

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA
MESTRADO EM AGROECOLOGIA

ANDRÉ LUIZ RAPOSO BARROS

**Diversidade morfofisiológica, molecular e tolerância a salinidade de
estirpes de rizóbios de leguminosas do Baixo rio Mearim, Baixada
Maranhense.**

SÃO LUÍS
2016

ANDRÉ LUIZ RAPOSO BARROS

Eng. Ambiental

**Diversidade morfofisiológica, molecular e tolerância a salinidade de
estirpes de rizóbios de leguminosas do Baixo rio Mearim, Baixada
Maranhense.**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Agroecologia da Universidade
Estadual do Maranhão, para a
obtenção do título de Mestre ou
Doutor em Agroecologia.

Orientador(a): Prof. Dr. Christoph
Gehring

**SÃO LUÍS
2016**

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	6
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
2.1	Serviços ecossistêmicos da simbiose leguminosa-rizóbio.....	8
2.2	Mimosa pigra	10
2.3	Compatibilidade simbiótica dos rizóbios associado a leguminosas e sua influência na diversidade de bactérias dentro do nódulo.....	11
2.4	Caracterização fenotípica e genotípica de rizóbios.....	12
2.5	Rizóbios: tolerância a salinidade	13
3	HIPÓTESES.....	15
4	OBJETIVO GERAL	15
5	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
12.	REFERÊNCIAS	16

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo realizar a caracterização morfológica e molecular de rizóbios e da comunidade microbiana no interior dos nódulos e a avaliar sua resistência à salinidade de duas leguminosas e, regiões de forte intrusão salina no baixo curso do rio Mearim. Utilizou-se uma combinação de técnicas de microbiologia clássica (plaqueamento e descrição morfo-fisiológica) com modernas técnicas moleculares (sequenciamento da região 16S e metagenômica). A intrusão salina causou uma mudança geral na composição e riqueza de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO) reduzindo significativamente a riqueza de UTO dentro de três das principais famílias de bactérias encontradas, com dominância de *Enterobacteriaceae*. Entretanto, a intrusão salina teve efeitos mínimos sobre os genes funcionais, apontando para a redundância funcional dentro da comunidade de bactérias habitantes do nódulo. A mudança funcional observada ocorreu apenas dentro das famílias, onde se observou redução do número de genes funcionais de quatro das principais famílias e aumentando significativamente em *Enterobacteriaceae*, com seis OTU diferentes possuindo os genes NIF. A família *Enterobacteriaceae* continha 16 NIF genes e quatro NOD-genes. Desse modo, este grupo taxonômico pode compensar a redução da capacidade funcional dos demais grupos assumindo funções-chave no nódulo, normalmente atribuídas a bactérias do grupo 'rizóbio' (*Burkholderiaceae* e *Rhizobiaceae*).

Palavras-chave: bactéria fixadoras de nitrogênio; *Enterobacteriaceae*; mata ripária; serviços ecossistêmicos

ANDRÉ LUIZ RAPOSO BARROS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia da Universidade Estadual do Maranhão, para a obtenção do título de Mestre em Agroecologia.

Orientador: Prof. Dr. Christoph Gehring

Aprovada em ____/____/____

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Christoph Gehring – UEMA Orientador

Prof. Dr. Flávio Henrique Reis Moraes – UEMA

Prof. Dra. Camila Pinheiro Nobre – UEMA

São Luís
2016

1 INTRODUÇÃO

A importância das matas ciliares é múltipla, por servir de berçário importante para os peixes e lacustres, constituir um importante refúgio e corredor de biodiversidade vegetal (LACERDA; FIGUEIREDO, 2009), da herpetofauna e das aves, por seu efeito tampão contra níveis extremos na tábua de água (secas e enchentes) e de salinização (RODRIGUES et al., 2000) e por providenciar uma proteção física contra os efeitos erosivos do rio.

Apesar da sua proteção legal como Áreas de Preservação Permanente (APP), as matas ciliares do Maranhão estão sujeitas a uma forte dinâmica de desmatamento e degradação. Esta deterioração é particularmente preocupante nos cursos baixos dos rios da Baixada Maranhense, por sua considerável fertilidade em relação aos demais solos Maranhenses (MOURA, 2004), alta disponibilidade de água e relevo plano que levam à expansão rápida do cultivo de arroz irrigado até as beiradas do rio associado com sua exposição às ameaças atuais e futuras pela intrusão da língua salina, no âmbito do aumento do nível do mar (NICHOLLS; CAZENAVE, 2010), em combinação com uma forte dinâmica das marés, incluindo a famosa onda ‘pororoca’ com sua alta força erosiva nas margens do rio.

Leguminosas formam um componente característico e dominante em muitas matas ciliares tropicais, onde predominam espécies potencialmente nodulantes e fixadoras de N_2 , como relatado por Muniz et al. (2013). A baixa abundância natural de $15N$ em folhas de leguminosas ciliares da Amazônia indicam elevadas taxas de fixação biológica de nitrogênio (FBN) realizado pelas leguminosas (MARTINELLI et al., 1992; KREIBICH; KERN, 2003). Esta alta relevância da FBN provavelmente é consequência das elevadas perdas de nitrogênio inerentes às condições ambientais dos regimes semi-aquáticos das margens do rio, devido à lixiviação de nitrato e a denitrificação (MARTINELLI et al., 1992; KREIBICH; KERN, 2003). Portanto, considera-se o processo de FBN sob estas condições hídricas extremas um aspecto decisivo na ecologia ciliar, além disso, seu manejo eficiente tem importância chave para esforços direcionados à conservação, estabilização e à restauração de áreas ciliares degradadas.

Salinidade geralmente não é um problema encontrado no trópico úmido (PARIDA; DAS, 2005), mas as zonas costeiras da Baixada Maranhense diferem nisto. Dados preliminares indicam possibilidade de alta tolerância à salinidade em estirpes de rizóbios ciliares do baixo Mearim (MUNIZ et al., 2013). Isto é contrastante, pois geralmente os rizóbios apresentam baixa tolerância à salinidade (HAFEEZ et al., 1988; CRESPI; GÁLVEZ, 2000; MANCHANDA; GARG, 2008), sendo essa adaptação possivelmente relacionada à

intrusão salina resultante do aumento do nível do mar causada pelo aquecimento global (NICHOLLS; CAZENAVE, 2010). Assim, é essencial caracterizar a comunidade de microrganismos habitantes do nódulo e identificar o efeito da intrusão salina nessas populações.

Uma das ferramentas mais relevantes para a identificação de rizóbios é a caracterização molecular via sequenciamento (SCHNEIDER; DE BRUIJN, 1996). A biologia molecular, em especial a metagenômica, vem sendo disseminada nos últimos anos, sendo utilizada em estudos de caracterização de comunidades microbianas (BONILLA-ROSSO et al., 2012), afiliação filogenética dos membros da comunidade (KISAND et al., 2012), bem como estudar a dinâmica de populações específicas, ou grupos funcionais, de acordo com mudanças ambientais ou de manejo (DHARMENDER et al., 2012). Nesse contexto, o estudo da diversidade genética e da composição funcional da microbiota dos nódulos oferece uma fascinante ferramenta para a apreciação dos impactos antrópicos causados nas interações eco-físico-químicas dos ambientes.

A caracterização da comunidade habitante do nódulo ajudará a compreender como a intrusão salina afeta essa população ao longo do trecho ciliar. Tais conhecimentos são fundamentais para a compreensão da ecologia dos rizóbios recuperação e conservação da mata ciliar. Dessa forma, este estudo objetivou caracterizar a diversidade de bactérias que habitam dentro do nódulo em leguminosas da espécie *Mimosa pigra*; investigar o grau de tolerância a salinidade das estirpes em duas posições do Mearim, Baixada Maranhense sob influência da intrusão salina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Serviços ecossistêmicos da simbiose leguminosa-rizóbio

As *Fabaceae* (*Leguminosae*) consistem de uma família de aproximadamente 19.000 espécies divididas entre as três subfamílias, a *Papilionoideae*, a *Mimosoideae* e a *Caesalpinioideae* (LEWIS et al., 2005). Mediante as diversas pesquisas têm sido aplicado grande esforço ao longo de décadas para a identificação e descrição de leguminosas que possam nodular, principalmente nos trópicos onde sua diversidade é alta (SPRENT; GARDENS, 2001; SPRENT, 2009; DOYLE, 2011).

A maioria das leguminosas arbóreas tropicais são capazes de nodular com expressiva eficiência simbiótica (SPRENT, 2009). Estas espécies encontram-se entre as três subfamílias *Leguminosae*, que somadas possuem cerca de 8000 espécies lenhosas (> 19 mil espécies) (LEWIS et al., 2005). A maior subfamília encontra-se no grupo da *Papilionoideae* (4000 espécies lenhosas) concentrada na maioria das espécies nodulíferas, seguida pela *Mimosoideae* e *Caesalpinioideae* (SPRENT, 2009). Contudo, se conhece uma vasta quantidade de espécies que nodulam em caráter genérico: *Papilionoideae* (96%) e *Mimosoideae* (96%) formam nódulos, embora seja relativamente pouco a da *Caesalpinioideae* (22%) (SPRENT, 2009).

As leguminosas fixadoras de nitrogênio constituem cerca de 3000 espécies (DOMMURGUES, 1995) e são promissoras para recuperação de solos degradados (MACEDO et al., 2008) dado seu potencial de melhorar a qualidade do solo através do incremento de nitrogênio e matéria orgânica. Estas leguminosas fazem associações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogênio conhecidas como rizóbios e esta relação mutualística proporciona benefício para planta, disponibilidade de produtos nitrogenados para os simbiontes, aquisição de diferentes tipo de açúcares (STOWERS, 1985). Em ambientes perturbados ecologicamente as leguminosas são pioneiras, sendo muita vezes responsáveis por acelerar processos de sucessão natural (CAMPELLO et al., 2005). Embora as leguminosas fixadoras tenham resiliência em ambientes degradados, algumas plantas têm estratégias adaptadas para obtenção de recursos, por exemplo, sistemas radiculares profundos, crescimento rápido, tolerância a acidez, temperaturas e deposição serrapilheira que tem contribuição na recuperação de solos e ciclagem de nutrientes (MOURA, 2004; CARREIRA et al., 2008).

Estudos voltados para fixação biológica de N₂ tem se intensificado no Brasil desde a década de 80, resultando na formação de bancos de germoplasmas e identificação de várias espécies nodulíferas e também nos fatores que interferem esta nodulação (SOUZA MOREIRA et al., 1992), resultante de uma restrita especificidade do rizóbios com as plantas. Em condições naturais as leguminosas podem ser utilizadas para estabilização de cantos erosivos através de mosaicos de florestas tropicais, uma ferramenta que é utilizada para conservar áreas com biodiversidade florística elevada (CAMPELLO et al., 1998). Processos naturais de restauração ecológica podem acontecer por mecanismos naturais como inundação natural e dispersão de sementes. Estes fenômenos estruturam “mosaicos chaves” de regeneração em matas ripárias (NAKAMURA et al., 2007; CARREIRA et al., 2008).

As leguminosas com capacidade de formar nódulos em condições adversas e com alta eficiência simbiótica são promissoras para programas de recuperação de solos degradados e representam importantes fontes de recursos genéticos para seleção de genótipos adaptados a distintas condições (MATSUDA et al., 2002). O sucesso da recuperação de áreas está envolvido com a interação do rizóbio e leguminosa e seu crescimento rápido em condições adversas. No entanto, alguns fatores que dificultam o processo de sucessão dessas leguminosas são: a agressividade de espécies não nodulíferas, baixa fertilidade dos solos, regime de estresse hídrico: perda de nitrato por lixiviação ou denitrificação e a salinidade. Contudo, em ambientes tão distintos a ocorrência da fixação biológica de nitrogênio tem um aspecto decisivo na ecologia e no sucesso das espécies para a manutenção ou recuperação da mata ciliar.

A baixada maranhense e regiões adjacentes têm potencial para biodiversidade vegetal e de microrganismos que pode ser explorado em futuros trabalhos. Em vista a presente diversidade, tecnologias que utilizam códigos genéticos para estudos filogenéticos têm proporcionado avanços na taxonomia de plantas e bactérias. Muitos gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio têm sido descritas conforme Moreira et al., (1992), sendo 13 gêneros bacterianos fixadores de nitrogênio: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Azorhizobium*, *Burkholderia*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Ralstonia*, *Allorhizobium*, *Blastobacter*, *Devosia*, *Phyllobacterium* e *Ochrobactrum*. Alguns desses gêneros são simbioses de Mimosas pertencentes as α -Proteobacteria (AOKI et al., 2013).

2.2 *Mimosa pigra*

Mimosa pigra L. (sub-família Mimosoideae, tribo Eumimoseae) é uma leguminosa comumente encontrada em vários países no continente americano. É considerada nativa da América tropical e invasiva ao longo das regiões tropicais do Sudoeste da Ásia, África e Oceania (BRAITHWAITE et al., 1989), distribuiu-se em diversos ambientes de várzea parcialmente inundados com tolerância a cheias além de adaptável a diversos tipos de solo (LUQUE et al., 2014).

Esta planta pode produzir uma vasta quantidade de semente que se dispersam por duas vias: levadas pelo fluxo das correntezas do rio durante inundação ou por animais possibilitando, e por estarem associadas a climas tropicais, são exigentes quanto a luminosidade para regular seu florescimento e frutificação. Apesar disso, sua fácil germinação e dispersão de sementes faz desta espécie uma planta adaptável, o que garantiu seu sucesso no estabelecimento nas diversas regiões tropicais (BEILFUSS, 2007).

Esta capacidade de resistir e desenvolver-se em qualquer tipo de solo é atribuída às sementes que são de rápido crescimento e podem se manter dormentes por 15 anos ou mais dependendo do ambiente (LOWE et al., 2000). Em solos arenosos a vida útil das sementes pode ser ainda maior. A dormência das sementes no solo é quebrada pela expansão e contração do seu revestimento causado pela mudança de temperatura. Suas características biológicas de resiliência, tornam esta planta invasiva e competitiva com demais estas leguminosas suportam inundações de curto prazo, e seca sazonal, além de poderem crescer em altitudes de 700m (MARCHIORI; DOS SANTOS MACHADO, 2016)

Sua floração ocorre em diferentes meses, no entanto apresenta-se maior nos meses chuvosos. O seu desenvolvimento forma padrão monoespecífica na vegetação em formato toiceira que é considerado um problema levando a alguns impactos que causam danos a vegetações nativas locais por deslocá-las enquanto forma moitas que podem ser de difícil acesso para pessoas e animais proporcionando uma redução da biodiversidade vegetal em áreas de pastagens próximo ao leito dos rios (RIJAL; COCHARD, 2016).

