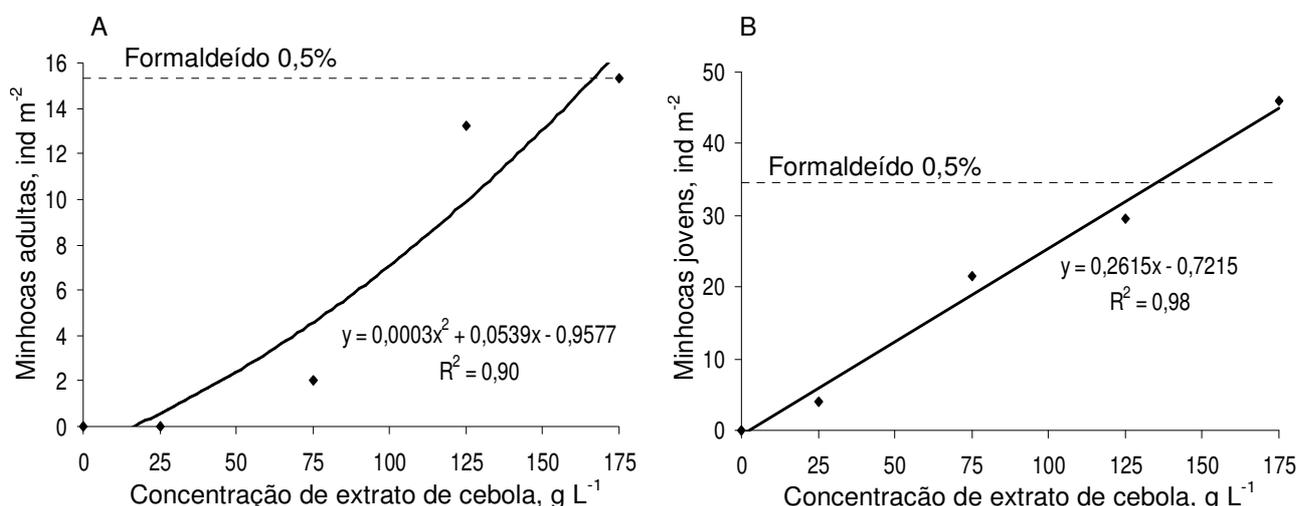


Figura 7.3 – Número de minhocas adultas (A) e jovens (ind. m⁻²) (B) extraídas de solo com textura argilosa pelo uso de formaldeído 0,5% e de soluções contendo extrato de cebola nas concentrações de 25, 75, 125 e 175 g de cebola por litro de solução. Média de seis repetições.

Soluções contendo extrato de cebola em concentrações inferiores a 175 g L⁻¹ não são recomendadas para extração de minhocas do solo, por apresentarem menor capacidade de extração desses organismos, comparadas à solução de formaldeído (Figuras 7.3 e 7.4).

Na literatura disponível, não há relatos sobre o uso de extrato de cebola como uma alternativa ao formaldeído na extração de minhocas do solo. No entanto, outras soluções já foram testadas, como a mostarda (*Brassica alba* L.) em diferentes formas (pó ou líquida) (CHAN; MUNRO, 2001; GUNN, 1992; EAST; KNIGHT, 1998; LAWRENCE; BOWERS, 2002; PELOSI et al., 2009), o ingrediente ativo da mostarda Alil isotiocianato (AITC) (ZABORSKI, 2003; RESSETTI, 2006; ČOJA et al. (2008); RESSETTI et al., 2008; PELOSI et al., 2009) e detergente doméstico (EAST; KNIGHT, 1998). Por causa da alta variabilidade nos resultados e ao baixo número de trabalhos

comparando a eficiência de mostarda e da solução de formaldeído em ambientes diferentes ao redor do mundo, o uso de mostarda e de seus derivados ainda é limitado e pouco aceito.

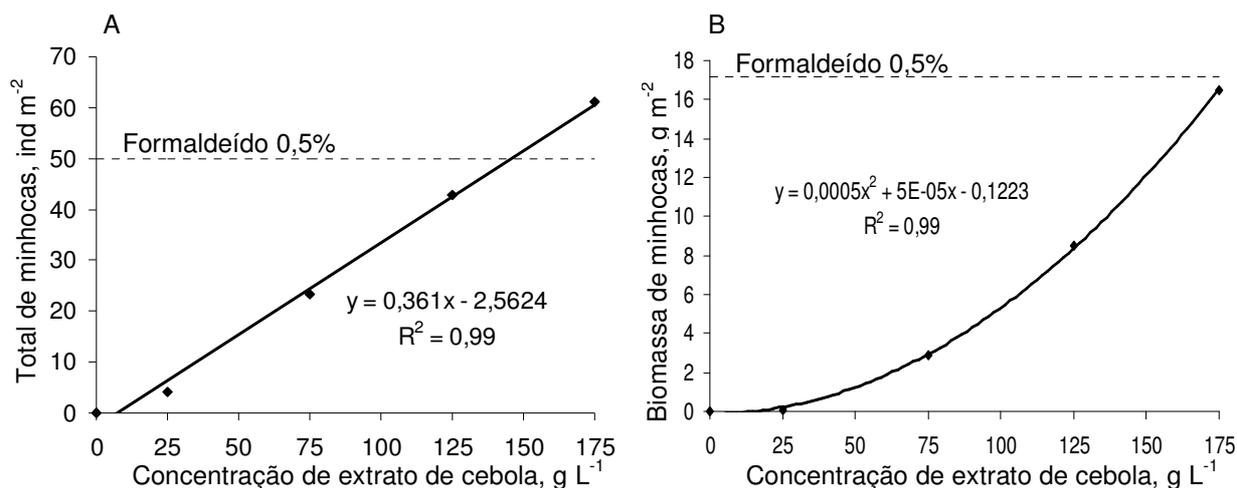


Figura 7.4 – Número total (ind. m⁻²) (A) e biomassa fresca (g m⁻²) de minhocas (B) extraídas de solo com textura argilosa pelo uso de formaldeído 0,5% e de soluções contendo extrato de cebola nas concentrações de 25, 75, 125 e 175 g de cebola por litro de solução. Média de seis repetições.

Utilizando detergente (20 ml L⁻¹) e mostarda (25 ml L⁻¹) para extrair minhocas do solo, East e knight (1998) observaram que a solução de mostarda foi tão eficiente quanto o detergente na extração desses organismos. No entanto, apresenta a desvantagem de ser mais cara e difícil de aplicar.

Ressetti et al. (2008) avaliaram a eficiência do reagente Alil isotiocianato (AITC), fitocomplexo da mostarda sintetizado em laboratório, em relação à solução de formaldeído 2,2 g L⁻¹ na extração de minhocas em diferentes sistemas de uso do solo. Os autores avaliaram a densidade populacional e biomassa de minhocas extraídas em três sistemas: talhão de plantio direto, pastagem perene e mata subtropical no Estado do Paraná. Os resultados variaram com a concentração da solução extratora (AITC nas doses de 50, 100 e 150 mg L⁻¹) e com o sistema avaliado. Embora a solução de formaldeído tenha apresentado maior eficácia na extração de minhocas na pastagem

perene e na mata, os autores consideraram o AITC promissor na determinação de densidade e biomassa de minhocas em áreas agrícolas manejadas em sistema de plantio direto.

Na avaliação do extrato de cebola (175 g L^{-1}) em relação à solução de formaldeído 0,5%, verificou-se que não houve diferença significativa em relação ao número de minhocas adultas extraídas pelas duas soluções em solo arenoso (Figura 7.5).

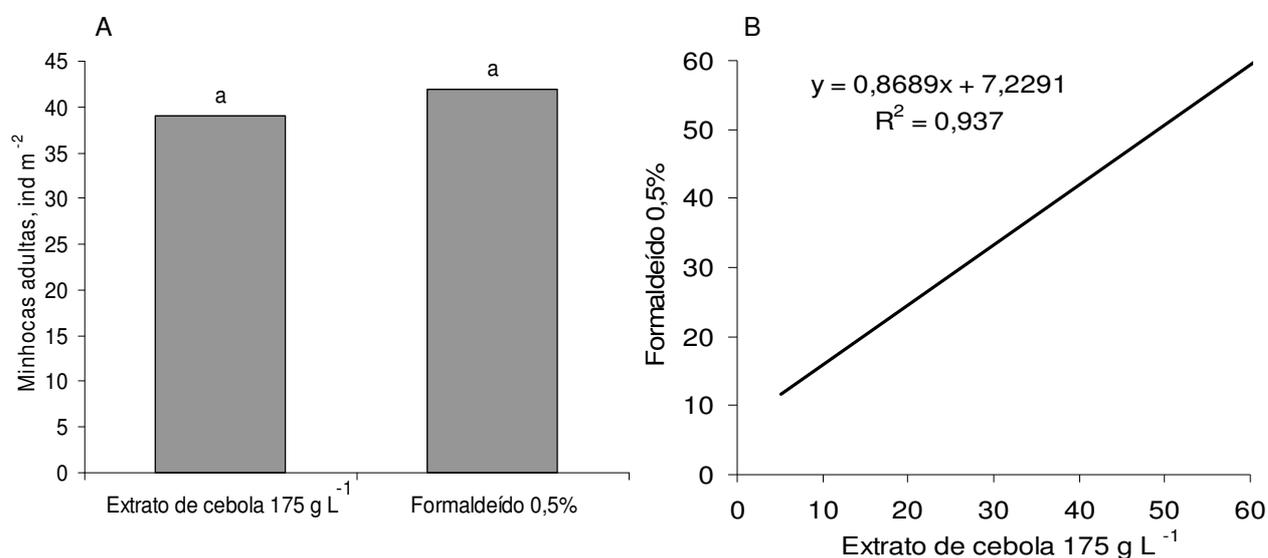


Figura 7.5 – Minhocas adultas (ind. m⁻²) (A) e correlação entre o número de minhocas adultas extraídas de solo arenoso pelo uso de formaldeído 0,5% e solução contendo extrato de cebola na concentração 175 g de cebola por litro de solução (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Média de seis repetições.