Esta leguminosa apresenta-se associada primeiramente com bactérias do gênero *Burkholderia* (classificadas em beta-Proteobacteria) (BARRETT; PARKER, 2005). Este gênero encontra-se distante quando relacionado com bactérias da família *Rhizobiaceae* (alpha-Proteobacteria) que foram relatadas com *M. pigra* (DE et al., 2014). Desse modo, o sucesso da interação entre *Burkholderia* e *M. pigra* depende primariamente da

compatibilidade simbiótica desses dois organismos, principalmente dado a multiplicidade de microrganismos presente no solo.

2.3 Compatibilidade simbiótica dos rizóbios associado a leguminosas e sua influência na diversidade de bactérias dentro do nódulo

A compatibilidade entre o fator *nod* e flavonóides acontecem por mecanismos reguladores por moléculas de oligosacarídeo N-acetylglucosamina. Interações entre hospedeiro e leguminosa são altamente específicas, e de certo modo, o conjunto de fatores *nod* do hospedeiro são determinantes para tal especificidade (PERRET et al., 2000). Nesse primeiro estágio de interação moléculas são sintetizadas por exemplo, flavanóides e betaínas são secretados pelas plantas em resposta a indução do gene *nod* responsável pela codificação de diversas proteínas. Oligo-oligosacarídeo aparecem nos primeiros estágios após a infecção dentro dos canais radiculares levando os simbioses a se dividirem e penetrarem na parede celular da raiz que provocam: a depolarização da membrana, oscilação do cálcio intracelular. Esse processo desencadeia a divisão celular no córtex da raiz que dá origem ao nódulo (GAGE, 2004).

A capacidade dos rizóbios em aderir ao pelo radicular acontece por meio da ligação com Ca^{2+} mediada pela proteína ricasina presente na superfície da célula além de outras específicas estruturas na superfície do pelo radicular. Em *R. leguminosarum* bv. *trifolii* propriedades diferentes têm sido identificadas como por exemplo vinculador de cálcio que atuam na mediação e aglutinação do cálcio e ligação aos pelos radiculares, através da excreção de proteínas entre elas exopolissacarídeos glicanase, *PylA* e *PlyB* e *NodO* em meio de culturas contendo Ca^{2+} (AUSMEES et al., 2001). No entanto, em *Rhizobium elti* as mesmas proteínas apresentam tamanhos e particularidade diferentes e não parecem ter ampla distribuição filogenética (GAGE, 2004). O uso de rizóbios promíscuo em diversas culturas tem sido relado por pequenos agricultores (MPEPEREKI et al., 2000) e nem todos rizóbios locais são eficientes. A simbiose eficiente é considerada ponto chave, porém a ausência de estudos bioquímicos destas relações dificulta a compreensão.

Contudo, as comunidades de rizóbios de vida livre, por serem encontrados em maior quantidade no solo, têm maior chance de formar nódulos, diferentemente das estirpes comerciais, desta forma, a busca por inoculantes com estirpes de rizóbios nativos vem crescendo, resultando modelos de evolução para estudos de taxonomia (LINDSTRÖM et al., 2010).

Em um solo pode conter diversos microrganismos, porém dentro de uma espécie de leguminosa vários microrganismos podem habitar um mesmo nódulo (BALA; GILLER, 2001), essa variabilidade pode ocorrer por vários mecanismos ainda não tão bem elucidados. Portanto, um dos desafios para seleção de rizóbios que sejam eficientes na fixação biológica e colonização da raiz dada a competitividade dentro da comunidade de bactérias e a própria seleção da planta, que por apresentarem genótipos adaptados possuem habilidade competitiva com as estirpes locais. Embora possa existir inoculação cruzada de estirpes com qualquer espécie de leguminosa (ABAIDOO et al., 2007), é necessário que ocorra uma interação para que resulte no processo de simbiose. Esta associação ocorre com bactérias que tem genes *nod* que permite a colonização da raiz e podendo resultar na presença de um único hospedeiro dentro do nódulo. No entanto pesquisas têm demonstrado o contrário (ANYANGO et al., 1995; BENHIZIA et al., 2004; KIERSI; DENISON, 2008; IBÁÑEZ et al., 2009; ANDREWS et al., 2010; XU et al., 2014; ZGADZAJ et al., 2015).

2.4 Caracterização fenotípica e genotípica de rizóbios

Atualmente, diversas metodologias estão disponíveis para acessar a diversidade microbiana. Lambais et al., (2005) separam essas metodologias em dois grupos: as dependentes e as independentes de cultivo de microrganismos. Metodologias dependentes de cultivo, como o isolamento em meio de cultura consistem em métodos rápidos e econômicos que fornecem informações sobre grupos de microrganismos viáveis e cultiváveis em uma amostra de solo. As metodologias independentes de cultivo apresentam a vantagem de acessar a diversidade de microrganismos cultiváveis e não cultiváveis. Estas metodologias baseiam-se na amplificação de fragmentos específicos de rDNA (DNA ribossômico) por meio da PCR (Polymerase Chain Reaction).

A caracterização de isolados é o primeiro passo para selecionar estirpes que poderão ser utilizada no futuro, comumente os métodos utilizados são baseados na caracterização fenotípica, por apresentarem menor custo e simplicidade de aplicação, os parâmetros usados na identificação morfológica são: tempo de crescimento, diâmetro das colônias, forma, cor, produção de ácido e álcali, produção de muco (STAMFORD et al., 2015), método de coloração, alteração do pH do meio de cultura, produção de pigmentos, tolerância a baixo pH e produção de compostos indólicos (ANDRADE et al., 2002)

A caracterização fenotípica tem a capacidade de revelar certa diferenciação entre os

isolados de rizóbios, além de permitir uma análise prévia da diversidade e obtenção de microrganismos (EHRHARDT-BROCARDI et al., 2015). No entanto, essa caracterização por ser dependente da cultura *in vitro* de rizóbios apresenta alguns inconvenientes, como: dificuldades em desalojar microrganismos associados a biofilmes e partículas do solo, seletividade do meio, condições ótimas para crescimento e interações negativas entre as colônias de microrganismos (KIRK et al., 2004). Além disso, esse método não é tão discriminatório quanto ao uso de ferramentas moleculares.

Apesar da caracterização fenotípica apresentar a capacidade de revelar certa diferenciação entre isolados de rizóbios, consideráveis avanços foram conseguidos nos últimos anos, pelo emprego de técnicas de biologia molecular nos estudos de taxonomia e diversidade de rizóbios (LAMBALIS et al., 2005). Caracterização genotípica de rizóbios só foi possível graças ao desenvolvimento de métodos rápidos, capazes de exibir caracterização microbiana ao nível de gênero e espécies (SCHNEIDER; DE BRUIJN, 1996). Entre as técnicas, se destaca a PCR, que permite a amplificação das sequências definidas das moléculas de DNA. Desde as décadas de oitenta, vários estudos têm demonstrado que o gene 16S rRNA é especialmente usado como marcadores moleculares para avaliação da filogenia e taxonomia dos procariotos (GARRITY; HOLT, 2001), e quando estes critérios foram aplicados para o rizóbio resultam em alterações profundas na taxonomia

Weisburg et al. (1991), descreveu duas sequências de oligonucleotídeos iniciadores fD1 e rD1 para amplificação da região do 16S do operon do DNA ribossomal. Essas sequências são capazes de amplificar o gene 16S de muitas espécies de bactérias e têm sido usados, com sucesso para caracterizar e identificar várias espécies de bactérias em nível de gênero e espécie.

2.5 Rizóbios: tolerância a salinidade

Rizóbios são conhecidos por sua sensibilidade ou moderada resistência à salinidade. A sensibilidade pode ser atribuída a acumulação de íons tóxicos em diferentes tecidos da planta, os quais perturbam algumas atividades enzimáticas. Entre os critérios básicos de seleção de legumes tolerantes ao sal é a variabilidade genética dentro das espécies em relação à tolerância, a correlação entre o acúmulo de solutos orgânicos por ex. glicina betaína, prolina e prolina, e as compartimentações, estruturação dos legumes condicionada muitas das vezes pela adaptação (ZAHARAN, 1991).

Em primeiro caso o estresse salino reduz a nodulação de leguminosas inibindo a simbiose. Os níveis de salinidade que inibem a simbiose entre leguminosas e rizóbios são diferentes dos quais inibem o crescimento dos simbioses individuais. Contudo é amplamente aceito que a capacidade das leguminosas para se adaptar a ambientes salinos afeta as plantas. O estresse salino é um das muitas restrições ambientais que limitam a fixação de N_2 .

No entanto, muitos trabalhos que tratam sobre o efeito da salinidade na nodulação não relatam a capacidade de formação de nodulação nos primeiros estágios, sendo claro que o estresse salino reduz a nodulação, inibindo os eventos simbióticos muito precoces, como a colonização da raiz-cabelo (ZAHARAN, 1991)

Nódulos que apresentam vacúolos parecem ser mais eficientes em compartimentalizar e distribuir íons, evitando a toxicidade do sal. Essa melhoria pode promover o crescimento sob condições de salinidade e parece ser um critério básico para seleção e melhoramento de leguminosas tolerantes ao sal. Um estudo detalhado da anatomia induzida pela salinidade e mudanças estruturais pode produzir uma melhor compreensão dos mecanismos de adaptação das plantas a ambientes que sofre influencia salina. Segundo Solomon et al., (1986), o estresse salino induz alterações anatômicas nos tecidos de leguminosas, p.ex. *Pisumsativum*.

O nível de salinidade que inibe a simbiose entre legumes e rizóbios são diferentes daqueles que inibem o crescimento individual dos simbioses (LAUTER et al., 1981). Legumes são geralmente muito mais sensíveis a estresse osmótico do que microsimbioses (LAUTER et al., 1981; ZAHARAN, 1991). Em contraste, rizóbios de vida livre podem sobreviver em altos níveis de sal tanto em meio de cultura quanto no solo (ZAHARAN, 1991).

3 HIPÓTESES

Os rizóbios de leguminosas da mata ciliar do Baixo Rio Mearim são tolerantes a salinidade proporcionada pela intrusão salina do mar.

4 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a diversidade dos organismos habitantes do nódulo de *Mimosa pigra* da mata ciliar do baixo curso do rio Mearim tolerante à salinidade.

5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amostrar nódulos da espécie de leguminosas *Mimosa pigra* em regime semiaquático, parcialmente inundado ao longo do transecto do rio.
- Caracterizar os microrganismos habitantes nos nódulos coletados por métodos de caracterização molecular.
- Investigar as interações da comunidade dos microrganismos habitantes dos nódulos da leguminosa *M. pigra* com fatores ambientais e entre si.

12. REFERÊNCIAS

- ABAIDOO, R.; KEYSER, H.; SINGLETON, P.; DASHIELL, K.; SANGINGA, N. Population size, distribution, and symbiotic characteristics of indigenous Bradyrhizobium spp. that nodulate TGx soybean genotypes in Africa. **Applied Soil Ecology**, v. 35, n. 1, p. 57-67, 2007.
- ANDRADE, D.; MURPHY, P.; GILLER, K. The diversity of Phaseolus-nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with Phaseolus vulgaris L. in Brazil. **Applied and Environmental microbiology**, v. 68, n. 8, p. 4025-4034, 2002.
- ANDREWS, M.; HODGE, S.; RAVEN, J. A. Positive plant microbial interactions. **Annals of Applied Biology**, v. 157, n. 3, p. 317-320, 2010.
- ANYANGO, B.; WILSON, K. J.; BEYNON, J. L.; GILLER, K. E. Diversity of Rhizobia Nodulating Phaseolus vulgaris L. in Two Kenyan Soils with Contrasting pHs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 11, p. 4016-4021, 1995.
- AOKI, S.; ITO, M.; IWASAKI, W. From β - to α -Proteobacteria: The Origin and Evolution of Rhizobial Nodulation Genes nodII. **Molecular Biology and Evolution**, 2013.
- AUSMEES, N.; JACOBSSON, K.; LINDBERG, M. A unipolarly located, cell-surface-associated agglutinin, RapA, belongs to a family of Rhizobium-adhering proteins (Rap) in Rhizobium leguminosarum bv. trifolii. **Microbiology**, 2001.
- BALA, A.; GILLER, K. E. Symbiotic specificity of tropical tree rhizobia for host legumes. **New Phytologist**, v. 149, n. 3, p. 495-507, 2001.
- BARRETT, C. F.; PARKER, M. A. Prevalence of Burkholderia sp. nodule symbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado Island, Panama. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 57-65, 2005.
- BEILFUSS, R. (2007). Adaptive management of the invasive shrub Mimosa pigra at Gorongosa National Park
- BENHIZIA, Y.; BENHIZIA, H.; BENGUEDOUAR, A. Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus Hedysarum. **Systematic and applied ...**, 2004.
- BONILLA-ROSSO, G.; EGUIARTE, L. E.; ROMERO, D.; TRAVISANO, M.; SOUZA, V. Understanding microbial community diversity metrics derived from metagenomes: performance evaluation using simulated datasets. **Fems Microbiology Ecology**, p. n/a-n/a, 2012.

- BRAITHWAITE, R. W.; LONSDALE, W.; ESTBERGS, J. Alien vegetation and native biota in tropical Australia: the impact of *Mimosa pigra*. **Biological conservation**, v. 48, n. 3, p. 189-210, 1989.
- CAMPELLO, E. F.; DIAS, L.; MELLO, J. **Sucessão vegetal na recuperação de áreas degradadas**. Viçosa, MG: UFV, 1998, p. 196
- CAMPELLO, E. F. C.; FRANCO, A. A.; FARIA, S. Aspectos ecológicos da seleção de espécies para sistemas agroflorestais e recuperação de áreas degradadas. In: DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005.p. 482.
- CARREIRA, J.; VIÑEGLA, B.; GARCÍA-RUIZ, R.; OCHOA, V.; HINOJOSA, M. Recovery of biochemical functionality in polluted flood-plain soils: The role of microhabitat differentiation through revegetation and rehabilitation of the river dynamics. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2088-2097, 2008.
- CRESPI, M.; GÁLVEZ, S. Molecular mechanisms in root nodule development. **Journal of plant growth regulation**, v. 19, n. 2, p. 155-166, 2000.
- DE, B.; DE FREITAS, A.; BORGES, W.; DE ANDRADE, M.; DE SAMPAIO, E.; DE E SANTOS, C.; PASSOS, S.; XAVIER, G.; MULATO, B.; DO DE LYRA, M. Characteristics of nodule bacteria from *Mimosa* spp grown in soils of the Brazilian semiarid region. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 8, p. 788-796, 2014.
- DHARMENDER, K.; PRAGATI, J.; KRITIKA, G. Recent trends in characterization of microbial diversity from environment: a review. **Acta Agriculturae Serbica**, v. 17, n. 33, p. 31-46, 2012.
- DOMMERGUES, Y. Nitrogen fixation by trees in relation to soil nitrogen economy. **Fertilizer Research**, v. 42, n. 1-3, p. 215-230, 1995.
- DOYLE, J. J. Phylogenetic Perspectives on the Origins of Nodulation. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 11, p. 1289-1295, 2011.
- EHRHARDT-BROCARD, N. C. M.; STOCCO, P.; TRAMONTIN, A. L.; OLIVEIRA FILHO, L. C. I.; SANTOS, J. C. P. Diversidade Cultural, Morfológica E Genética De Diazotróficos Isolados De Nódulos De Bracatinga. **Revista Árvore**, v. 39, n. 5, p. 923-933, 2015.
- GAGE, D. J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 2004.

- GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. The road map to the manual. In: **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology** Springer, 2001.p. 166.
- HAFEEZ, F. Y.; ASLAM, Z.; MALIK, K. A. Effect of salinity and inoculation on growth, nitrogen fixation and nutrient uptake of *Vigna radiata* (L.) Wilczek. **Plant and Soil**, v. 106, n. 1, p. 3-8, 1988.
- IBÁÑEZ, F.; ANGELINI, J.; TAURIAN, T.; TONELLI, M. L. Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic Gammaproteobacteria. **Systematic and applied ...**, 2009.
- KIERSI, E. T.; DENISON, R. F. Sanctions, cooperation, and the stability of plant-rhizosphere mutualisms. **Annual review of ecology, evolution, and systematics**, p. 215-236, 2008.
- KIRK, J. L.; BEAUDETTE, L. A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J. N.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, n. 2, p. 169-188, 2004.
- KISAND, V.; VALENTE, A.; LAHM, A.; TANET, G.; LETTIERI, T. Phylogenetic and Functional Metagenomic Profiling for Assessing Microbial Biodiversity in Environmental Monitoring. **Plos One**, v. 7, n. 8, p. e43630, 2012.
- KREIBICH, H.; KERN, J. Nitrogen fixation and denitrification in a floodplain forest near Manaus, Brazil. **Hydrological Processes**, v. 17, n. 7, p. 1431-1441, 2003.
- LACERDA, D. M. A.; FIGUEIREDO, P. D. Restauração de matas ciliares do rio Mearim no município de Barra do Corda-MA: seleção de espécies e comparação de metodologias de reflorestamento. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 2, p. 295-304, 2009.
- LAMBAIS, M.; CURY, J.; MALUCHE-BARETTA, C.; BULL, R.; VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L.; COOPER, M.; SILVA, A.; CARDOSO, E. Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. In: P. A. Vidal-Torrado, LRF; Cooper, M. **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: Minas Gerais: Sociedade Brasileira do Solo, 2005.p. 43-84.
- LAUTER, D.; MUNNS, D.; CLARKIN, K. Salt response of chickpea as influenced by N supply. **Agronomy Journal**, v. 73, n. 6, p. 961-966, 1981.
- LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the World**, 2005,
- LINDSTRÖM, K.; MURWIRA, M.; WILLEMS, A.; ALTIER, N. The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 6, p. 453-463, 2010.

- LOWE, S.; BROWNE, M.; BOUDJELAS, S.; POORTER, D. M. 100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database. **100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database**, 2000.
- LUQUE, G. M.; BELLARD, C.; BERTELSMEIER, C.; BONNAUD, E. The 100th of the world's worst invasive alien species. **Biological ...**, 2014.
- MACEDO, M. O.; RESENDE, A. S.; GARCIA, P. C.; BODDEY, R. M.; JANTALIA, C. P.; URQUIAGA, S.; CAMPELLO, E. F. C.; FRANCO, A. A. Changes in soil C and N stocks and nutrient dynamics 13 years after recovery of degraded land using leguminous nitrogen-fixing trees. **Forest Ecology and Management**, v. 255, n. 5–6, p. 1516-1524, 2008.
- MANCHANDA, G.; GARG, N. Salinity and its effects on the functional biology of legumes. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 5, p. 595-618, 2008.
- MARCHIORI, J. N. C.; DOS SANTOS MACHADO, P. F. Anatomia do lenho em espécies sul-brasileiras da série Stipellares Benth.(Mimosa L.–Fabaceae). 1–Fundamentos de taxonomia e anatomia da madeira. **Balduinia**, n. 51, p. 25-31, 2016.
- MARTINELLI, L.; VICTORIA, R.; TRIVELIN, P.; DEVOL, A.; RICHEY, J. 15N natural abundance in plants of the Amazon river floodplain and potential atmospheric N₂ fixation. **Oecologia**, v. 90, n. 4, p. 591-596, 1992.
- MATSUDA, A.; DE SOUZA MOREIRA, F. M.; SIQUEIRA, J. O. Tolerância de rizóbios de diferentes procedências ao zinco, cobre e cádmio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 3, p. 343-355, 2002.
- MOURA, E. G. **Agroambientes de transição entre o trópico úmido e semi-árido maranhense**. São Luís: UEMA, 2004,
- MPEPEREKI, S.; JAVAHERI, F.; DAVIS, P.; GILLER, K. Soyabeans and sustainable agriculture: promiscuous soyabeans in southern Africa. **Field Crops Research**, v. 65, n. 2, p. 137-149, 2000.
- NAKAMURA, F.; SHIN, N.; INAHARA, S. Shifting mosaic in maintaining diversity of floodplain tree species in the northern temperate zone of Japan. **Forest Ecology and Management**, v. 241, n. 1, p. 28-38, 2007.
- NICHOLLS, R. J.; CAZENAVE, A. Sea-level rise and its impact on coastal zones. **Science**, v. 328, n. 5985, p. 1517-1520, 2010.

- PARIDA, A. K.; DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 60, n. 3, p. 324-349, 2005.
- PERRET, X.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W. J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 1, p. 180-201, 2000.
- RIJAL, S.; COCHARD, R. Invasion of *Mimosa pigra* on the cultivated Mekong River floodplains near Kratie, Cambodia: farmers' coping strategies, perceptions, and outlooks. **Regional Environmental Change**, v. 16, n. 3, p. 681-693, 2016.
- RODRIGUES, R. R.; DE FREITAS LEITÃO FILHO, H.; LIMA, M. I. R.; KON, S. **Matas ciliares: conservação e recuperação**. Universidade São Paulo: São Paulo, 2000,
- SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F. **Rep-PCR mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer-assisted phylogenetic pattern analysis**. Kluwer Academic Publishers, 1996, p. 174
- SOLOMON, M.; GEDALOVICH, E.; MAYER, A.; POLJAKOFF-MAYBER, A. Changes induced by salinity to the anatomy and morphology of excised pea roots in culture. **Annals of Botany**, v. 57, n. 6, p. 811-818, 1986.
- SOUZA MOREIRA, F.; SILVA, M. F.; SÉRGIO MIANA, F. Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region of Brazil. **New Phytologist**, v. 121, n. 4, p. 563-570, 1992.
- SPRENT, J. I. Bacteria nodulating legumes. In: **Legume Nodulation: A Global Perspective** Wiley Online Library, 2009.p. 45-78.
- SPRENT, J. I.; GARDENS, R. B. **Nodulation in legumes**. Kew : Royal Botanic Gardens, 2001,
- STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C.; RUNJANEK, N. G.; BORGES, W. L.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias (Agrária)**, v. 2, n. 4, p. 249-256, 2015.
- STOWERS, M. D. Carbon metabolism in *Rhizobium* species. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 89-108, 1985.
- WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

- XU, L.; ZHANG, Y.; WANG, L.; CHEN, W.; WEI, G. Diversity of endophytic bacteria associated with nodules of two indigenous legumes at different altitudes of the Qilian Mountains in China. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 457-465, 2014.
- ZAHRAN, H. Conditions for successful Rhizobium-legume symbiosis in saline environments. **Biology and Fertility of Soils**, v. 12, n. 1, p. 73-80, 1991.
- ZGADZAJ, R.; JAMES, E. K.; KELLY, S.; KAWAHARADA, Y.; DE JONGE, N.; JENSEN, D. B.; MADSEN, L. H.; RADUTOIU, S. A legume genetic framework controls infection of nodules by symbiotic and endophytic bacteria. **PLoS Genet**, v. 11, n. 6, p. e1005280, 2015.

Capítulo 1

André Luiz Raposo Barros^{a*}, Márcio Fernandes Alves Leite^a, Mattias de Hollander^b, Ronilson Lima Luz^a, Flávio Henrique Reis Moraes^c, Christoph Gehring^{a*}, Eiko Eurya Kuramae^b

Impacts of saltwater intrusion on taxonomical and functional richness and composition of bacterial communities inhabiting nodules of *Mimosa pigra* in riverine forests of eastern Amazonia

Running title: Saltwater intrusion shifts nodule bacteria

Article type: Letters

Statement of authorship: E. Kuramae, C. Gehring, A. L. R. Barros and F. H. R. Moraes designed the study. A. L. R. Barros and R. L. Luz collected the samples and extracted the DNA, M. de Hollander processed the data. A. L. R. Barros and M. F. A. Leite performed the data analysis. A. L. R. Barros wrote the paper with contributions from all the authors.

* Corresponding Author: christophgehring@yahoo.com.br

^aAgroecology Program of Maranhão State University – UEMA

Cidade Universitária Paulo VI s/n, 65025-970 São Luís – MA, Brazil.

Tel.: +55 98 32769638

^bNetherlands Institute of Ecology (NIOO/KNAW), Department of Microbial Ecology, Wageningen

^cCeuma University, Rua Josué Montello 01, Renascença II s/n São Luís – MA, Brazil

Keywords:

Maranhão lowlands; nitrogen biological fixation; *Enterobacteraceae*; shotgun metagenomics; nodule microbial community; seawater intrusion

ABSTRACT

This study explores the effects of saltwater intrusion on bacterial communities within nodules of *Mimosa pigra* (L.) in riverine forests of the Mearim delta (eastern periphery of Amazonia). With shotgun analysis of cultivable bacteria we combine taxonomic and functional information.

(i) Contrary to our expectations, both α and β Proteobacteria combined only 4.5% and 10.5% of overall nodule bacteria phylogenetic Operational Taxonomic Unit (OTU) richness.

Saltwater intrusion reduced overall OTU richness and affected phylogenetic composition, with a significantly reduced OTU richness within three of the top-eight families, and a strongly increased dominance of *Enterobacteriaceae*. (increasing from 26% to 53% of OTU richness). Contrary to OTU-richness, saltwater intrusion had only minor effects on overall functional richness, pointing to functional redundancy within bacteria inhabiting the nodule. Saltwater intrusion significantly affected within-family functional OTU-richness - with significantly reduced richness in four of the top-eight families and significantly increased richness in *Enterobacteriaceae*. The family *Enterobacteriaceae* contained 16 *nif*-genes and four *nod*-genes. Thus, this key family apparently compensates taxonomic erosion by assuming key nodule functions *nif* and *nod* normally concentrated within nodule 'rhizobia' bacteria (*Burkholderiaceae* and *Rhizobiaceae*).

1. INTRODUCTION

Nitrogen losses via denitrification are high in tropical semiaquatic riverine ecosystems (KREIBICH; KERN, 2003). Silva et al (unpublished data) point to a high dominance of potentially nodulating legume trees and lianas in riverine forests of our study region,

suggesting that legume BNF provides a pathway for replacement of these gaseous N-losses. Biological nitrogen fixation in riverine environments is furthermore facilitated by relative increases in the two main BNF-limiting factors, (i) increased P-availability in anaerobic soils with reduced Fe^{2+} ; and increased energy availability for the legume host via additional lateral light access towards the open river.

Global warming has caused sea level to rise an estimated / average 3.1mm yr^{-1} from 1990 - 2012 (CAZENAVE et al., 2014), sea-level rise is believed to accelerate to reach $+0.34\text{m}$ (optimistic scenario) - $+1.4\text{m}$ (pessimistic scenario) until 2100 (IPCC, 2013). An estimated 46–59% of global coastal wetlands are believed to be threatened by saltwater intrusion (SPENCER et al., 2016). Our study region, the Maranhão Lowlands, forms a particularly-vulnerable ecotone, due to its low and level landscape, in combination with relatively high land-use pressure and severe problems of rural poverty. Next to the more visible changes in plant and animal species associated with saltwater intrusion there exist the less visible impacts on microbiota. Salinity-tolerance is generally held to be low in ‘rhizobia’ bacteria (TU, 1981), and might even disrupt the signal exchange process that conduces the nodule formation (MIRANSARI; SMITH, 2007).

We select *Mimosa pigra* L. (sub-family Mimosoideae, tribe Eumimoseae) as model legume species (Figure 1). Mimosoideae form the largest of the three legume sub-families, and Eumimoseae one of the largest ‘tribes’ within this subfamily. Co-evolutionary considerations suggest that all Eumimoseae are capable of nodulation and symbiotic N_2 -fixation, mainly with more primitive β -rhizobia (*Burkholderia* and *Cupriavidus*) (SPRENT, 2009) (citargrupos de bactérias) (Sprent, 2007). *Mimosa*

pigra is a ruderal legume bush, widespread throughout its native range of tropical South and Central America (SIMON et al., 2011), but also infamous due to its aggressiveness as an invasive species (LUQUE et al., 2014) in Taiwan (CHEN et al., 2005), Australia (BRAITHWAITE et al., 1989), Rwanda (SEBURANGA et al., 2013), Senegal (GUEYE et al., 2015). Remarkably, in these new places this plant genus seems to adopt different symbionts than their native relatives (GEHLOT et al., 2013).

This study therefore explores the impacts of saltwater exposure / salinity stress on taxonomic and functional richness and composition within nodules of *Mimosa pigra*, a ‘ruderal’ riverine legume bush in the delta of the Mearim river, eastern periphery of Amazonia.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Study region

Research was conducted in the riparian forest of the lower Mearim river, the largest river of Maranhão State, within the ‘Maranhão Lowlands’ region, eastern periphery of Amazonia, in Arari and Vitória do Mearim counties (3°27’S / 44°46’E). Natural vegetation is part of the ‘Belém endemism center’ (Almeida & Vieira 2010). Soils are alluvial (hydromorphic Vertisols of marine origin, also called shrink-swell soils (USDA, 2010), which likewise predominate in other parts of the eastern Amazonian lowlands) and are poorly drained due to a high clay content both of fluvial and marine origins. Climate according to the Köppen-classification is *Aw*, 85% of the annual precipitation of 1.724 mm (7 yr.-average of the meteorological station Santa Inês at 71 km distance) are concentrated in the December – May rainy season. The river’s water table follows this seasonality of rainfall throughout its 99.058 km²

(29.8% of Maranhão state) watershed (NUGEO/LABMET, 2013), but is also affected by low/high tides.