Čoja et al. (2008) determinaram o potencial de cinco métodos comuns para a amostragem de minhocas do solo (triagem manual, soluções de formaldeído e AITC, extração por calor no aparelho Kempson e aplicação de corrente elétrica). Os resultados indicaram que a aplicação das soluções de formaldeído e AITC apresentou menor eficiência, embora tenha proporcionado a extração de números elevados de minhocas adultas. O maior número de indivíduos expulsos do solo foi verificado com o

uso do aparelho de Kempson, seguido pelo método de corrente elétrica e pela triagem manual.

Em relação ao número total de minhocas expulsas do solo arenoso, observou-se que a solução de formaldeído 0,5% foi significativamente inferior à solução contendo extrato de cebola (175 g L^{-1}). Foi observada correlação significativa entre o número total de minhocas extraídas pelas duas soluções extratoras, comprovando a eficiência da cebola na extração destes organismos (Figura 7.6).

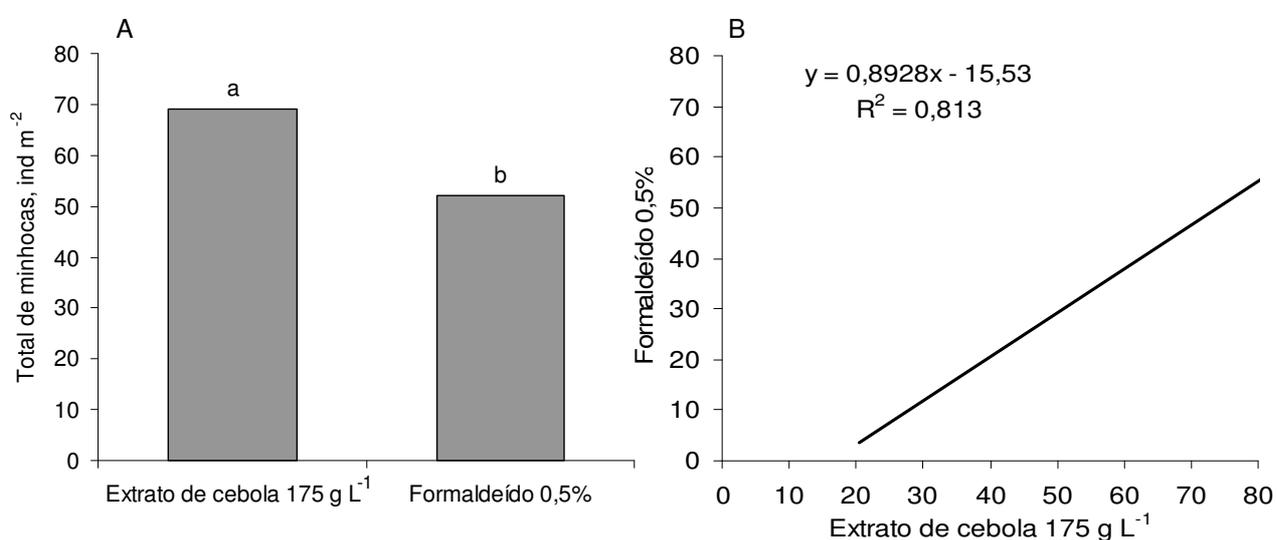


Figura 7.6 – Número total (ind. m⁻²) (A) e correlação entre o número total de minhocas extraídas de solo arenoso pelo uso de formaldeído 0,5% e solução contendo extrato de cebola na concentração 175 g de cebola por litro de solução (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Média de seis repetições.

Analisando-se o tempo necessário para as minhocas emergirem à superfície do solo após a aplicação da solução extratora, observou-se que a expulsão das minhocas ocorre mais rapidamente após a aplicação da solução contendo extrato de cebola, iniciando instantaneamente após a completa infiltração do volume aplicado, enquanto que é necessário esperar, aproximadamente, um minuto após a aplicação de formaldeído, para que as primeiras minhocas comecem a emergir do interior do solo.

Assim como para o número de minhocas adultas, não foi observada diferença significativa entre a biomassa fresca de minhocas (g m^{-2}) coletadas pelas soluções de formaldeído 0,5% e extrato de cebola (175 g L^{-1}), sendo extraídos em torno de 25 g de minhocas m^{-2} de solo. A análise de correlação entre a biomassa fresca de minhocas extraídas pelas duas soluções demonstrou ser significativa (Figura 7.7).

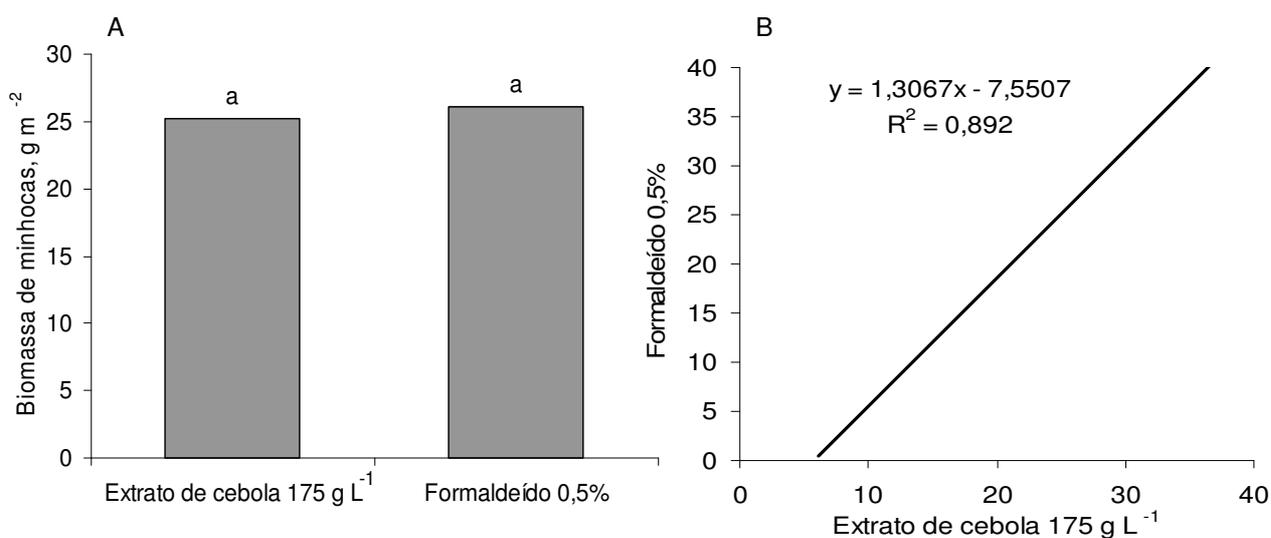


Figura 7.7 – Biomassa fresca de minhocas (g m^{-2}) (A) e correlação entre a biomassa fresca de minhocas extraídas de solo arenoso pelo uso de formaldeído 0,5% e solução contendo extrato de cebola na concentração 175g de cebola por litro de solução (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Média de seis repetições.

Ressetti (2006) avaliou a densidade populacional, biomassa e diversidade de espécies de minhocas em ecossistemas de um ambiente urbano da Universidade Federal do Paraná, visando determinar o impacto do processo de urbanização sobre a população de minhocas. A extração de minhocas foi realizada por método químico, utilizando-se solução de formaldeído a 0,22%. Foi verificada grande variação na densidade populacional de minhocas, sendo encontradas 73, 44, 36, 23 e 17 indivíduos por metro quadrado nos ecossistemas pastagem perene, plantação de manduirana

(*Senna macranthera* Collad.), bosque, gramado e pastagem cultivada, respectivamente. Foram encontradas as espécies exóticas *Metaphire californica* Kinberg (1867), *Amyntas gracilis* Kinberg (1867) e *Pontoscolex corethrurus* Müller (1857).