2.2 Nodule sampling design

We investigate the influence of salinity on the nodule community of ruderal *Mimosa pigra* (Figure 1), common throughout Latin America and invasive in other parts of the tropics. We conduct research in two sampling regions: one with the presence of saltwater intrusion (SW+), near the village of Curral da Igreja (adjacent to mangrove forests), subject to saltwater intrusion and salty soils (Table 1), and the other located far from the saltwater intrusion (SW-), surrounding the village of Estirão Grande (57 km further river upstream, no saltwater intrusion) (Figure 2). For each legume species and sampling region we sampled three plants, with a minimum distances of 100 m, and in each plant we collected a minimum of 10 nodules and subsequent selection of three nodules / plant for molecular analyses.

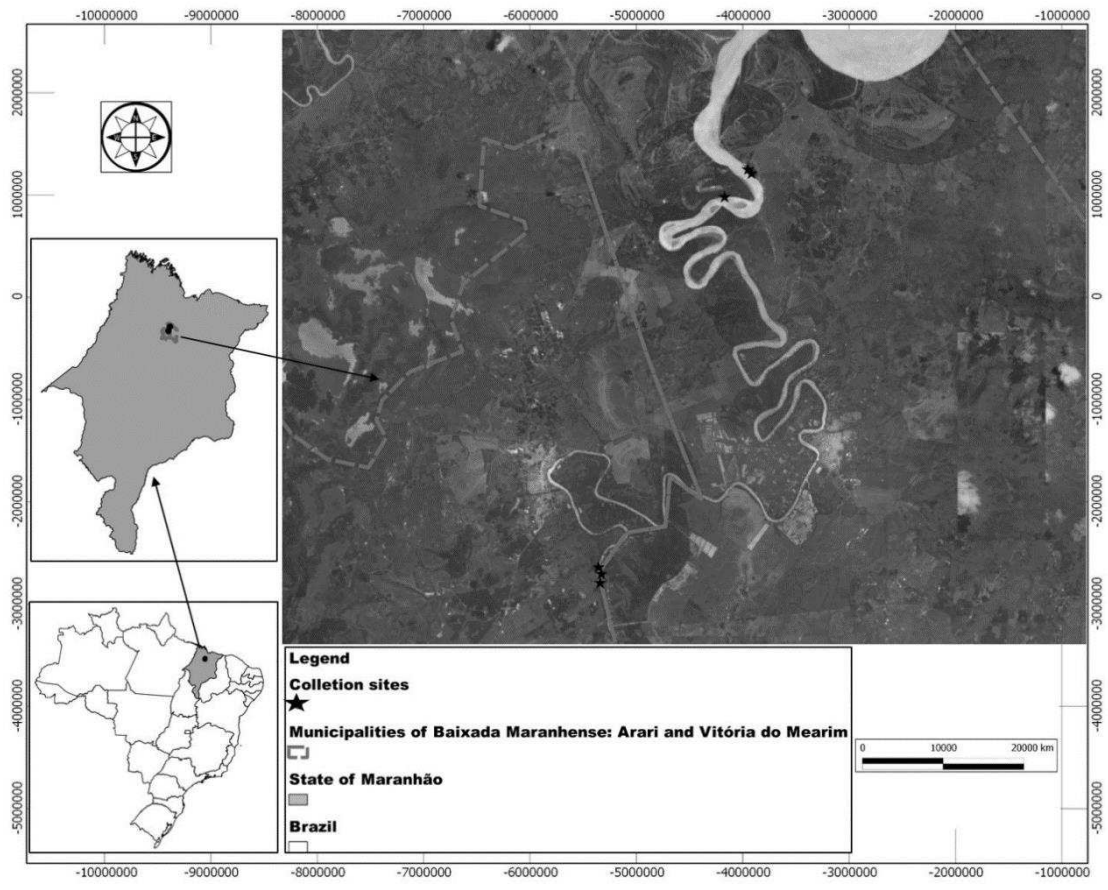


Figure 2. Two study regions and 6 nodule sampling sites at the lower Mearim river, eastern periphery of Amazonia.

2.3 Soil characteristics

We collected compound soil samples (0-10 cm) in the surroundings of each sampled plant. We subsequently determined soil texture (pipette method) (KLUTE et al., 1986) pH (0.01 M CaCl_2 suspension), soil organic matter content (Walkley-Black method) (WALKLEY; BLACK, 1934), available P (extraction with synthetic anion exchange resin Amberlite IRA-400) and exchangeable Na and K (Mehlich I), Ca, Mg (KCl extraction) and H+Al (SMP Method), following IAC (2001) routines.

Soil analysis revealed few differences between the two regions. Saltwater influence resulted in a nearly 1.7 times ($p < 0.05$) higher Na-content in (SW+) than in SW-. We also find significantly higher total C (+313%, $p < 0.05$) in topsoil surrounding the three SW+ legumes as compared to SW- plants. Both regions presented nearly the same soil texture (data not shown).

Table 1 – Differences of soil chemical characteristics between the regions with (SW+) and without (SW-) seawater intrusion as given by t-test comparison or non-parametric Mann-Whitney U test

Variables	SW+	SW-	p
pH*	6.3±1.2	4.8±0.4	0.51
C g/dm ³	3.7±0.3	15.3±2.7	0.049
P mg/dm ³	32.0±10.1	17.7±1.9	0.23
Na (mmol _c /dm ³)	15.2±1.7	9.1±1.25	0.045
K (mmol _c /dm ³)	6.7±0.5	4.5±1.0	0.13
Ca (mmol _c /dm ³)	22.3±8.7	40.7±2.3	0.11
Mg (mmol _c /dm ³)	54.0±22.6	36.7±1.7	0.49

2.4 Nodule processing

The nodules were collected by following standard methods described in SOMASEGARAN; HOBEN (2012) and stored in a recipient containing silica gel for max. 3 days for transport to the Soil Microbiology Laboratory of Maranhão State University. Nodules were thoroughly washed in running tap water, sterilized by immersing in alcohol for 40 seconds and then in a 2.5% sodium hypochlorite solution for 3 min, followed by thorough washing with sterile distilled water. In order to guarantee the complete removal of superficial microorganisms we repeated this process 10 times.

We cut each surface-sterilized nodule in half, and selected three of the 10 processed nodules based on their bloody coloration (indicating the presence of active leghemoglobin) (SANTANA et al., 1998). Both nodule halves were touched with a

platinum needle and subsequently plated on a petri dish containing the medium yeast manitol agar with Congo Red (YMA-CR) and incubated at 28 °C for 48h.

2.5 DNA analysis via shotgun sequencing

The total microbial community that grew in each plate described in section 2.4 was removed from the plate with a platinum loop and pooled in Yeast Manitol Broth (YMB) for overnight growth, after which 1 mL of this medium was added into the Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA) for total DNA extraction of microbial community. Extracted DNA was sent to Macrogen (Seoul, South Korea) for shotgun sequencing with the Illumina MiSeq platform (Illumina Inc, Madison, WI). The sequencing library was prepared by random fragmentation of each DNA sample, followed by a 5' and 3' adapter ligation. Adapter-ligated fragments were then gel purified. Subsequently, the library was loaded into a flow cell where the fragments were then amplified into a single clonal cluster via bridge amplification. When cluster generation was complete the templates were sequenced by detecting single bases incorporated into DNA template strands.

2.6 Metagenomic data analysis

We obtained per-nodule fastq files which we quality-filtered with sickle (JOSHI; FASS, 2011) for single end reads, by trimming bases below phred score 36 and shorter than 100 bp, thus retaining only high-quality reads.

Full-length 16S from the Silva release 119 (QUAST et al., 2013) were obtained in Qiime compatible format from the Silva Download Archive (<http://www.arb->

silva.de/download/archive/qiime/). For each sample dataset all reads were mapped to the full length 16S sequences, using the USEARCH global algorithm implemented in VSEARCH version 1.9.6 (ROGNES et al., 2016). The alignment results in usearch table format (uc) were directly converted to BIOM format using biom version 2.1.5 (MCDONALD et al., 2012). Consensus/majority taxonomy was added as metadata to the biom file. Finally all BIOM files of each dataset were merged using Qiime version 1.9.1 (CAPORASO et al., 2010). The BIOM file was converted to a merged OTU (Operational Taxonomic Units) table to genus level using the R package phyloseq(MCMURDIE; HOLMES, 2013).

All steps were implemented in a workflow made with Snakemake version 3.5.4 (KÖSTER; RAHMANN, 2012) available at: <https://gitlab.bioinf.nioo.knaw.nl/amplicon-metagenomics/meta-16S> (De Hollander 2016). The final output resulted in a table containing a list of genes with their respective abundances in the 18 sequenced nodules (from 3 plants in saline and 3 in non-saline exposure, 3 nodules per plant), according to two different algorithms: DIAMOND (BUCHFINK et al., 2015) and Kraken (WOOD; SALZBERG, 2014) , and two functional information: following both KEGG (KANEHISA et al., 2008) and PFAM (PUNTA et al., 2012) databases. We subsequently concentrate our study on the DIAMOND algorithm for taxonomy and on KEGG classification for functional characterization, because Kraken tended to overclassify reads (PEABODY et al., 2015).

2.7 Statistical analysis

We compare the community structure by evaluating the number of OTUs within each taxonomical level from Phylum to Family by using the KRONA tool for metagenomics

visualization (ONDOV et al., 2011). We also performed analysis of variance to compare the effects of saltwater intrusion in both family and genera richness (total number of families/genera within each nodule) and functional richness (total number of gene-related functions within each nodule). When the count-data exhibited over-dispersion we applied a negative binomial model (`glm.nb()` in MASS package).

In order to evaluate the impact of seawater intrusion on nodule microbial community, we performed a likelihood analysis based on frequencies of presence or absence within the dataset. We also evaluated the effects of saltwater influence on the total number of OTU detected for each family. Our analysis is based on the presence/absence both of taxa and of functions and the combination of the two. We use Venn diagrams to show both taxa and functions uniquely found in each region and those occurring in both.

We investigate possible effects of seawater intrusion on nodule bacterial communities with a Generalized Linear Model (GLM) based on binomial data distribution (with the best Residual vs Fitted relationship), using the R package `mvabund` (WANG et al., 2012). In order to evaluate bacterial-specific interactions, we checked for residual correlations matrix in each genus (POLLOCK et al., 2014), as this avoids the influence of the experimental treatment bias in the correlation coefficient. We also performed Multiple Factor Analysis (MFA) (ABDI et al., 2013), using the package `FactoMineR` (LÊ et al., 2008) and based on the presence/absence OTU table. The resulting dissimilarity (binomial distance matrix) between both plants (plant host replicates) and nodules (within plant replicates) reflects potential location and dispersion effects at two contrasting geographic scales, between sampled plants (100 - 900 m) and between nodules of an individual plant (0.50 – 2 m).

Based on the total number of sequenced bins we select the eight bacterial families which contained 99.51% of the total number of different genes. In order to describe the influence of environmental variables (geographic distance and soil factors) on the bacterial occurrence of these top-eight families, we adopt a species distribution modeling (SDM) in a negative binomial (OTU counts) analysis. We applied a least absolute shrinkage and selection operator (LASSO) penalty as this simplifies the model interpretation by setting to zero any interaction coefficient that does not help to reduce the Bayesian Information Criterion (BIC) (OSBORNE et al., 2000).

We merged both taxonomy and functional information, in order to obtain correspondent functions related to each taxon within nodule communities and the specific effects of saltwater intrusion on these.

3. RESULTS

3.1 Microbial communities within *Mimosa pigra* nodules and the impacts of saltwater influence

Metagenomics analysis based on the bacterial community showed groups with the majority of OTU belonged to the phyla *Proteobacteria* (221), followed by *Actinobacteria* (144), *Firmicutes* (75), *Bacteroidetes* (4), *Chloroflexi* (3), *Cyanobacteria* (2), *Chorobi* (1), *Deinococcus* (1), *Planctomycetes* (1), and *Spirochetes* (1). The phylum *Proteobacteria* divided into *Gammaproteobacteria* (157), *Betaproteobacteria* (46), *Alphaproteobacteria* (16), *Epsilonproteobacteria* (1), and one unclassified *Proteobacteria*. This points to a great species richness of bacterial communities living inside these nodules, notably from the *Proteobacteria* phylum. The

top-eight families combined 99.51% of OTUs. With 71.49% of OTUs, *Enterobacteriaceae* dominated nodule species richness, followed by *Burkholderiaceae* (9.42%), *Bacillaceae* (6.70%), *Paenibacillaceae* (4.52%), *Microbacteriaceae* (2.90%), *Moraxellaceae* (2.80%), *Micrococcaceae* (1.42%), and *Dermabacteraceae* (0.26%).

Figure 3A shows the strong reduction in taxonomic richness associated with seawater intrusion (SW+) (Figure 3A). We also find the presence of 66 unique taxons (according to DIAMOND algorithm) occurring in the SW+ region . We also investigate the presence/absence of unique functions occurring in SW+ and SW- regions. Figure 3B shows the Venn diagram for functions identified according to the KEGG database, the majority of functions occurred in both regions.

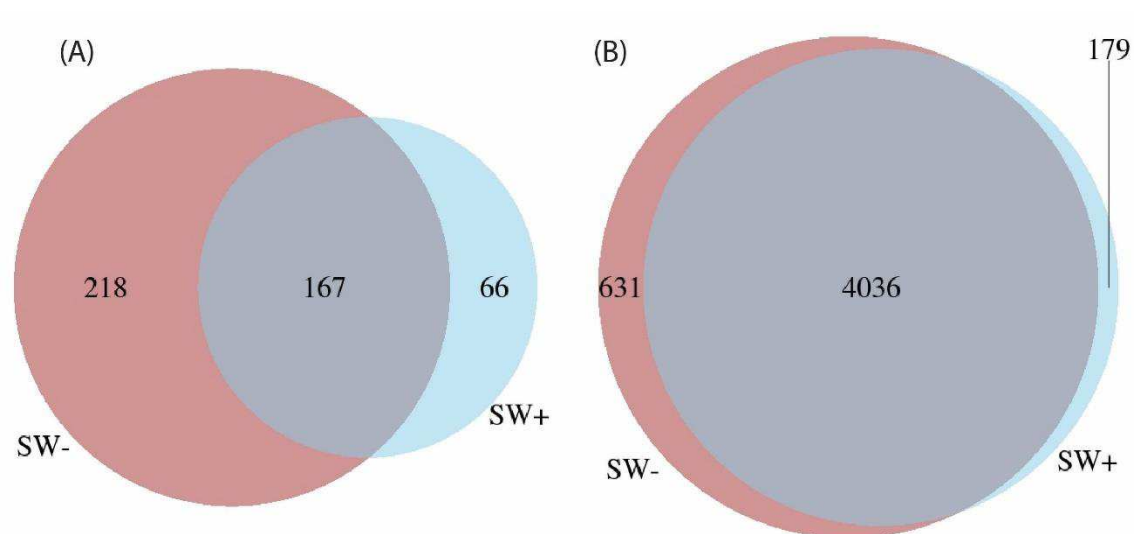


Figure 3 – Venn Diagram comparing unique OTUs in low-salinity (purple) and high-salinity (light blue) environments and shared OTUs (dark blue), as identified according to (a) DIAMOND taxonomic algorithm, and (b) number of similar functions according to KEGG database.