Em ambas as áreas onde os experimentos foram realizados, foram coletadas apenas espécies exóticas do gênero *Amyntas*, que são comuns e abundantes em ambientes alterados pelo homem. Minhocas desse gênero proporcionam aporte contínuo de material orgânico na superfície do solo em agrossistemas manejados em sistema de plantio direto ou preparo reduzido (BROWN et al., 2006).

No solo de textura argilosa (Latosolo Vermelho) cultivado com milho, a única espécie encontrada foi *A. gracilis* Kinberg, enquanto que no solo de textura arenosa (Argissolo Vermelho-amarelo) sob pomar de citros, além de *A. gracilis* foram coletados indivíduos de *A. corticis* Kinberg. No Sul do Brasil e na maioria das regiões já avaliadas no país, estas espécies encontram-se difundidas em elevadas densidades em solos que sofreram interferência antrópica (BROWN et al., 2006).

Os resultados obtidos nesse estudo indicam que a solução de extrato de cebola pode ser utilizada na extração de minhocas do solo, como alternativa ao formaldeído (0,5%). No entanto, estudos adicionais em outros ecossistemas e países são necessários a fim de confirmar estes resultados. Outra linha de pesquisa poderia estudar os compostos químicos presentes no extrato de cebola, responsáveis pelos efeitos irritantes em minhocas. O isolamento dos compostos sulfurados (1-propenil-L-cisteína sulfóxido) e dos ácidos sulfênicos (ácido 1-propenilsulfênico e ácido pirúvico) poderia resultar, futuramente, na sua produção em escala, possibilitando a substituição do formaldeído por um composto menos tóxico para os seres humanos e para o ambiente.

7.5 Conclusões

A solução contendo extrato de cebola na concentração de 175 g L^{-1} apresenta a mesma capacidade que a solução extratora padrão (formaldeído 0,5%) para extração de minhocas em solos de textura argilosa e arenosa.

O extrato de cebola pode ser uma alternativa atóxica, eficiente e de baixo custo, alternativa à solução de formaldeído, para extração de minhocas do solo.

7.6 Referências bibliográficas

BROWN, G. G. et al. Exotic, peregrine, and invasive earthworms in Brazil: diversity, distribution, and effects on soils and plants. **Caribbean Journal of Science**, Puerto Rico, v. 42, n. 3, p. 339-358, Dec. 2006.

CHAN, K. Y.; MUNRO, K. Evaluating mustard extracts for earthworm sampling. **Pedobiologia**, Berlin, v. 45, n. 3, p. 272-278, 2001.

ČOJA, T. et al. Efficacy and side effects of five sampling methods for soil earthworms (Annelida, Lumbricidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Albany, v. 71, n. 2, p. 552-565, Oct. 2008.

EAST, D.; KNIGHT, D. Sampling soil earthworm populations using household detergent and mustard. **Journal of Biological Education**, Wakefield, v. 32, n. 3, p. 201-206, 1998.

FERREIRA, D. F. **Sistemas de análise estatística para dados balanceados**. Lavras: UFLA/DEX/SISVAR, 2000. 145 p.

GUNN, A. The use of mustard to estimate earthworm populations. **Pedobiologia**, Berlin, v. 36, n. 2, p. 65-67, 1992.

ISO/WD (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION) 23611-1. Soil Quality – sampling of soil invertebrates. Part 1: hand-sorting and formalin extraction of earthworms. Version 12. December, 2002. 18p.

LANZOTTI, V. The analysis of onion and garlic. **Journal of Chromatography A.**, Amsterdam, v. 1112, n. 1-2, p. 3-22, Apr. 2006.

LAWRENCE, A. P.; BOWERS, M. A. A test of the “hot” mustard extraction method of sampling earthworms. **Soil Biology and Biochemistry**, Brisbane, v. 34, n. 4, p. 549-552, Apr. 2002.

MOTTA, V. T.; WAGNER, M. B. **Bioestatística**. Caxias do Sul: Educs, São Paulo: Robe Editorial, 2003. 201p.

MUNIZ, L. B. **Caracterização química, física e de compostos funcionais em cebolas frescas e minimamente processadas**. 2007. 160f. Dissertação de mestrado em Nutrição Humana. Universidade de Brasília, Brasília.

PELOSI, C. et al. Earthworm collection from agricultural fields: Comparisons of selected expellants in presence/absence of hand-sorting. **European Journal of Soil Biology**, Braunschweig, v. 45, n. 2, p. 176-183, Mar./Apr. 2009.

RANDLE W. M; LANCASTER J. E. Sulphur compounds in Alliums in relation to flavour quality. In: RABINOWITCH, H. D.; CURRAH, L. (Eds). **Allium Crop Science: Recent Advances**, 2002. p. 330-350.

RESSETTI, R. R. Densidade populacional, biomassa e espécies de minhocas em ecossistemas de áreas urbanas. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 7, n. 1-2, p. 61-66, 2006.

RESSETTI, R. R.; DIONÍSIO, J. A.; MOTTA, A. C. V. Comparação entre doses de Alil isotiocianato e a solução de formaldeído na extração de minhocas. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 1, p. 25-33, 2008.

SCHUNEMANN, A. P. et al. Pungência e características químicas em bulbos de genótipos de cebola (*Allium cepa* L.) cultivados no Alto Vale do Itajaí, SC, Brasil. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 12, n. 1, p. 77-80, jan./mar. 2006.

TANCK, 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**, Viçosa, v. 24, n. 2, p. 409-415, mar./abr. 2000.

ZABORSKI, E. R. Allyl isothiocyanate: na alternative chemical expellant for sampling earthworms. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 22, p. 87-95, Jan. 2003.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho contribuiu para o conhecimento da diversidade de minhocas em ecossistemas naturais e antropizados do Estado do Rio Grande do Sul (RS) e possibilitou a descoberta de novas espécies de minhocas. Desta forma, seria desejável complementar estes estudos através da inclusão de novos pontos de amostragem e da ampliação do número de ecossistemas e municípios avaliados, visando aumentar o conhecimento da diversidade de oligoquetas no RS.

Poucas espécies de minhocas nativas do Brasil foram estudadas em relação à sua ecologia. Neste sentido, estudos ecológicos das novas espécies, bem como das demais espécies nativas encontradas no Estado, são importantes para revelar sua distribuição e seu comportamento no ambiente, além da relação que apresentam com outras espécies de minhocas e organismos edáficos.

As análises moleculares das minhocas coletadas no Estado representaram avanços na genética molecular de oligoquetas e constatou-se a carência de informações sobre as sequências nucleotídicas destes organismos em bancos de dados públicos. Assim, há necessidade de realização de estudos complementares dos ácidos nucléicos das espécies de minhocas presentes no Estado do RS. Para que as ferramentas moleculares sejam mais utilizadas no processo de identificação de minhocas, é fundamental que haja continuidade nos estudos de sistemática filogenética e que estes sejam realizados com o maior número possível de espécies de minhocas. Além disso, os dados obtidos devem ser disponibilizados em bancos de dados, para que estejam acessíveis aos pesquisadores.

Estudos também poderão ser direcionados à multiplicação e manutenção de espécies nativas em cativeiro, bem como ao entendimento da contribuição destas espécies para a funcionalidade dos ecossistemas.

O estudo sobre a viabilidade de utilização da cebola como solução atóxica e alternativa ao uso do formaldeído na extração de minhocas do solo demonstrou sua capacidade como solução extratora. No entanto, faz-se necessário a aplicação desta metodologia em outros locais. Além disso, outras plantas e extratos poderiam ser

avaliados, visando disponibilizar soluções extratoras de minhocas menos tóxicas do que o formaldeído, reduzindo a contaminação de ecossistemas.

APÊNDICES

(continua)

APÊNDICE A – Tabela contendo informações sobre a localização, o tipo de ecossistema, o valor de pH e as espécies de minhocas encontradas nos pontos amostrados no Estado do Rio Grande do Sul (Capítulos 1 e 2).

| Ponto | Município | Ecossistema | Localização geográfica | pH água (1:1) | Espécies encontradas |
|-------|------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|---------------|--|
| 8 | Rosário do Sul | acácia negra | 30° 05' 50,70" S 54° 37' 53,40" O | 4,8 | <i>Glossoscolex</i> n. sp. 1 |
| 60 | Rosário do Sul | acácia negra | 30° 05' 39,40" S 54° 37' 48,90" O | 4,2 | juvenis de Glossoscolecidae |
| 34 | Santo Cristo | bananeira | 27° 50' 49,26" S 54° 38' 42,86" O | 5,7 | <i>Urobenus brasiliensis</i> |
| 36 | Santo Cristo | banhado | 27° 50' 52,31" S 54° 38' 43,08" O | 4,9 | Criodrilidae n. sp., <i>Eukerria</i> n. sp. 1 |
| 45 | Santo Cristo | beira de córrego | 27° 50' 55,73" S 54° 38' 46,28" O | 5,2 | <i>Pontoscolex corethrurus</i> , <i>Amyntas gracilis</i> |
| 2 | Santa Maria | campo nativo | 29° 45' 49,60" S 53° 03' 02,90" O | 6,1 | <i>Glossoscolex</i> sp. |
| 13 | Santa Maria | campo nativo | 29° 39' 56,42" S 53° 55' 02,79" O | 4,6 | <i>A. gracilis</i> |
| 21 | Caçapava do Sul | campo nativo | 29° 39' 36,90" S 54° 30' 09,50" O | 4,6 | <i>Glossoscolex</i> n. sp. 3 |
| 30 | Nova Esperança do Sul | campo nativo | 29° 22' 34,50" S 54° 46' 04,70" O | 5,8 | Juvenis de Glossoscolecidae |
| 47 | Roque Gonzales | campo nativo | 28° 09' 43,30" S 55° 00' 22,90" O | 5,2 | <i>Amyntas corticis</i> |
| 48 | Roque Gonzales | campo nativo | 28° 09' 43,30" S 55° 00' 25,20" O | 5,9 | <i>A. gracilis</i> |
| 53 | Uruguaiana | campo nativo | 29° 49' 15,80" S 57° 04' 56,70" O | 4,8 | <i>Glossoscolex</i> n. sp. 2 |
| 12 | Santana do Livramento | campo nativo | 30° 47' 23,72" S 55° 22' 08,77" O | 5,1 | <i>Glossoscolex</i> n. sp. 6 |
| 75 | Caçapava do Sul | campo nativo | 29° 39' 36,90" S 54° 30' 09,50" O | 5,1 | <i>U. brasiliensis</i> |
| 57 | Alegrete | campo nativo | 29° 47' 12,80" S 55° 43' 43,20" O | 4,6 | <i>P. corethrurus</i> |
| 67 | Santiago | campo nativo | 29° 15' 55,00" S 54° 49' 26,00" O | 4,6 | <i>A. gracilis</i> |
| 74 | São Francisco de Assis | campo nativo | 29° 33' 25,40" S 55° 08' 56,97" O | 4,7 | <i>P. corethrurus</i> |
| 49 | Roque Gonzales | deposição resíduos ¹ | 28° 08' 05,20" S 55° 01' 34,60" O | 7 | <i>A. gracilis</i> |
| 42 | Santo Cristo | esterqueira bovina ² | 27° 50' 52,92" S 54° 38' 49,96" O | 6,1 | <i>A. gracilis</i> |
| 3 | Dilermando de Aguiar | eucalipto | 29° 46' 23,10" S 54° 05' 43,10" O | 5,8 | <i>U. brasiliensis</i> |
| 4 | Dilermando de Aguiar | eucalipto | 29° 54' 56,50" S 54° 19' 48,70" O | 4,9 | Juvenis de Glossoscolecidae |
| 11 | Vila Nova do Sul | eucalipto | 30° 20' 23,80" S 53° 51' 58,40" O | 4,9 | Juvenis de Glossoscolecidae |

(continuação)

APÊNDICE A – Tabela contendo informações sobre a localização, o tipo de ecossistema, o valor de pH e as espécies de minhocas encontradas nos pontos amostrados no Estado do Rio Grande do Sul (Capítulos 1 e 2).

| Ponto | Município | Ecossistema | Localização geográfica | pH água (1:1) | Espécies encontradas |
|-------|--------------------|-------------------|-----------------------------------|---------------|---|
| 20 | Caçapava do Sul | eucalipto | 30° 54' 37,96" S 53° 25' 22,78" O | 4,2 | <i>A. gracilis</i> , <i>U. brasiliensis</i> |
| 24 | São Vicente do Sul | eucalipto | 29° 39' 09,30" S 54° 40' 36,70" O | 5,9 | <i>A. gracilis</i> |
| 25 | Jaguari | eucalipto | 29° 30' 44,40" S 54° 40' 34,50" O | 5,2 | <i>P. corethrurus</i> |
| 56 | São Sepé | eucalipto | 29° 49' 52,10" S 53° 45' 45,20" O | 4,6 | <i>A. gracilis</i> |
| 58 | Alegrete | eucalipto | 29° 52' 20,20" S 55° 35' 02,00" O | 6,2 | <i>A. gracilis</i> |
| 62 | São Vicente do Sul | eucalipto | 29° 38' 58,90" S 54° 32' 34,70" O | 4,5 | <i>Glossoscolex</i> n. sp. 1 |
| 73 | Itaqui | eucalipto | 28° 55' 12,20" S 56° 06' 41,00" O | 4,3 | <i>Microscolex dubius</i> |
| 5 | Rosário do Sul | frag. mata nativa | 30° 02' 07,70" S 54° 34' 51,80" O | 5,9 | <i>Glossoscolex</i> n. sp. 1 |
| 6 | Rosário do Sul | frag. mata nativa | 30° 02' 07,70" S 54° 34' 51,80" O | 5,4 | <i>Glossoscolex</i> n. sp. 1 |
| 7 | Rosário do Sul | frag. mata nativa | 30° 02' 07,70" S 54° 34' 51,80" O | 4,8 | <i>Glossoscolex</i> sp. |
| 14 | Santa Maria | frag. mata nativa | 29° 39' 54,50" S 53° 54' 56,41" O | 4,4 | <i>P. corethrurus</i> |
| 15 | Santa Maria | frag. mata nativa | 29° 39' 53,38" S 53° 54' 55,35" O | 4,3 | <i>A. gracilis</i> , <i>Metaphire californica</i> |
| 16 | Santa Maria | frag. mata nativa | 29° 39' 53,43" S 53° 54' 55,28" O | 4,3 | <i>A. gracilis</i> , <i>M. californica</i> |
| 17 | Santa Maria | frag. mata nativa | 29° 39' 43,58" S 53° 54' 51,09" O | 4,9 | <i>P. corethrurus</i> |
| 18 | Santa Maria | frag. mata nativa | 29° 39' 44,89" S 53° 54' 50,36" O | 4,9 | <i>Glossoscolex</i> n. sp. 5 |
| 32 | Santo Cristo | frag. mata nativa | 27° 50' 49,77" S 54° 38' 42,04" O | 5,5 | <i>U. brasiliensis</i> , <i>A. corticis</i> |
| 33 | Santo Cristo | frag. mata nativa | 27° 50' 51,57" S 54° 38' 41,07" O | 5,7 | <i>U. brasiliensis</i> , <i>A. corticis</i> |
| 54 | Caçapava do Sul | frag. mata nativa | 30° 31' 33,80" S 53° 26' 57,00" O | 6,1 | <i>Glossoscolex</i> sp. |
| 59 | Santa Maria | frag. mata nativa | 29° 59' 15,40" S 54° 28' 18,40" O | 4,7 | <i>P. corethrurus</i> |
| 61 | Rosário do Sul | frag. mata nativa | 30° 14' 30,40" S 54° 54' 12,50" O | 4 | <i>Eukerria saltensis</i> |
| 64 | Santiago | frag. mata nativa | 29° 15' 47,10" S 54° 49' 50,00" O | 5,4 | <i>A. gracilis</i> |
| 65 | Jaguari | frag. mata nativa | 29° 21' 05,20" S 54° 45' 20,60" O | 5,4 | juvenis de <i>Glossoscolecidae</i> |

(continuação)

APÊNDICE A – Tabela contendo informações sobre a localização, o tipo de ecossistema, o valor de pH e as espécies de minhocas encontradas nos pontos amostrados no Estado do Rio Grande do Sul (Capítulos 1 e 2).