Nodule bacterial communities differed strongly between sampling regions (Figure 4 A+B). Saltwater intrusion (SW+) is associated with (i) a doubling of the dominance of *Enterobacteriaceae* (relative increase from 26 to 53% of OTUs and even an absolute increase in OTU-richness), and (ii) a strong reduction in the share of *Burkholderiaceae* (decrease from 12% to 3%) and also of other families (*Bacillaceae* and *Dermabacteraceae*). The OTU share of *Rhizobiales* was remarkably small in *Mimosa pigra* nodules with only 3% and 2% of OTU in SW+ and SW-, respectively.

Figure 4 – Bacterial OTU richness (based on the number of OTUs) in the regions (A) with and (B) without saltwater influence.

Bacterial family richness was significantly 17.6% lower (Figure 5) and genera richness 34% lower ($p < 0.05$) under saltwater influence. OTU-richness differed statistically according to the saltwater influence in four of the eight major families (Figure 6). OTU richness was even 48.3% higher in *Enterobacteriaceae* under saltwater influence, whereas the three other families suffered a reduction of OTU richness with saltwater exposure.

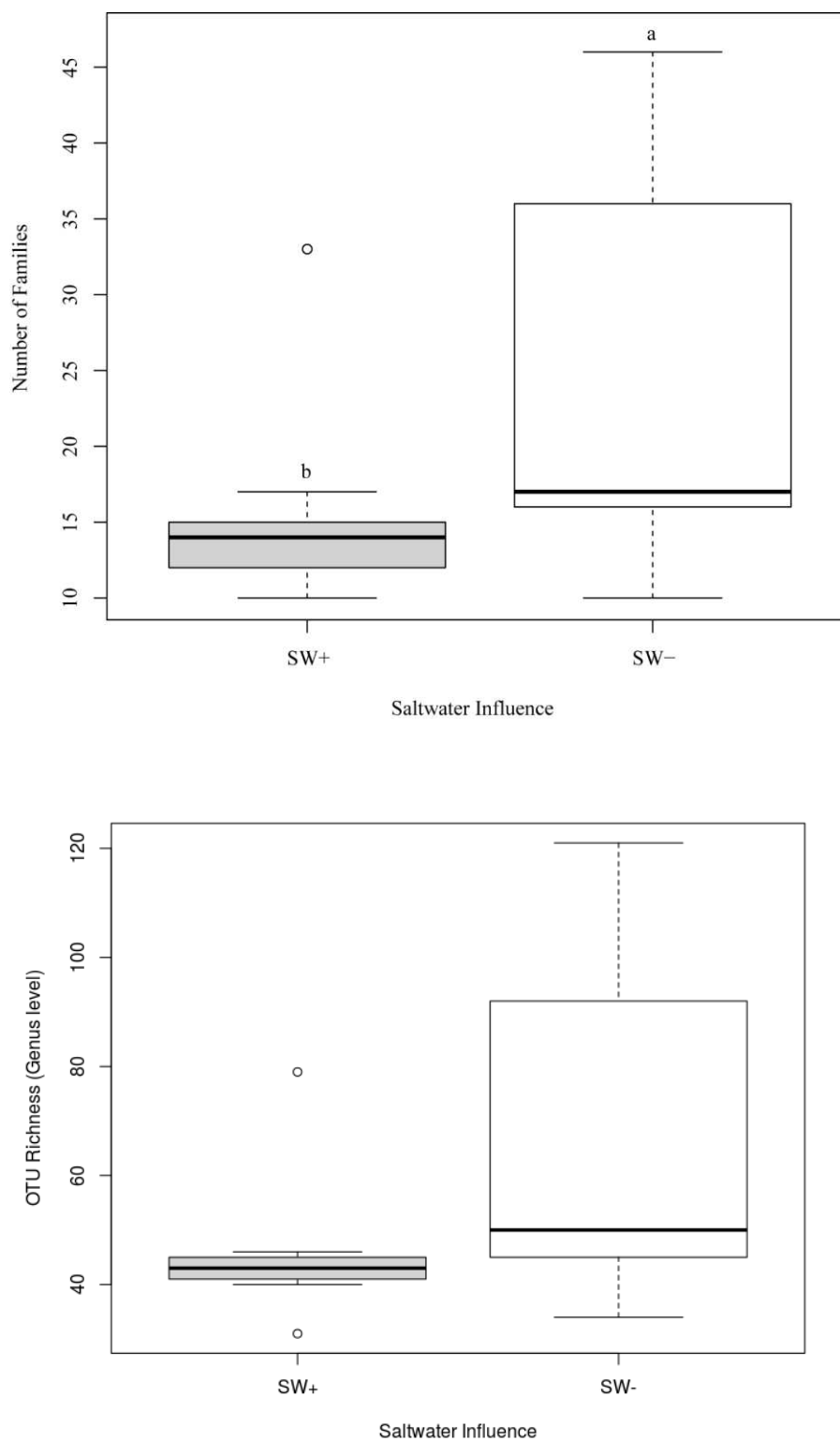


Figure 5 – Impact of saltwater influence / sampling region on family richness within a *Mimosa pigra* nodule. Box-whiskers (medians, 25/75 percentiles and range) followed

by the same letter did not differ between each other according to the Tukey-Kramer test at 5% of probability based on a negative binomial distribution modeling.

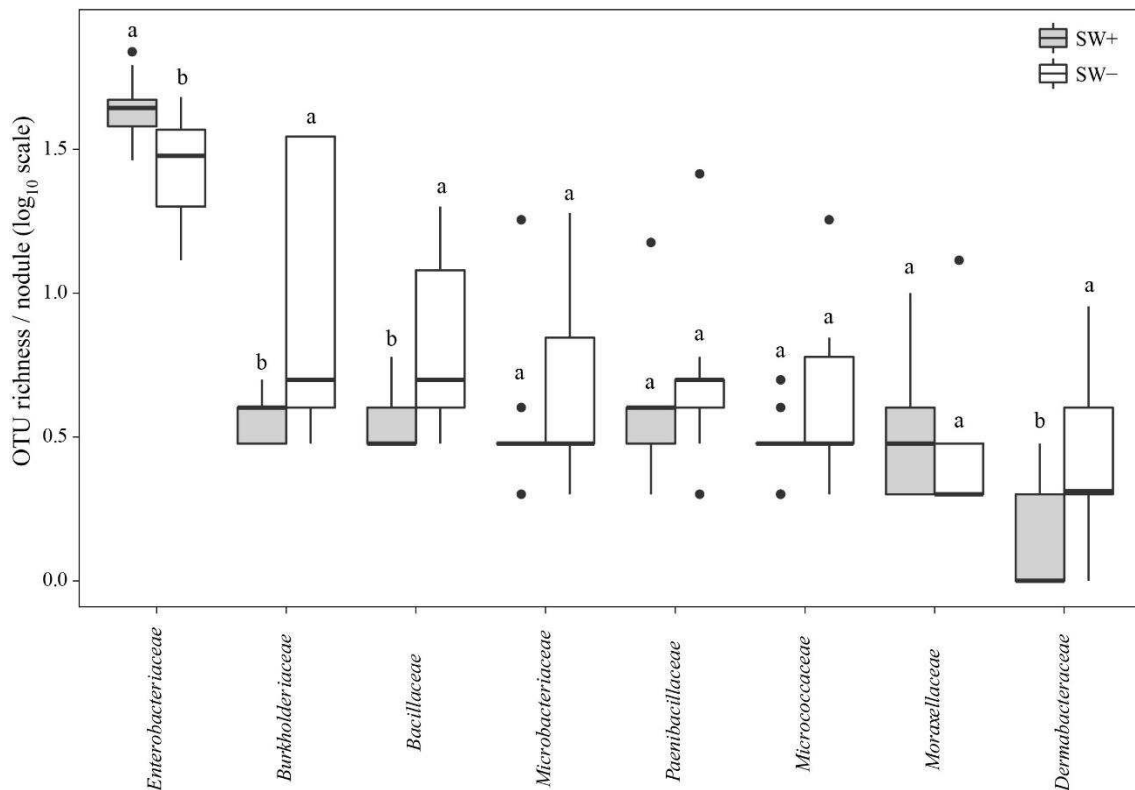


Figure 6 – Impact of saltwater influence / sampling region on OTU richness within the top-eight bacterial families inhabiting *Mimosa pigra* nodules. Box-whiskers (medians, 25/75 percentiles and range) followed by the same letter in each family did not differ between each other according to the Tukey-Kramer test at 5% of probability in a negative binomial distribution modeling.

3.2 Functional structure of bacterial community inhabiting *Mimosa pigra* nodules

Despite the lower overall taxonomic OTU-richness (Figure 3), the lower OTU- richness per family (Figure 5) and the specific effects on key taxonomic groups (Figure 6), the total number of functions contained within the bacterial communities inhabiting

Mimosa pigra nodules did not differ significantly between the two sampling regions (Figure 7).

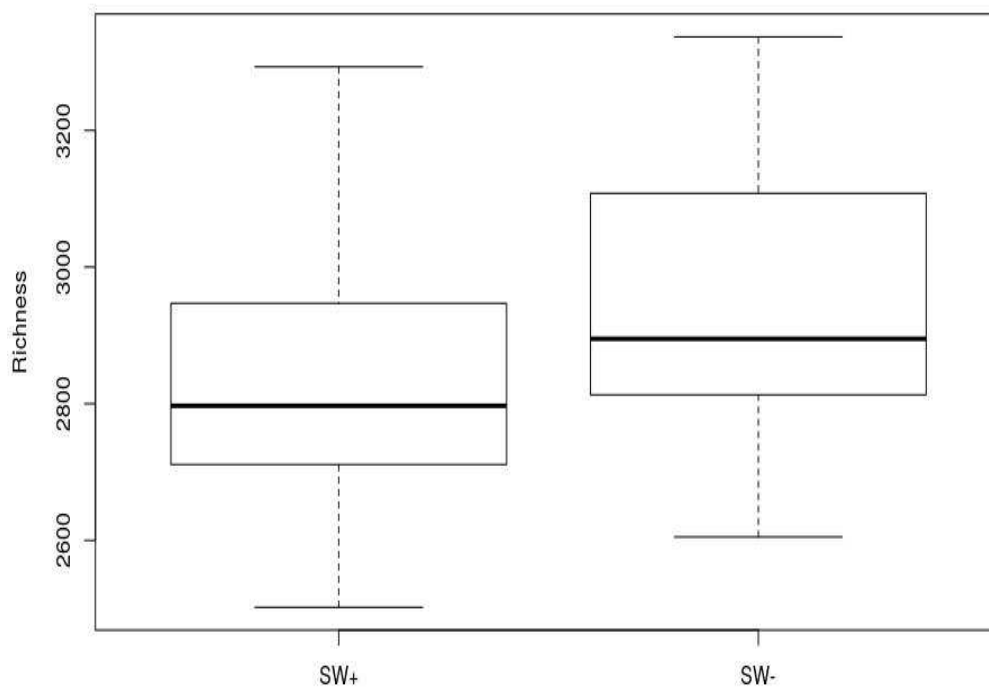


Figure 7 – Total functional richness (number of functional genes within each nodule) of bacterial community inhabiting the nodule of *Mimosa pigra* according to the presence (SW+) or absence (SW-) of saltwater influence for the top 8 bacterial families.

Whereas the exposure to saltwater intrusion did not affect total functional richness between sampling regions, it did affect functional richness on the family-level. Total functional richness was significantly lower in four out of eight families (*Burkholderiaceae*, *Bacillaceae*, *Moraxellaceae* and *Dermabacteraceae*), as opposed to

the unique and significant increase in total functional richness under saltwater intrusion in *Enterobacteriaceae* (Figure 8).

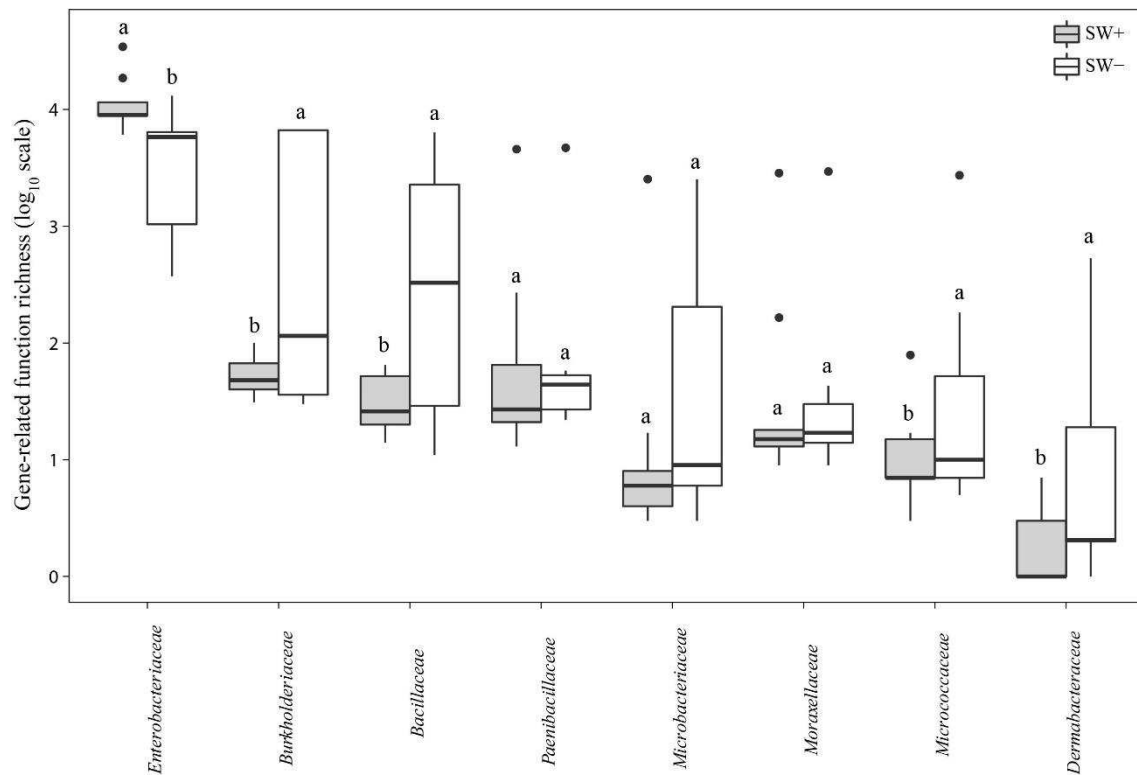


Figure 8 – Impacts of saltwater influence on gene-related functional richness in the top-eight bacterial families inhabiting a *Mimosa pigra* nodule. Box-whiskers (medians, 25/75 percentiles and max-min) followed by the same letter in each family did not differ between each other according to the Tukey-Kramer test at 1% of probability in a negative binomial distribution modeling.