| Ponto | Município | Ecossistema | Localização geográfica | pH água (1:1) | Espécies encontradas |
|-------|--------------------|------------------------------|-----------------------------------|---------------|---|
| 71 | Maçambará | frag. mata nativa | 28° 41' 31,00" S 55° 54' 09,30" O | 5,3 | <i>Fimoscolex</i> n. sp. 1, juvenil de Glossoscolecidae |
| 77 | Itaara | frag. mata nativa | 29° 38' 51,60" S 53° 44' 44,55" O | 5,1 | <i>U. brasiliensis</i> |
| 51 | Santa Maria | gramado residencial | 29° 41' 53,19" S 53° 45' 20,57" O | 5,4 | <i>Glossoscolex</i> n. sp. 2 |
| 19 | Tupanciretã | lavoura de aveia | 29° 55' 30,42" S 53° 49' 59,25" O | 5,5 | <i>P. corethrurus</i> , <i>Glossoscolex</i> sp. |
| 27 | Jaguari | lavoura de milho | 29° 28' 22,50" S 54° 41' 39,60" O | 4,9 | <i>P. corethrurus</i> |
| 31 | Santo Cristo | lavoura de milho | 27° 50' 48,01" S 54° 38' 42,98" O | 5,9 | <i>A. gracilis</i> |
| 38 | Santo Cristo | lavoura de milho | 27° 50' 48,81" S 54° 38' 44,93" O | 5,7 | <i>A. gracilis</i> |
| 39 | Santo Cristo | lavoura de milho | 27° 50' 49,55" S 54° 38' 46,86" O | 5,6 | <i>A. gracilis</i> |
| 70 | Júlio de Castilhos | lavoura de soja | 29° 03' 15,80" S 53° 35' 03,10" O | 4,9 | <i>P. corethrurus</i> , <i>A. gracilis</i> |
| 9 | São Gabriel | lavoura de trigo | 30° 22' 11,60" S 54° 11' 17,60" O | 6 | <i>E. saltensis</i> |
| 46 | Santa Rosa | lavoura soja | 27° 54' 37,10" S 54° 32' 49,30" O | 5,5 | <i>A. gracilis</i> |
| 1 | Santa Maria | mata ciliar | 29° 42' 46,50" S 53° 56' 06,50" O | 6 | <i>U. brasiliensis</i> |
| 23 | São Vicente do Sul | mata ciliar | 29° 39' 09,30" S 54° 40' 36,70" O | 6,5 | <i>A. gracilis</i> |
| 28 | Jaguari | mata ciliar | 29° 22' 44,70" S 54° 44' 49,40" O | 5,3 | <i>Glossoscolex uruguayensis uruguayensis</i> |
| 29 | Jaguari | mata ciliar | 29° 22' 44,70" S 54° 44' 47,60" O | 6,5 | <i>G. uruguayensis uruguayensis</i> , <i>A. gracilis</i> |
| 55 | Caçapava do Sul | mata ciliar | 30° 23' 02,90" S 53° 30' 37,30" O | 6 | <i>P. corethrurus</i> |
| 66 | Jaguari | mata ciliar | 29° 17' 30,80" S 54° 51' 23,90" O | 6,5 | <i>M. californica</i> |
| 68 | Santa Maria | mata ciliar | 29° 42' 26,60" S 53° 46' 11,40" O | 7 | <i>U. brasiliensis</i> |
| 72 | Barra do Quaraí | Parque Estadual do Espinilho | 30° 11' 03,80" S 57° 29' 43,60" O | 7 | <i>U. brasiliensis</i> , <i>M. dubius</i> , <i>E. saltensis</i> |
| 37 | Santo Cristo | pastagem cultivada | 27° 50' 50,51" S 54° 38' 43,95" O | 5,5 | <i>A. gracilis</i> |

(conclusão)

APÊNDICE A – Tabela contendo informações sobre a localização, o tipo de ecossistema, o valor de pH e as espécies de minhocas encontradas nos pontos amostrados no Estado do Rio Grande do Sul (Capítulos 1 e 2).

| Ponto | Município | Ecossistema | Localização geográfica | pH água (1:1) | Espécies encontradas |
|-------|-----------------|--------------------|-----------------------------------|---------------|---|
| 40 | Santo Cristo | pastagem cultivada | 27° 50' 51,32" S 54° 38' 46,00" O | 5,5 | <i>A. gracilis</i> |
| 41 | Santo Cristo | pastagem cultivada | 27° 50' 54,87" S 54° 38' 44,22" O | 5,1 | <i>A. gracilis</i> |
| 44 | Santa Maria | pastagem cultivada | 29° 43' 05,32" S 53° 42' 25,19" O | 4,9 | <i>Glossoscolex</i> n. sp. 2, <i>Glossoscolex</i> n. sp. 4, <i>Ocnerodrilus</i> sp., <i>Eukerria</i> n. sp. 1 |
| 50 | Formigueiro | pastagem cultivada | 29° 56' 45,00" S 53° 37' 30,00" O | 5,6 | <i>A. corticis</i> |
| 63 | Santiago | pastagem cultivada | 29° 15' 10,40" S 54° 51' 54,04" O | 4 | <i>A. corticis</i> |
| 76 | Itaara | pastagem cultivada | 29° 38' 55,50" S 53° 44' 41,38" O | 5,5 | <i>Glossoscolex</i> n. sp. 2, <i>Glossoscolex</i> sp. |
| 10 | São Gabriel | pinus | 30° 21' 09,40" S 54° 08' 38,30" O | 5,7 | <i>Aporrectodea trapezoides</i> |
| 26 | Jaguari | pinus | 29° 28' 22,50" S 54° 41' 38,40" O | 4,4 | <i>A. gracilis</i> , <i>P. corethrurus</i> |
| 52 | Caçapava do Sul | pinus | 30° 54' 35,44" S 53° 25' 13,46" O | 6,8 | <i>Glossoscolex</i> sp., <i>Amyntas rodericensis</i> |
| 43 | Santa Maria | pomar de citros | 29° 43' 06,14" S 53° 42' 30,36" O | 5,2 | <i>A. gracilis</i> |
| 22 | Mata | várzea em pousio | 29° 39' 50,08" S 54° 29' 37,05" O | 4,9 | <i>Kerriona</i> n. sp. 1 |
| 35 | Santo Cristo | várzea em pousio | 27° 50' 54,23" S 54° 38' 42,42" O | 4,9 | <i>Eukerria</i> n. sp. 1 |

¹ local de deposição de resíduos orgânicos domiciliares.

² local de deposição de esterco sólido de bovinos.

(continua)

APÊNDICE B – Tabela contendo informações sobre os percentuais de matéria orgânica (MO) e argila, textura, teores de fósforo (Mehlich), potássio, cálcio e magnésio, soma de bases, CTC_{efetiva} e CTC_{pH7,0} dos pontos amostrados no Estado do Rio Grande do Sul (Capítulos 1 e 2).

| Ponto | MO (%) | Argila | Textura | Fósforo (mg dm ⁻³) | Potássio | Cálcio (cmolc dm ⁻³) | Magnésio | SB (%) | CTC _{efetiva} | CTC _{pH7,0} |
|-------|-----------|--------|---------|-----------------------------------|----------|-------------------------------------|----------|-----------|------------------------|----------------------|
| 8 | 1,5 | 14 | 4 | 6 | 80 | 0,9 | 0,4 | 28 | | |
| 60 | 1,8 | 17 | 4 | 7,6 | 60 | 4,6 | 1,2 | 49,1 | 7,3 | 12,1 |
| 34 | 2,1 | 36 | 3 | 4,5 | 276 | 20 | 3,9 | 88 | 24,6 | 28,1 |
| 36 | 2 | 38 | 3 | 5,3 | 124 | 16,2 | 3,7 | 75 | 21,2 | 27,1 |
| 45 | 1,9 | 12 | 4 | 76 | 112 | 4,5 | 0,7 | 66 | 5,6 | 8,3 |
| 2 | 2,1 | 15 | 4 | 26,9 | 88 | 2 | 1 | 67 | 3,2 | 4,8 |
| 13 | 1,6 | 17 | 4 | 4,5 | 88 | 0,9 | 0,4 | 26 | 3,1 | 5,9 |
| 21 | 2,2 | 9 | 4 | 6 | 108 | 2,5 | 0,3 | 50 | 3,7 | 6,2 |
| 30 | 1,2 | 9 | 4 | 6 | 48 | 1,6 | 0,2 | 47 | 1,9 | 4,1 |
| 47 | 2,8 | 26 | 3 | 2,2 | 28 | 11,8 | 2,8 | 75 | 14,9 | 19,6 |
| 48 | 2,8 | 25 | 3 | 3,7 | 32 | 11,3 | 3,1 | 82 | 14,5 | 17,6 |
| 53 | 1,1 | 30 | 3 | 3 | 32 | 7,3 | 2 | 49,1 | 12,2 | 19,1 |
| 12 | 0,8 | 8 | 4 | 3 | 68 | 0,7 | 0,5 | 38,2 | 1,6 | 3,6 |
| 75 | 3,7 | 22 | 3 | 16,2 | 64 | 9,6 | 2,8 | 66,9 | 12,8 | 18,7 |
| 57 | 2,1 | 13 | 4 | 40,7 | 48 | 4,5 | 1,1 | 51 | 6,2 | 11,2 |
| 67 | 7,1 | 27 | 3 | 9,3 | 228 | 7,4 | 1,6 | 41 | 11,9 | 23,3 |
| 74 | 2,4 | 16 | 4 | 5,3 | 60 | 0,3 | 0,1 | 53 | 4,2 | 10,8 |
| 49 | 10,7 | 25 | 3 | 76 | 400 | 22,1 | 4,4 | 96 | 27,5 | 28,6 |
| 42 | 3,1 | 72 | 1 | 53,1 | 800 | 6,5 | 3,9 | 84 | 12,4 | 14,9 |
| 3 | 2,2 | 9 | 4 | 8,4 | 44 | 2,5 | 0,3 | 51 | 2,9 | 5,7 |
| 4 | 0,7 | 8 | 4 | 6 | 44 | 0,6 | 0,2 | 30 | 1,4 | 3,1 |

(continuação)

APÊNDICE B – Tabela contendo informações sobre os percentuais de matéria orgânica (MO) e argila, textura, teores de fósforo (Mehlich), potássio, cálcio e magnésio, soma de bases, CTC_{efetiva} e CTC_{pH7,0} dos pontos amostrados no Estado do Rio Grande do Sul (Capítulos 1 e 2).

| Ponto | MO (%) | Argila (%) | Textura | Fósforo (mg dm ⁻³) | Potássio (mg dm ⁻³) | Cálcio (cmolc dm ⁻³) | Magnésio (cmolc dm ⁻³) | SB (%) | CTC _{efetiva} | CTC _{pH7,0} |
|-------|-----------|---------------|---------|-----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|-----------|------------------------|----------------------|
| 11 | 2,2 | 19 | 4 | 5,3 | 124 | 1,3 | 0,8 | 26 | 5,3 | 9,3 |
| 20 | 3,6 | 15 | 4 | 9,3 | 64 | 3,9 | 0,5 | 34 | 6,3 | 13,3 |
| 24 | 1,7 | 15 | 4 | 76 | 72 | 21,2 | 0,9 | 93 | 22,3 | 24 |
| 25 | 1,2 | 6 | 4 | 3,7 | 44 | 1,4 | 0,3 | 42 | 2,1 | 4,3 |
| 56 | 5,2 | 21 | 3 | 18,9 | 172 | 4 | 2,2 | 54,3 | 7,5 | 12,1 |
| 58 | 6,9 | 20 | 3 | 32,3 | 164 | 19,7 | 3,1 | 91,2 | 23,3 | 25,5 |
| 62 | 3,3 | 13 | 4 | 33,4 | 104 | 5,3 | 1,1 | 49,2 | 7,1 | 13,6 |
| 73 | 4,2 | 19 | 4 | 3,7 | 24 | 2,1 | 0,8 | 28,4 | 8,8 | 10,4 |
| 5 | 1,2 | 19 | 4 | 35,8 | 328 | 2,5 | 0,9 | 63 | 4,2 | 6,7 |
| 6 | 5,5 | 18 | 4 | 76 | 268 | 6,2 | 1,7 | 64 | 8,7 | 13,5 |
| 7 | 1,7 | 20 | 3 | 5,3 | 56 | 1,6 | 0,4 | 26 | 3,3 | 8,3 |
| 14 | 3,3 | 27 | 3 | 6 | 104 | 2,4 | 0,8 | 28 | 6,9 | 12,2 |
| 15 | 1,8 | 16 | 4 | 3,7 | 98 | 1,1 | 0,4 | 12 | 3,7 | 14 |
| 16 | 1,8 | 16 | 4 | 3,7 | 98 | 1,1 | 0,4 | 12 | 3,7 | 14 |
| 17 | 2,8 | 14 | 4 | 5,3 | 60 | 2,3 | 0,7 | 36 | 3,8 | 8,7 |
| 18 | 2,8 | 14 | 4 | 5,3 | 60 | 2,3 | 0,7 | 36 | 3,8 | 8,7 |
| 32 | 7,5 | 16 | 4 | 6,8 | 224 | 18,7 | 5,3 | 86 | 24,6 | 28,5 |
| 33 | 3 | 34 | 3 | 3 | 344 | 15,9 | 3,4 | 89 | 20,2 | 22,7 |
| 54 | 4,9 | 18 | 4 | 9,3 | 120 | 3,2 | 0,8 | 63,2 | 4,2 | 6,7 |
| 59 | 2,5 | 13 | 4 | 15,3 | 68 | 4 | 0,8 | 56,7 | 5,4 | 8,9 |
| 61 | 3,4 | 53 | 2 | 16,2 | 64 | 13,6 | 5,1 | 40,8 | 26,8 | 46,3 |

(continuação)

APÊNDICE B – Tabela contendo informações sobre os percentuais de matéria orgânica (MO) e argila, textura, teores de fósforo (Mehlich), potássio, cálcio e magnésio, soma de bases, CTC_{efetiva} e CTC_{pH7,0} dos pontos amostrados no Estado do Rio Grande do Sul (Capítulos 1 e 2).

| Ponto | MO (%) | Argila | Textura | Fósforo (mg dm ⁻³) | Potássio | Cálcio (cmolc dm ⁻³) | Magnésio | SB (%) | CTC _{efetiva} | CTC _{pH7,0} |
|-------|-----------|--------|---------|-----------------------------------|----------|-------------------------------------|----------|-----------|------------------------|----------------------|
| 64 | 4,2 | 18 | 4 | 12,6 | 376 | 17,3 | 3,4 | 86 | 21,8 | 25,2 |
| 65 | 3,7 | 35 | 3 | 2,2 | 184 | 9,5 | 1,9 | 77,3 | 12 | 15,4 |
| 71 | 2,8 | 43 | 4 | 8,6 | 68 | 7,3 | 2,1 | 57,7 | 8 | 13,8 |
| 77 | 2,9 | 31 | 4 | 17,4 | 96 | 13,6 | 3,2 | 85,4 | 4,9 | 11,3 |
| 51 | 1,3 | 14 | 4 | 62,8 | 96 | 3,3 | 0,9 | 66,6 | 4,6 | 6,7 |
| 19 | 1 | 21 | 3 | 18,9 | 144 | 2,3 | 0,8 | 58 | 3,5 | 6 |
| 27 | 1,6 | 25 | 3 | 7,6 | 32 | 3,1 | 1 | 43 | 5,7 | 9,7 |
| 31 | 2,3 | 48 | 2 | 15,3 | 280 | 20,9 | 3,9 | 90 | 25,5 | 28,3 |
| 38 | 2,1 | 36 | 3 | 4,5 | 276 | 20 | 3,9 | 88 | 24,6 | 28,1 |
| 39 | 2,0 | 38 | 3 | 4,5 | 276 | 22 | 3,7 | 85 | 24,6 | 28,1 |
| 70 | 2,7 | 18 | 3 | 17,5 | 158 | 5,3 | 2,4 | 55,2 | 3,2 | 8 |
| 9 | 2,1 | 30 | 3 | 57,8 | 212 | 5,4 | 2,6 | 80 | 8,5 | 10,7 |
| 46 | 1,7 | 85 | 1 | 4,5 | 168 | 3,6 | 1,3 | 64 | 5,3 | 8,4 |
| 1 | 3,9 | 14 | 4 | 37 | 220 | 5,7 | 1,9 | 80 | 8,2 | 10,2 |
| 23 | 3,6 | 9 | 4 | 76 | 168 | 13,8 | 1,1 | 94 | 15,3 | 16,4 |
| 28 | 1,6 | 14 | 4 | 6 | 120 | 4,7 | 1,2 | 71 | 6,3 | 8,7 |
| 29 | 4,4 | 9 | 4 | 18,9 | 224 | 12,5 | 0,6 | 92 | 13,7 | 14,8 |
| 55 | 2,7 | 10 | 4 | 23,8 | 60 | 8,6 | 2,1 | 86,6 | 10,9 | 12,6 |
| 66 | 3,9 | 21 | 3 | 12,6 | 172 | 21,5 | 2,1 | 92,3 | 24,1 | 26,1 |
| 68 | 3,8 | 15 | 4 | 44 | 194 | 6,1 | 1,7 | 76 | 9,6 | 10,8 |
| 72 | 1,1 | 19 | 2 | 1,5 | 28 | 7,1 | 1,7 | 84,7 | 9,6 | 16,4 |

(conclusão)

APÊNDICE B – Tabela contendo informações sobre os percentuais de matéria orgânica (MO) e argila, textura, teores de fósforo (Mehlich), potássio, cálcio e magnésio, soma de bases, CTC_{efetiva} e CTC_{pH7,0} dos pontos amostrados no Estado do Rio Grande do Sul (Capítulos 1 e 2).