We also evaluated the number of bacterial OTUs inhabiting a *Mimosa pigra* nodule which contained genes related to the biological nitrogen fixation function (nif gene region). Our analysis shown that the SW+ region presented 3 more OTUs capable of inducing nodule formation (Figure 8a), one unclassified *Actinomycetales*, one *Bacillus* and one *Burkholderia*, whereas nodules from the SW+ region presented 21.4% less

bacterial OTUs with these genes (Figure 8b), and three OTUs occurred only in this region (one unclassified *Paenibacillus*, unclassified *Enterobacter*, and one *Escherichia coli*). All 16 functional genes associated with nif (nifA, nifB, nifD, nifE, nifF, nifH, nifJ, nifK, nifN, nifQ, nifT, nifU, nifV, nifW, nifX, and nifZ) and the four functional genes associated with nod (nodB, nodD, nodE, and nodJ) occurred both in SW- and SW+ regions.

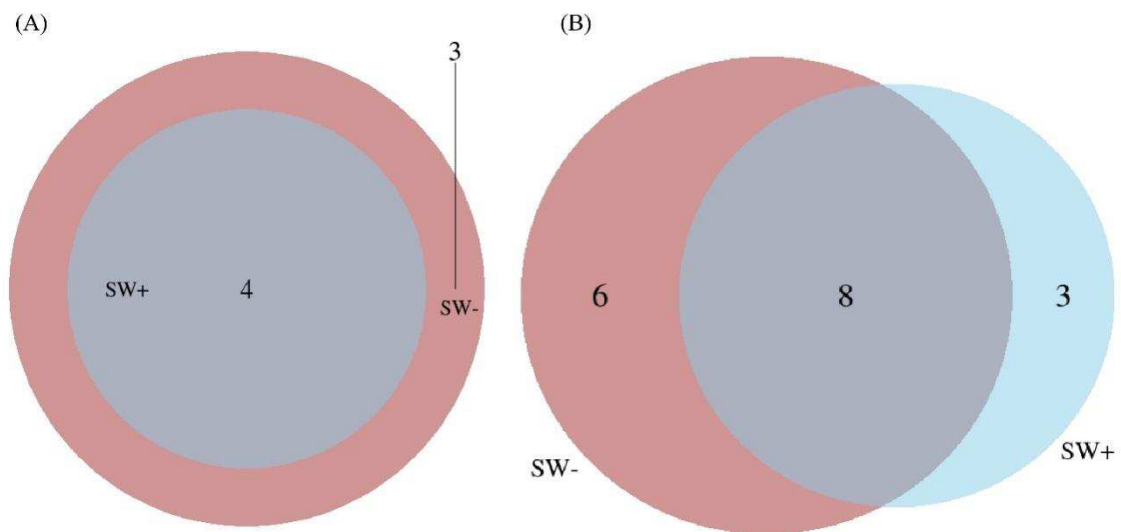


Figure 8 – Venn diagram on the impacts of saltwater intrusion on the number of bacterial OTUs containing (a) nod and (b) nif genes unique in low-salinity (purple) and high-salinity (light blue) environments and shared OTUs (dark blue).

3.3 Impacts of soil environment and geographical distance on bacterial communities in *Mimosa pigra* nodules

Species Distribution Modeling (Figure 9) indicates topsoil Na-content affects the number of OTU inhabiting *Mimosa pigra* nodules in three of the top-eight bacterial

Figure 9. Standardized coefficients for environment-species interactions derived from a generalized linear model (GLM)-LASSO model. Brighter squares show stronger associations than paler ones, significant positive associations are in blue and negative associations in red.

3.4 Co-occurrences of bacteria genera

Figure 10 shows significant both positive (blue) and negative (red) associations between most of the 101 bacteria genera present in our survey. We highlight the general trend of negative residual correlations ($p < 0.05$) between bacteria of the genus *Burkholderia* with most of the found microorganisms inside the nodule, with the exception of just a few positive significant relationships with bacteria belonging to the genera *Tumebacillus*, *Kocuriacuria*, *Arthrobacter* and *Curtobacterium*, as well as two unknown genera. The same pattern occurred with the other rhizobial genus *Mesorhizobium*, but most of the residual relationships were non-significant. We highlight the presence of *Azospirillum* bacteria within the nodule which interacted significantly with non-rhizobial bacteria *Cronobacter*, *Kluyvera*, *Tatumella*, *Variovorax*, *Haliangium* and two unknown bacteria.

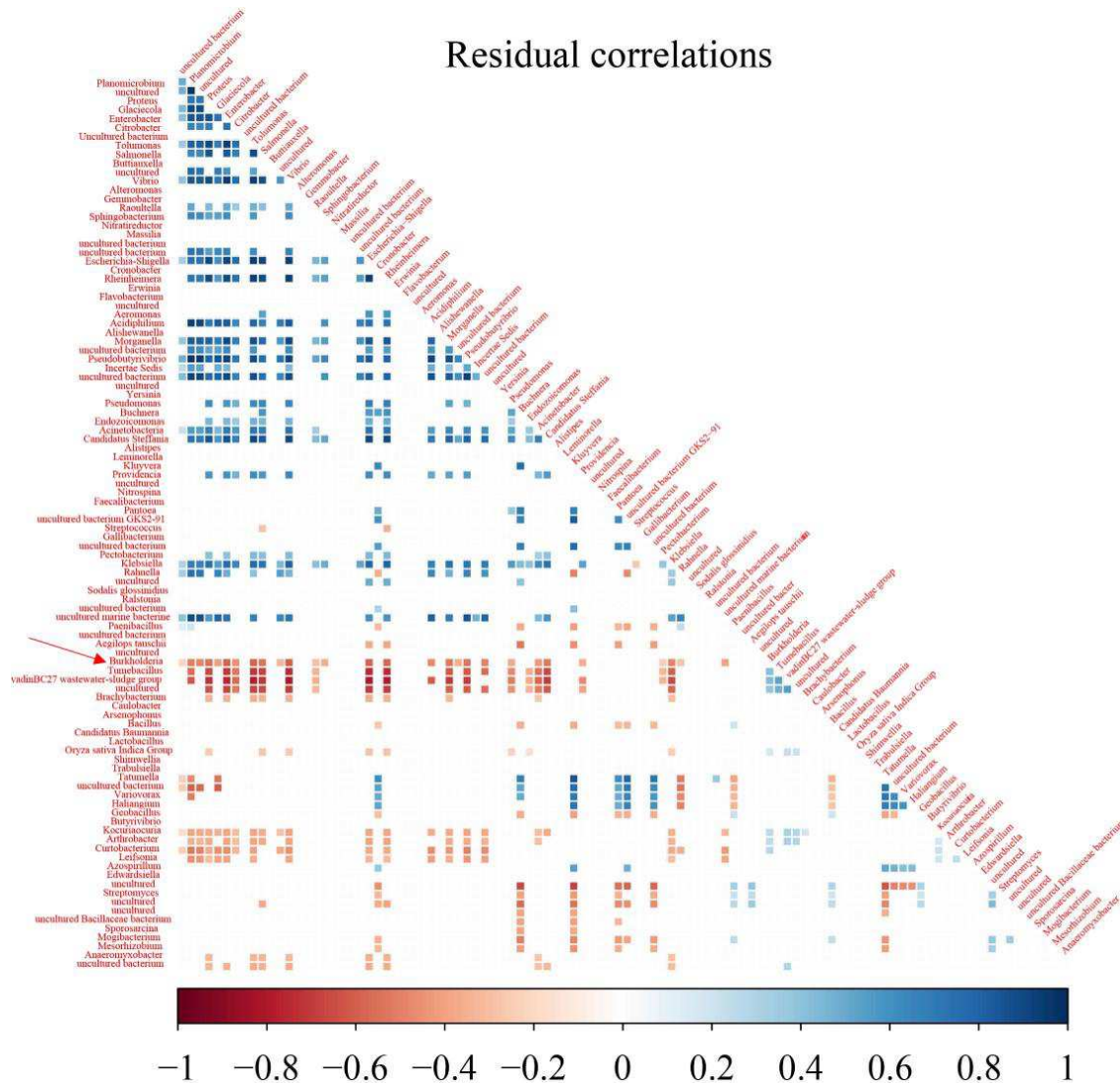


Fig. 10 Residual correlations between nodule bacteria genera inhabiting *Mimosa pigra* nodules. The shades of blue squares represent positive correlations and the shades of red squares represent negative correlations, white squares are non-significant relationships. Significance was tested by 9999 Monte Carlo permutations.

3.5 Taxonomic composition of bacterial communities inhabiting *Mimosa pigra* nodules.

Based on the presence/absence OTU table we evaluate the dissimilarity (binomial distance matrix) between both plants (host-plant repetitions) and nodules

(experimental units). Multiple Factor Analysis (MFA) shows a clear separation between SW+ and SW- plants, and also a distinction in 2 subgroups within SW- (Figure 11A). Figure 11B shows results of Hierarchical Clustering Principal Component (HCPC) analysis. Microbial community variability was strongly reduced under seawater intrusion stress, likely the outcome of the reduced overall OTU richness and the increased dominance of *Enterobacteriaceae* under saltwater stress conditions.

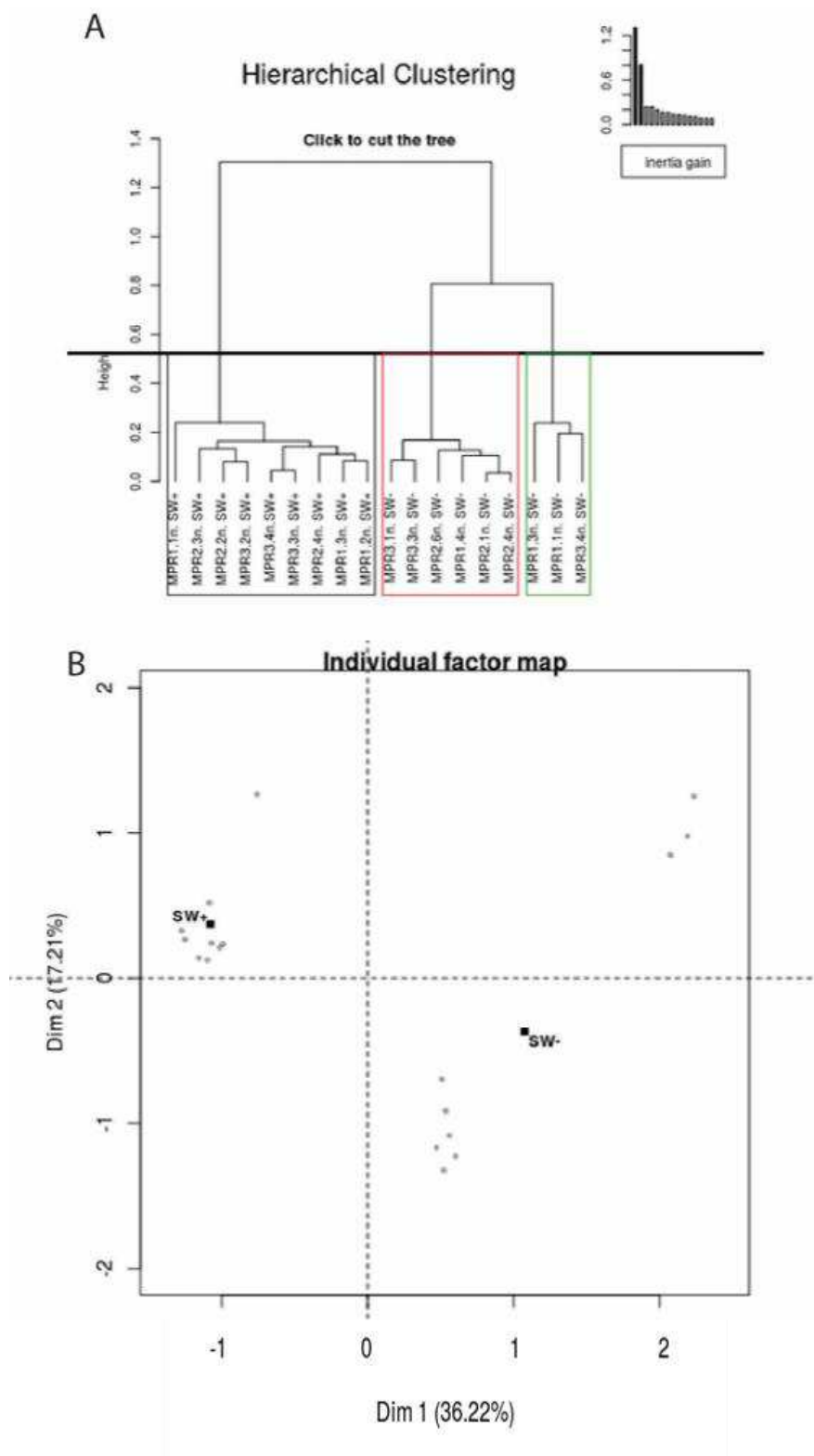


Figure 11 – Hierarchical Clustering (A) of Multiple Factor Analysis, and (B) of microbial community (based on binomial dissimilarity matrix of DIAMOND taxonomy)

inhabiting the nodule of *Mimosa pigra* under conditions with seawater intrusion (SW+) and without seawater intrusion (SW-).

Analysis of variance (based on a binomial model) showed a significant effect of sampling region / saltwater intrusion on the communities inhabiting the nodule of *Mimosa pigra*. Figure 12 shows the presence/absence of the total of 20 OTUs with statistically differing occurrence ($p < 0.05$) between sampling regions, 16 of which with exclusive occurrence in only one of the two regions (Figure 12). Ten OTUs appeared more often within the nodules in the region without seawater intrusion (SW-), namely: *Dermabacteraceae*, *Bacillus megaterium*, *Paenibacillus* sp. TCA20, *Mesorhizobium* unclassified, *Burkholderia oxyphila*, *Burkholderia sacchari*, *Burkholderia* sp. Ch1.1, *Cupriavidus*, *Yersinia rohdei*, *Xanthomonas translucens*. On the other hand, six OTUs occurred statistically ($p < 0.05$) more often within nodules founded in plants living in the region of seawater influence: *Enterobacter cancerogenus* (“*Enterobacter taylorae*”), *Pantoea rodasii*, *Cronobacter dublinensis*, *Pantoea* sp. AS PWVM4, *Serratia marcescens*, *Shigella* unclassified, *Yokenella regensburgei*.