| Ponto | MO (%) | Argila | Textura | Fósforo (mg dm ⁻³) | Potássio | Cálcio (cmolc dm ⁻³) | Magnésio | SB (%) | CTC _{efetiva} | CTC _{pH7,0} |
|-------|-----------|--------|---------|-----------------------------------|----------|-------------------------------------|----------|-----------|------------------------|----------------------|
| 37 | 3 | 39 | 3 | 4,5 | 264 | 16,6 | 3,4 | 85 | 20,7 | 24,2 |
| 40 | 3 | 39 | 3 | 4,5 | 264 | 16,6 | 3,4 | 85 | 20,7 | 24,2 |
| 41 | 2,9 | 26 | 3 | 0,7 | 32 | 6,7 | 3,9 | 66 | 11,6 | 16,2 |
| 44 | 2,8 | 18 | 4 | 8,4 | 60 | 5,2 | 2,2 | 55,2 | 8 | 13,8 |
| 50 | 4,9 | 12 | 4 | 76 | 200 | 7,1 | 1,5 | 70 | 9,1 | 13 |
| 63 | 3,1 | 31 | 3 | 4,5 | 48 | 0,7 | 0,5 | 5,4 | 6 | 23,1 |
| 76 | 4,7 | 17 | 4 | 9,8 | 126 | 3,3 | 0,9 | 66,3 | 4,1 | 7,6 |
| 10 | 2,8 | 13 | 4 | 46 | 108 | 2,9 | 0,9 | 59 | 4,1 | 6,9 |
| 26 | 1,9 | 24 | 3 | 2,2 | 16 | 1,4 | 0,1 | 15 | 5,5 | 10,2 |
| 52 | 0,3 | 27 | 3 | 142,3 | 28 | 3,3 | 0,4 | 86 | 3,8 | 4,4 |
| 43 | 1,2 | 13 | 4 | 76 | 96 | 3,1 | 0,7 | 48,1 | 4,1 | 8,4 |
| 22 | 19 | 32 | 3 | 7,6 | 82 | 7,5 | 2,3 | 56 | 15,3 | 11 |
| 35 | 2,3 | 51 | 2 | 1,5 | 76 | 15 | 3,5 | 68 | 19,6 | 27,4 |

APÊNDICE C – Sequências de nucleotídeos da região do gene mtDNA da subunidade I da citocromo c oxidase (COI) de novas espécies de minhocas coletadas no Estado do Rio Grande do Sul (Capítulo 3).

Fimoscolex n. sp. 1

gtgtgagccggaataactgggtgcaggaataaaactcttgattcgtattgaactaaggcagccagggcattcttaggcagtgatcaactattataacaca
gtggttactgcatgcttcttaataatctttcttagtaatgccagatttattggcggatttgtaactgactcctccactatactggagccccggacata
gcaitcccacgactaaataacttaagattttgattgctcccgccatccttaatttattagtgctcctcagctgcagtagaaaaggggtgcaggaactggatgaa
ctgtatattcctccctatcaagtaacctgctatgctgggccccctcgtaaatctagcaatcttccctccatttagcgggtgctcctctattttaggggcatt
aactttattacaactgtaatacaacatagctgaaaaggtctcaactagagcgcatcccacttttctgctgagcagtagtaattactgtggtactactactct
atcactcccgttcta

Glossoscolex n. sp. 1

aacctatatttactcctgggggttgagcaggaataattgggtcgggtataagactactaattcgtgtagaattaagacaacctggagcctttctggaaga
gatcagctttataatacagctgttacagctcacgcttcttaataatcttcttagtaatgccagctttattgggggcttcggaactgacttctactcttata
taggcgccccagacatagcattcccctgactcaataaattagggtttggctttaccacctcattaatcctcctagtttcatcagcagctgtgaaaaaggc
gccggtacaggtgaactgtttaccctccgctagctagaaaattagcgcagcggccctctgtagatctcgcaattttctactccacttagctggggcct
catctattttagggctattaactttattaccactgtaataataacgatgaaaggggctcaactggaacgaatccacttttggggcagtagtaattac
agttgtttacttcttcttccctccagctactagcaggcgtattaccatactcctaacagaccgaaatfaaacctcgttcttgatcccgcgtggggggg
gaccaatcctatacaacatctttc

Glossoscolex n. sp. 2

tagcatgtgtattttatcttaggatttgagcaggtatagtaggagctggaataagtctattaatccgaattgaactaagtcaaccaggggccttttaggca
gagaccagctttacaatacaattgtaactgctcatgattgtaataattttcttttagtaataccaattttattggggggttgtaactgattattaccactaat
ataggagcactgatatagcatttctcagactaaataacctaagatttgatttggccccatcttaattttattggtaictcggcagctgtgaaaaagggg
cagggacaggtgaaactgtttaccctcccttagctagaaaactagcacatgccccctcagtaaatctagcaattttctctcatttagcaggagctcat
caattttaggtcaattaattttatcacaactgtaattaataacggtgacaaggattacgattagaacgaatacctcgtttgtatgagcagtagtaattaccg
tgtactattactttgtctctccagtttagcaggagctattacaagtactaacagatcgtaacttaataactcgttttgcacctgctgggggtggaga

Glossoscolex n. sp. 6

aactctatatttatttaggcgatgagccggaataattggggcgggataagattattaatcgaattgaattaagacagccaggagcatttttaggaag
agatcaactatataactggtgaaactgctcatgatttcttaataatttcttcttagtaataaccagttttatcggcggtttggaaattgacttctaccataaac
ttggagcactgatatagccttccagactaaataacctgagcttttgattactacctcctcttaattctgctagatcctcagcaactgtagaaaagggg
gcaggaactggatgaacagtttaccaccttagcaagaaacctgacatgctggaccgctgttgattagcaattttctccctcacttagcaggagcc
tcatctattttaggagctattaactttattacaactgtaattaataacgatgaaaaggtctacaactagagcgaattcctctatttctgctgagctgtagtaattac
tgtattttacttctattgctactaccagctctgagcaggaatcactataactaataacagatcgaaatcttaatacatcatttttgatcctgcccggcgagg

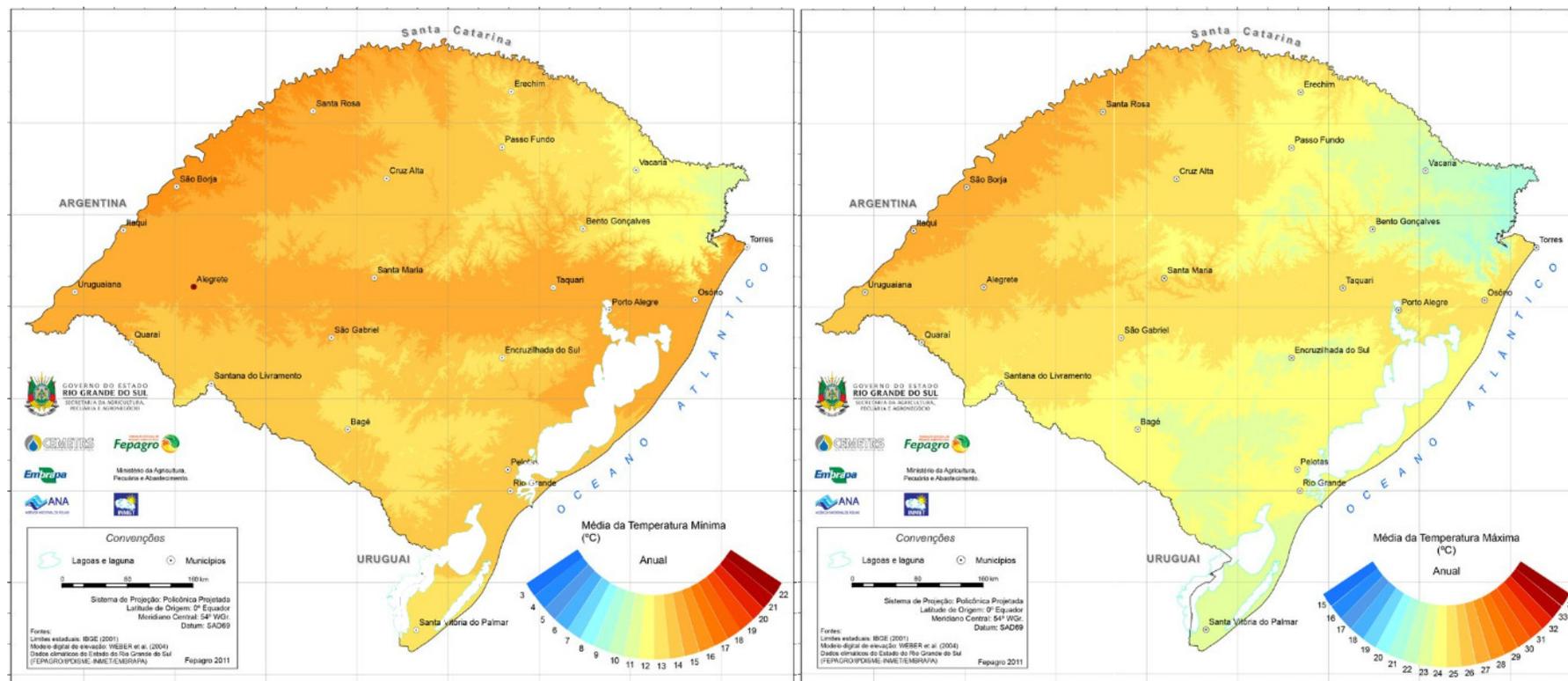
Eukerria n. sp. 1

aacctatatttatttaggagatgagctggaataattggggcgggataagtttattaatcgaattgaattaagacaaccggggcattcttaggaag
tgaccaactatataatacaattgttacagcacatgcttcttataatcttttttagttataaccagttttattgggtgcttcggaactgacttttaccttaatgc
ttggggcaccagatagcattcccggactcaacaacataagattctggcttctcccaccgctactaattctactagtgcttcagcggcagtagaaaag
ggagctggaaccggatgaactgtttaccctccccttgaagtaataatagcacacgcccggccgctcagtagacctagcaatctttccttacacctagctgg
tgcacatcaattttagggcgatcaatttactactacagtaattaataacgatgaaaagggcctacgattagaacgaatccccctatttggatgagccgta
gtaatacactgtagtcttcttctttatcacttctgtagctggagcaattactatacttttaacagaccgaaatctaaacacctcatttctgacctgcccgt
ggtggagatccagattataccaacatctgtc

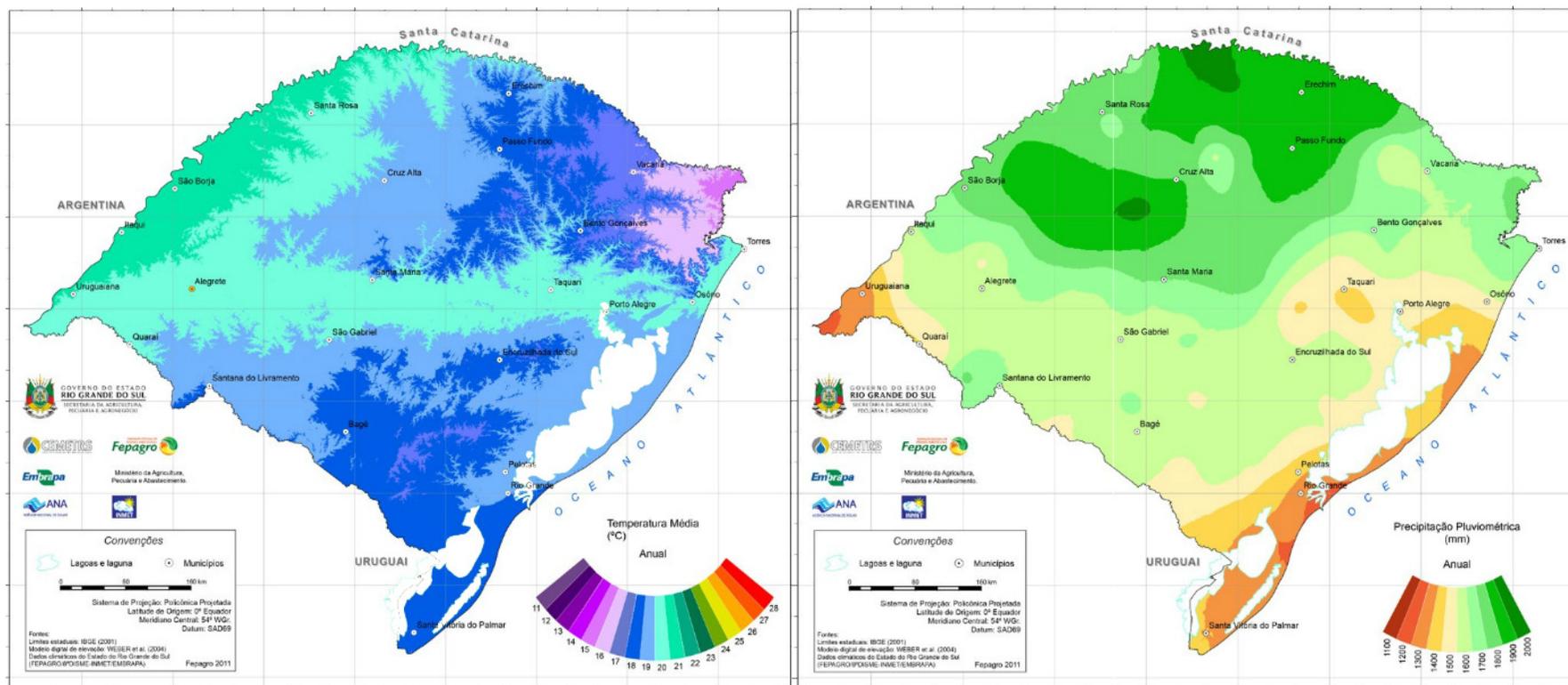
Criodrilidae n. sp. 1

ttgtcgggtggccgggaatagttggtgctgaataatactcctgggtgcttttaggcggaggccaagcatataaacactatttactagagcacgtcctcat
cataattatttctgtcatgctgtaatactggtggctttgggaaacggctactcccgtataattgggtccgatataacattccggcttaataaccta
cattttgacttctaccaccataactaatttacttctcatcaacagcggcataaaaaggagctgaaacaggtgaaactgataaccggcattaaccaga
aacctagcccagctggggcgtcagctgacttagctattttctctctactctgctggggtatctcaattttagggtgctattaacttcatcacgactgtaatta
catacagctgtaattaacatacaatgaagagcctacgtctagagcgaatcctctatttgggtggcgaata

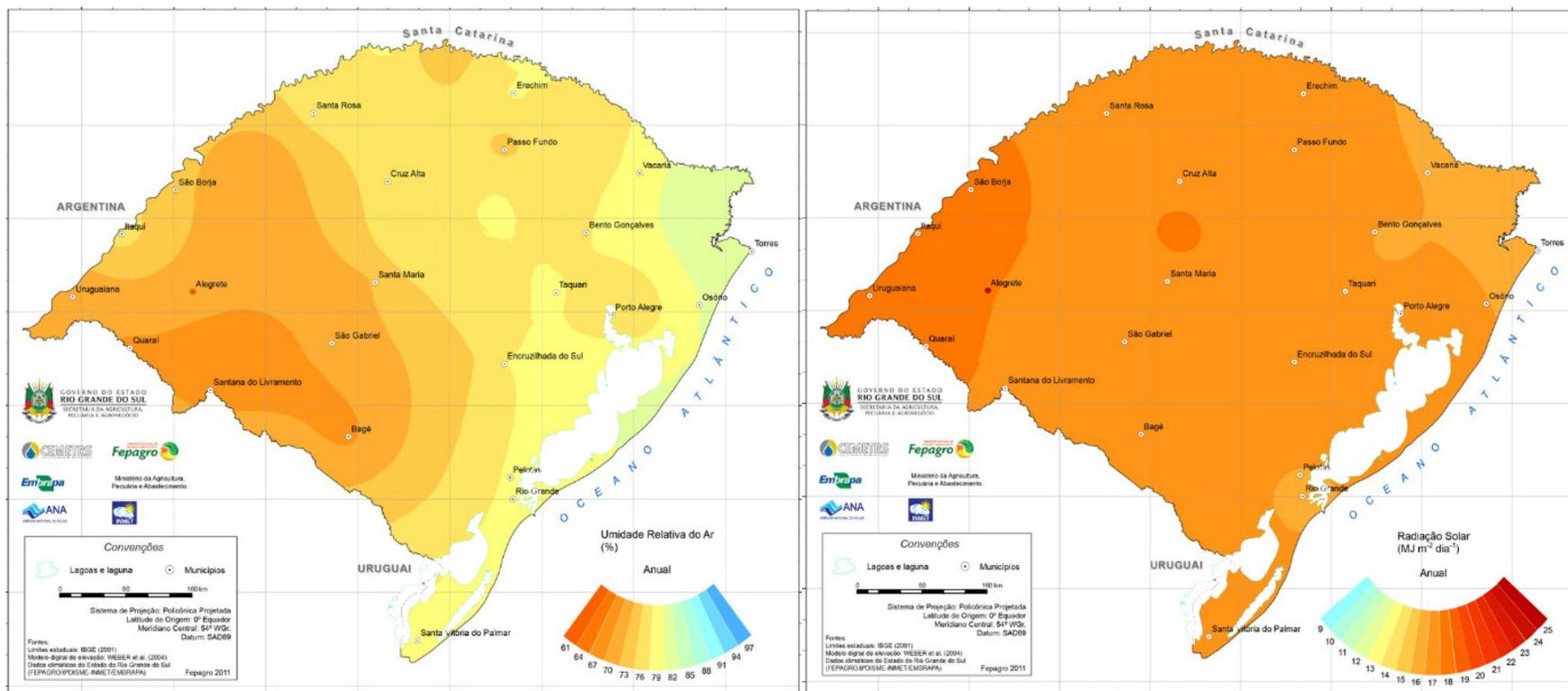
ANEXOS



ANEXO A – Médias de temperatura mínima e máxima para o Estado do Rio Grande do Sul. Fonte: CEMETRS, 2011.



ANEXO B – Temperatura média anual e precipitação pluviométrica média para o Estado do Rio Grande do Sul. Fonte: CEMETRS, 2011.



ANEXO C – Médias de umidade relativa do ar e radiação solar anual para o Estado do Rio Grande do Sul. Fonte: CEMETRS, 2011.