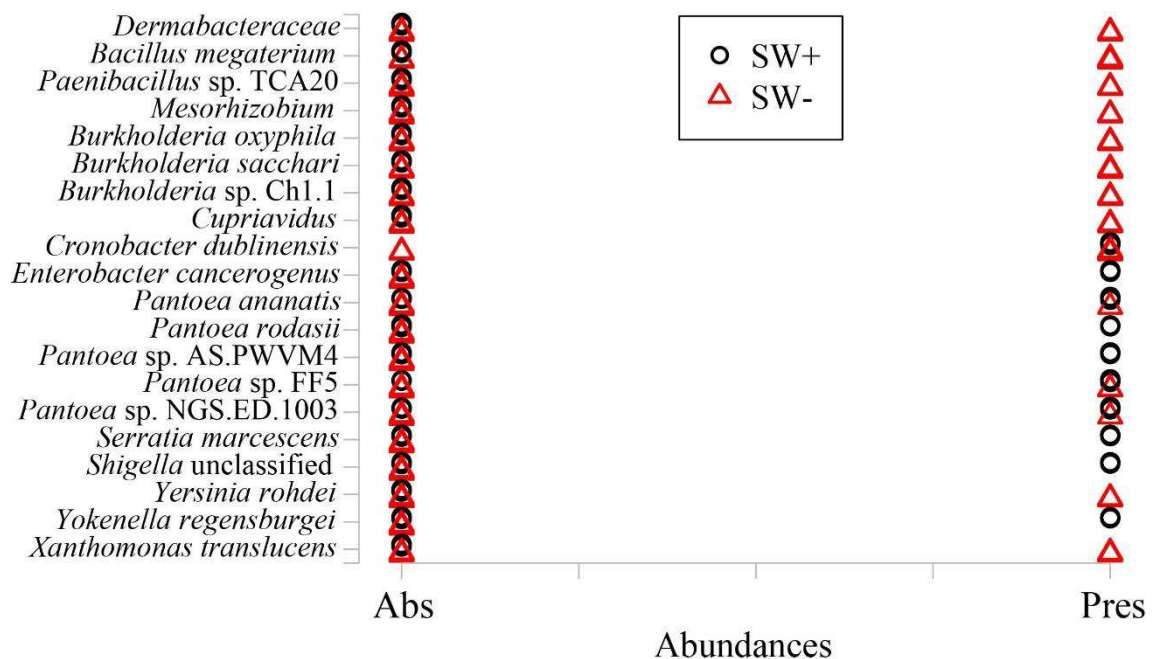


Fig. 12 Bacterial occurrence (presence/absence) in each nodule in regions with (SW+) and without saltwater (SW-) exposure, based on diamond taxonomy alignment, and ordered by significance levels.

We also report the presence of three previously uncultured bacteria that appeared in our samples: unclassified *Dermabacteraceae*, unclassified *Mesorhizobium* and bacteria of the genus *Shigella* with unclassified species.

3.6 Microbial functions of bacterial community inhabiting the nodules

Analysis of variance based on GLM with binomial distribution models reveals that saltwater intrusion affected the microbial community functions ($p < 0.03$). However, the analysis of functions on KEGG database (after false discovery rate correction) presented only five functions significantly affected by seawater intrusion (Figure 13). These five functions limited to SW+ are mainly related with metabolic pathways and antibiotic resistances and largely concentrated in the *Enterobacteriaceae* family.



Fig. 13 Occurrence (presence/absence) of specific bacterial functions (based on KEGG database) in nodules with (SW+) and without (SW-) saltwater exposure.

DISCUSSION

Only 0.97% of the OTUs inhabiting the nodules of riverine *Mimosa pigra* trees belonged to *Rhizobiaceae* and 8.37% to *Burkholderiaceae*, collectively called ‘rhizobia’ (AOKI et al., 2013). Results of our study are in line with previous recent studies, which, despite adopting different and more classic techniques (isolation and sequencing), also reporting on ‘non-rhizobial’ bacteria within nodules of *Hedysarum* in Algeria (BENHIZIA et al., 2004), the Mediterranean plants of *Tetragonolobus*, *Hippocrepis*, *Scorpiurus*, *Psoraleae* and *Ornithopus* (MURESU et al., 2008), and *Arachis* in Argentina (IBÁÑEZ et al., 2009). OTU richness does not reflect either relative bacterial abundances or their specific relevance within the nodules, but our results do support the view that nodule bacterial communities are more diverse and that life within a nodule may be far more complex than previously envisioned.

Total OTU richness was 39.5% smaller in saltwater-stressed nodules as compared to the non-stressed sampling region, variability between host plants and nodules likewise was reduced in SW+. This gives room to the hypothesis that saltwater intrusion into freshwater ecosystems of Amazonian coastal lowlands and elsewhere may cause genetic erosion in nodule communities. We find 17.6% less families and 34% less genera in saltwater-stressed nodule bacteria, as well as profound taxonomic shifts with significantly reduced OTU-richness in four out of the eight predominating families, as opposed to a 48.3% higher OTU richness in *Enterobacteriaceae* and a doubling of its dominance from 26% to 53% of OTU-richness.

In contrast to the strong impacts of salinity-stress on nodule bacteria community composition, we find very little differences in total functional genes present between both sampling regions, suggesting full bacteria functioning in spite of salinity stress, and thus strong functional redundancy between OTU-units. Salinity stress did affect taxonomic distribution of functional richness in four out of the top-eight families (notably Alpha- and Betaproteobacteria), as opposed to overall high functional richness and even significant increase in functional richness in *Enterobacteriaceae*.

According to the stress-gradient hypothesis (SGH), species interactions increase in their importance due to shifts from competition to facilitation with stress (HE; BERTNESS, 2014). Our results might contribute to support this hypothesis, as we report a majority of positive correlations (Figure 10), indicating that the occurrence of some bacteria induce the presence of another. On the other hand, we also observe some consistent negative relationships in OTU richness (possibly the outcome of competition), notably within the genus *Burkholderia* and the *Burkholderiaceae* as a whole, pointing to a low adaptability of this group of bacteria under salinity-stress.

According to BONTEMPS et al. (2010), *Burkholderia* has been found to be the main N₂-fixing symbiont of *Mimosa sp.* worldwide. This genus is phylogenetically distant from the bacteria of the Rhizobiaceae family (alpha-Proteobacteria) and according to ELLIOTT et al. (2009) consist of the most competitive symbiont of *Mimosa* genus, what might indicate that their successful interaction depend primarily on the symbiotic compatibility between them. Our findings confirm the dominance of *Burkholderiaceae* relative to *Alpha-Proteobacteria*, but also suggest that salinity-stress likely affects this position, consequence of a high sensitivity to salinity stress of this family (COENYE, 2014). We discarded the possibility of contamination from outer bacterial community

as we adopted widely accepted standard procedures of nodule research. Therefore, we are confident that we effectively avoided bacteria contamination on the nodule surfaces.

The strong reduction of *Burkholderiaceae* OTUs in nodules under seawater influence is likely compensated by *Enterobacteriaceae* containing both *nod* and *nif* genes. JONES (1982) reported nitrogen-fixing strains of *Enterobacteriaceae* in water and sediment at Lune estuary and BENHIZIA et al. (2004) characterized several bacteria from the *Enterobacteriaceae* family as exclusive occupants of the nodules from the genera *Hedysarum spinosissimum*, *H. pallidum* and *H. carnosum*, wild legume species in the Mediterranean. Contrary to the above, MURESU et al. (2010) claim that this group of bacteria may contain neither *nif* nor *nod* genes, but rather colonizes legume nodules using them as a survival sink or secondary multiplication niche, and even suggest the existence of some virulence associated properties of mammalian pathogens and complex patterns of multiple antibiotic resistance as an evidence of the invasive characteristic of this group. Our study does find five *Enterobacteriaceae* OTU with *nif* and/or *nod* genes, while some OTUs presented genes related to antibiotic resistance (*hfLC*), and also genes involved in the chemotaxis process (*cheB*) (PARKINSON, 1976), that guides the bacterial swimming direction and flagellar rotation, which occurred exclusively in the SW+ region for the *Enterobacter cloacae* indicating a more intensive bacterial mobility in such environment. Moreover, when comparing native species of *Mimosa* with invasive *Mimosa pudica* in India, GEHLOT et al. (2013) found different group of bacteria colonizing the nodules where native *Mimosa* presented alpha-rhizobial symbionts and invasive *Mimosa pudica* hosted mostly beta-rhizobial symbionts (*Cupriavidus* and *Burkholderia*). Further research is needed to clarify whether or not *Enterobacteriaceae* within nodules preferentially originate from

estuarine water/sediment and merely use nodules as a multiplication niche, or whether they form a key component of nodule functioning (BNF and other functions), or both. According to our analysis, the presence of saltwater intrusion interferes in the bacterial community inhabiting the nodule of *Mimosa pigra* where groups of *Enterobacteraceae* might replace their traditional symbiont at both taxonomical and functional levels.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was partially financed by the Research Fund of Maranhão State (FAPEMA) (REBAX-03610/13). We also gratefully acknowledge FAPEMA fellowships to the first two and the fourth authors. Molecular expertise provided by the Dutch research group from the Netherlands Institute of Ecology was possible due to a Science without Borders fellowship of CAPES (PVE A080/2013). We also thank to Raimundo Reginaldo Soares Santos for logistical support and Roberto Lima da Silva for help in field work.

REFERENCES

- ABAIDOO, R.; KEYSER, H.; SINGLETON, P.; DASHIELL, K.; SANGINGA, N. Population size, distribution, and symbiotic characteristics of indigenous Bradyrhizobium spp. that nodulate TGx soybean genotypes in Africa. **Applied Soil Ecology**, v. 35, n. 1, p. 57-67, 2007.
- ABDI, H.; WILLIAMS, L. J.; VALENTIN, D. Multiple factor analysis: principal component analysis for multitable and multiblock data sets. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics**, v. 5, n. 2, p. 149-179, 2013.
- ANDRADE, D.; MURPHY, P.; GILLER, K. The diversity of Phaseolus-nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with Phaseolus vulgaris L. in Brazil. **Applied and Environmental microbiology**, v. 68, n. 8, p. 4025-4034, 2002.

- ANDREWS, M.; HODGE, S.; RAVEN, J. A. Positive plant microbial interactions. **Annals of Applied Biology**, v. 157, n. 3, p. 317-320, 2010.
- ANYANGO, B.; WILSON, K. J.; BEYNON, J. L.; GILLER, K. E. Diversity of Rhizobia Nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in Two Kenyan Soils with Contrasting pHs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 11, p. 4016-4021, 1995.
- AOKI, S.; ITO, M.; IWASAKI, W. From β - to α -Proteobacteria: The Origin and Evolution of Rhizobial Nodulation Genes *nodIJ*. **Molecular Biology and Evolution**, 2013.
- AOKI, S.; ITO, M.; IWASAKI, W. From β - to α -Proteobacteria: The Origin and Evolution of Rhizobial Nodulation Genes *nodIJ*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 11, p. 2494-2508, 2013.
- AUSMEES, N.; JACOBSSON, K.; LINDBERG, M. A unipolarly located, cell-surface-associated agglutinin, *RapA*, belongs to a family of Rhizobium-adhering proteins (*Rap*) in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. **Microbiology**, 2001.
- BALA, A.; GILLER, K. E. Symbiotic specificity of tropical tree rhizobia for host legumes. **New Phytologist**, v. 149, n. 3, p. 495-507, 2001.
- BARRETT, C. F.; PARKER, M. A. Prevalence of *Burkholderia* sp. nodule symbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado Island, Panama. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 57-65, 2005.
- BEILFUSS, R. (2007). Adaptive management of the invasive shrub *Mimosa pigra* at Gorongosa National Park
- BENHIZIA, Y.; BENHIZIA, H.; BENGUEDOUAR, A. Gamma proteobacteria can nodulate legumes of the genus *Hedysarum*. **Systematic and applied ...**, 2004.
- BENHIZIA, Y.; BENHIZIA, H.; BENGUEDOUAR, A.; MURESU, R.; GIACOMINI, A.; SQUARTINI, A. Gamma Proteobacteria Can Nodulate Legumes of the Genus *Hedysarum*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 462-468, 2004.
- BONILLA-ROSSO, G.; EGUIARTE, L. E.; ROMERO, D.; TRAVISANO, M.; SOUZA, V. Understanding microbial community diversity metrics derived from metagenomes: performance evaluation using simulated datasets. **Fems Microbiology Ecology**, p. n/a-n/a, 2012.

- BONTEMPS, C.; ELLIOTT, G. N.; SIMON, M. F.; DOS REIS JÚNIOR, F. B.; GROSS, E.; LAWTON, R. C.; NETO, N. E.; DE FÁTIMA LOUREIRO, M.; DE FARIA, S. M.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K.; YOUNG, J. P. W. Burkholderia species are ancient symbionts of legumes. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 1, p. 44-52, 2010.
- BRAITHWAITE, R. W.; LONSDALE, W.; ESTBERGS, J. Alien vegetation and native biota in tropical Australia: the impact of Mimosa pigra. **Biological conservation**, v. 48, n. 3, p. 189-210, 1989.
- BRAITHWAITE, R. W.; LONSDALE, W. M.; ESTBERGS, J. A. Alien vegetation and native biota in tropical Australia: the impact of Mimosa pigra. **Biological Conservation**, v. 48, n. 3, p. 189-210, 1989.
- BUCHFINK, B.; XIE, C.; HUSON, D. H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. **Nat Meth**, v. 12, n. 1, p. 59-60, 2015.
- CAMPELLO, E. F.; DIAS, L.; MELLO, J. **Sucessão vegetal na recuperação de áreas degradadas**. Viçosa, MG: UFV, 1998, p. 196
- CAMPELLO, E. F. C.; FRANCO, A. A.; FARIA, S. Aspectos ecológicos da seleção de espécies para sistemas agroflorestais e recuperação de áreas degradadas. In: DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005.p. 482.
- CAPORASO, J. G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F. D.; COSTELLO, E. K.; FIERER, N.; PENA, A. G.; GOODRICH, J. K.; GORDON, J. I. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature methods**, v. 7, n. 5, p. 335-336, 2010.
- CARREIRA, J.; VIÑEGLA, B.; GARCÍA-RUIZ, R.; OCHOA, V.; HINOJOSA, M. Recovery of biochemical functionality in polluted flood-plain soils: The role of microhabitat differentiation through revegetation and rehabilitation of the river dynamics. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2088-2097, 2008.
- CAZENAVE, A.; DIENG, H.-B.; MEYSSIGNAC, B.; VON SCHUCKMANN, K.; DECHARME, B.; BERTHIER, E. The rate of sea-level rise. **Nature Clim. Change**, v. 4, n. 5, p. 358-361, 2014.
- CHEN, W.-M.; JAMES, E. K.; CHOU, J.-H.; SHEU, S.-Y.; YANG, S.-Z.; SPRENT, J. I. β -Rhizobia from Mimosa pigra, a newly discovered invasive plant in Taiwan. **New Phytologist**, v. 168, n. 3, p. 661-675, 2005.
- COENYE, T. The Family Burkholderiaceae. In: E. Rosenberg; E. F. DeLong; S. Lory; E. Stackebrandt; F. Thompson. **The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and**

- Betaproteobacteria**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014.p. 759-776.
- CRESPI, M.; GÁLVEZ, S. Molecular mechanisms in root nodule development. **Journal of plant growth regulation**, v. 19, n. 2, p. 155-166, 2000.
- DE, B.; DE FREITAS, A.; BORGES, W.; DE ANDRADE, M.; DE SAMPAIO, E.; DE E SANTOS, C.; PASSOS, S.; XAVIER, G.; MULATO, B.; DO DE LYRA, M. Characteristics of nodule bacteria from *Mimosa* spp grown in soils of the Brazilian semiarid region. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 8, p. 788-796, 2014.
- DHARMENDER, K.; PRAGATI, J.; KRITIKA, G. Recent trends in characterization of microbial diversity from environment: a review. **Acta Agriculturae Serbica**, v. 17, n. 33, p. 31-46, 2012.
- DOMMARGUES, Y. Nitrogen fixation by trees in relation to soil nitrogen economy. **Fertilizer Research**, v. 42, n. 1-3, p. 215-230, 1995.
- DOYLE, J. J. Phylogenetic Perspectives on the Origins of Nodulation. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 11, p. 1289-1295, 2011.
- EHRHARDT-BROCARD, N. C. M.; STOCCO, P.; TRAMONTIN, A. L.; OLIVEIRA FILHO, L. C. I.; SANTOS, J. C. P. Diversidade Cultural, Morfológica E Genética De Diazotróficos Isolados De Nódulos De Bracatinga. **Revista Árvore**, v. 39, n. 5, p. 923-933, 2015.
- ELLIOTT, G. N.; CHOU, J.-H.; CHEN, W.-M.; BLOEMBERG, G. V.; BONTEMPS, C.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; VELÁZQUEZ, E.; YOUNG, J. P. W.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. Burkholderia spp. are the most competitive symbionts of *Mimosa*, particularly under N-limited conditions. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 762-778, 2009.
- GAGE, D. J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 2004.
- GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. The road map to the manual. In: **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology** Springer, 2001.p. 166.
- GEHLOT, H. S.; TAK, N.; KAUSHIK, M.; MITRA, S.; CHEN, W.-M.; POWELEIT, N.; PANWAR, D.; POONAR, N.; PARIHAR, R.; TAK, A.; SANKHLA, I. S.; OJHA, A.; RAO, S. R.; SIMON, M. F.; REIS JUNIOR, F. B. D.; PERIGOLO, N.; TRIPATHI, A. K.; SPRENT, J. I.; YOUNG, J. P. W.; JAMES, E. K.;

- GYANESHWAR, P. An invasive Mimosa in India does not adopt the symbionts of its native relatives. **Annals of Botany**, v. 112, n. 1, p. 179-196, 2013.
- GUEYE, M.; CISSE, M.; NDOYE, F.; NOBA, K. Invasive dynamics of Mimosa pigra in context of the hydrological variability in Senegal. **Journal of Animal and Plant Sciences (JAPS)**, v. 26, n. 1, p. 4023-4035, 2015.
- HAFEEZ, F. Y.; ASLAM, Z.; MALIK, K. A. Effect of salinity and inoculation on growth, nitrogen fixation and nutrient uptake of Vigna radiata (L.) Wilczek. **Plant and Soil**, v. 106, n. 1, p. 3-8, 1988.
- HE, Q.; BERTNESS, M. D. Extreme stresses, niches, and positive species interactions along stress gradients. **Ecology**, v. 95, n. 6, p. 1437-1443, 2014.
- IAC. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas, 2001,
- IBÁÑEZ, F.; ANGELINI, J.; TAURIAN, T.; TONELLI, M. L. Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic Gammaproteobacteria. **Systematic and applied ...**, 2009.
- IBÁÑEZ, F.; ANGELINI, J.; TAURIAN, T.; TONELLI, M. L.; FABRA, A. Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic Gammaproteobacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 49-55, 2009.
- IPCC. **Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 2013, p. 1535
- JONES, K. Salinity-tolerant nitrogen-fixing Enterobacteriaceae in the lüne estuary. **Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie**, v. 3, n. 4, p. 513-518, 1982.
- JOSHI, N.; FASS, J. Sickle: a sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files. **Available from: github.com/najoshi/sickle**, 2011.
- KANEHISA, M.; ARAKI, M.; GOTO, S.; HATTORI, M.; HIRAKAWA, M.; ITOH, M.; KATAYAMA, T.; KAWASHIMA, S.; OKUDA, S.; TOKIMATSU, T.; YAMANISHI, Y. KEGG for linking genomes to life and the environment. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. suppl 1, p. D480-D484, 2008.

- KIERSI, E. T.; DENISON, R. F. Sanctions, cooperation, and the stability of plant-rhizosphere mutualisms. **Annual review of ecology, evolution, and systematics**, p. 215-236, 2008.
- KIRK, J. L.; BEAUDETTE, L. A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J. N.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, n. 2, p. 169-188, 2004.
- KISAND, V.; VALENTE, A.; LAHM, A.; TANET, G.; LETTIERI, T. Phylogenetic and Functional Metagenomic Profiling for Assessing Microbial Biodiversity in Environmental Monitoring. **Plos One**, v. 7, n. 8, p. e43630, 2012.
- KLUTE, A.; CAMPBELL, G. S.; NIELSEN, D. R.; JACKSON, R. D.; MORTLAND, M. N. **Methods of soil analysis – Physical and mineralogical methods**. Madison, WI, 1986, p. 1088 p
- KÖSTER, J.; RAHMANN, S. Snakemake—a scalable bioinformatics workflow engine. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2520-2522, 2012.
- KREIBICH, H.; KERN, J. Nitrogen fixation and denitrification in a floodplain forest near Manaus, Brazil. **Hydrological Processes**, v. 17, n. 7, p. 1431-1441, 2003.
- LACERDA, D. M. A.; FIGUEIREDO, P. D. Restauração de matas ciliares do rio Mearim no município de Barra do Corda-MA: seleção de espécies e comparação de metodologias de reflorestamento. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 2, p. 295-304, 2009.
- LAMBAIS, M.; CURY, J.; MALUCHE-BARETTA, C.; BULL, R.; VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L.; COOPER, M.; SILVA, A.; CARDOSO, E. Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. In: P. A. Vidal-Torrado, LRF; Cooper, M. **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: Minas Gerais: Sociedade Brasileira do Solo, 2005.p. 43-84.
- LAUTER, D.; MUNNS, D.; CLARKIN, K. Salt response of chickpea as influenced by N supply. **Agronomy Journal**, v. 73, n. 6, p. 961-966, 1981.
- LÊ, S.; JOSSE, J.; HUSSON, F. FactoMineR: an R package for multivariate analysis. **Journal of statistical software**, v. 25, n. 1, p. 1-18, 2008.
- LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the World**, 2005,

- LINDSTRÖM, K.; MURWIRA, M.; WILLEMS, A.; ALTIER, N. The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 6, p. 453-463, 2010.
- LOWE, S.; BROWNE, M.; BOUDJELAS, S.; POORTER, D. M. 100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database. **100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database**, 2000.
- LUQUE, G. M.; BELLARD, C.; BERTELSMEIER, C.; BONNAUD, E. The 100th of the world's worst invasive alien species. **Biological ...**, 2014.
- LUQUE, G. M.; BELLARD, C.; BERTELSMEIER, C.; BONNAUD, E.; GENOVESI, P.; SIMBERLOFF, D.; COURCHAMP, F. The 100th of the world's worst invasive alien species. **Biological Invasions**, v. 16, n. 5, p. 981-985, 2014.
- MACEDO, M. O.; RESENDE, A. S.; GARCIA, P. C.; BODDEY, R. M.; JANTALIA, C. P.; URQUIAGA, S.; CAMPELLO, E. F. C.; FRANCO, A. A. Changes in soil C and N stocks and nutrient dynamics 13 years after recovery of degraded land using leguminous nitrogen-fixing trees. **Forest Ecology and Management**, v. 255, n. 5-6, p. 1516-1524, 2008.
- MANCHANDA, G.; GARG, N. Salinity and its effects on the functional biology of legumes. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 5, p. 595-618, 2008.
- MARCHIORI, J. N. C.; DOS SANTOS MACHADO, P. F. Anatomia do lenho em espécies sul-brasileiras da série Stipellares Benth.(Mimosa L.–Fabaceae). 1– Fundamentos de taxonomia e anatomia da madeira. **Balduinia**, n. 51, p. 25-31, 2016.
- MARTINELLI, L.; VICTORIA, R.; TRIVELIN, P.; DEVOL, A.; RICHEY, J. 15N natural abundance in plants of the Amazon river floodplain and potential atmospheric N₂ fixation. **Oecologia**, v. 90, n. 4, p. 591-596, 1992.
- MATSUDA, A.; DE SOUZA MOREIRA, F. M.; SIQUEIRA, J. O. Tolerância de rizóbios de diferentes procedências ao zinco, cobre e cádmio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 3, p. 343-355, 2002.
- MCDONALD, D.; CLEMENTE, J. C.; KUCZYNSKI, J.; RIDEOUT, J. R.; STOMBAUGH, J.; WENDEL, D.; WILKE, A.; HUSE, S.; HUFNAGLE, J.; MEYER, F. The Biological Observation Matrix (BIOM) format or: how I learned to stop worrying and love the ome-ome. **GigaScience**, v. 1, n. 1, p. 7, 2012.

- MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61217, 2013.
- MIRANSARI, M.; SMITH, D. L. Overcoming the Stressful Effects of Salinity and Acidity on Soybean Nodulation and Yields Using Signal Molecule Genistein Under Field Conditions. **Journal of Plant Nutrition**, v. 30, n. 12, p. 1967-1992, 2007.
- MOURA, E. G. **Agroambientes de transição entre o trópico úmido e semi-árido maranhense**. São Luís: UEMA, 2004,
- MPEPEREKI, S.; JAVAHERI, F.; DAVIS, P.; GILLER, K. Soyabeans and sustainable agriculture: promiscuous soyabeans in southern Africa. **Field Crops Research**, v. 65, n. 2, p. 137-149, 2000.
- MURESU, R.; MADDAU, G.; DELOGU, G.; CAPPUCINELLI, P.; SQUARTINI, A. Bacteria colonizing root nodules of wild legumes exhibit virulence-associated properties of mammalian pathogens. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 97, n. 2, p. 143-153, 2010.
- MURESU, R.; POLONE, E.; SULAS, L.; BALDAN, B.; TONDELLO, A.; DELOGU, G.; CAPPUCINELLI, P.; ALBERGHINI, S.; BENHIZIA, Y.; BENHIZIA, H.; BENGUEDOUAR, A.; MORI, B.; CALAMASSI, R.; DAZZO, F. B.; SQUARTINI, A. Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 63, n. 3, p. 383-400, 2008.
- NAKAMURA, F.; SHIN, N.; INAHARA, S. Shifting mosaic in maintaining diversity of floodplain tree species in the northern temperate zone of Japan. **Forest Ecology and Management**, v. 241, n. 1, p. 28-38, 2007.
- NICHOLLS, R. J.; CAZENAVE, A. Sea-level rise and its impact on coastal zones. **Science**, v. 328, n. 5985, p. 1517-1520, 2010.
- ONDOV, B. D.; BERGMAN, N. H.; PHILLIPPY, A. M. Interactive metagenomic visualization in a Web browser. **BMC Bioinformatics**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2011.
- OSBORNE, M. R.; PRESNELL, B.; TURLACH, B. A. On the LASSO and its Dual. **Journal of Computational and Graphical Statistics**, v. 9, n. 2, p. 319-337, 2000.

- PARIDA, A. K.; DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 60, n. 3, p. 324-349, 2005.
- PARKINSON, J. S. cheA, cheB, and cheC genes of Escherichia coli and their role in chemotaxis. **Journal of Bacteriology**, v. 126, n. 2, p. 758-770, 1976.
- PEABODY, M. A.; VAN ROSSUM, T.; LO, R.; BRINKMAN, F. S. L. Evaluation of shotgun metagenomics sequence classification methods using in silico and in vitro simulated communities. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 1-19, 2015.
- PERRET, X.; STAEHELIN, C.; BROUGHTON, W. J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 1, p. 180-201, 2000.
- POLLOCK, L. J.; TINGLEY, R.; MORRIS, W. K.; GOLDING, N.; O'HARA, R. B.; PARRIS, K. M.; VESK, P. A.; MCCARTHY, M. A. Understanding co-occurrence by modelling species simultaneously with a Joint Species Distribution Model (JSDM). **Methods in Ecology and Evolution**, v. 5, n. 5, p. 397-406, 2014.
- PUNTA, M.; COGGILL, P. C.; EBERHARDT, R. Y.; MISTRY, J.; TATE, J.; BOURSNEILL, C.; PANG, N.; FORSLUND, K.; CERIC, G.; CLEMENTS, J.; HEGER, A.; HOLM, L.; SONNHAMMER, E. L. L.; EDDY, S. R.; BATEMAN, A.; FINN, R. D. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. D290-D301, 2012.
- QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590-D596, 2013.
- RIJAL, S.; COCHARD, R. Invasion of Mimosa pigra on the cultivated Mekong River floodplains near Kratie, Cambodia: farmers' coping strategies, perceptions, and outlooks. **Regional Environmental Change**, v. 16, n. 3, p. 681-693, 2016.
- RODRIGUES, R. R.; DE FREITAS LEITÃO FILHO, H.; LIMA, M. I. R.; KON, S. **Matas ciliares: conservação e recuperação**. Universidade São Paulo: São Paulo, 2000.
- ROGNES, T.; MAHÉ, F.; FLOURI, T.; IJAZ, U.; NICHOLS, B.; QUINCE, C. (2016). Vsearch.
- SANTANA, M. A.; PIHAKASKI-MAUNSBACH, K.; SANDAL, N.; MARCKER, K. A.; SMITH, A. G. Evidence that the Plant Host Synthesizes the Heme Moiety of

Leghemoglobin in Root Nodules. **Plant Physiology**, v. 116, n. 4, p. 1259-1269, 1998.

SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F. **Rep-PCR mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer-assisted phylogenetic pattern analysis**. Kluwer Academic Publishers, 1996, p. 174

SEBURANGA, J.; KAPLIN, B.; BIZURU, E.; MWAVU, E. The folk biology of South American-native shrub, *Mimosa pigra* L.[Leguminosae] and its invasive success in Rwanda. **Int J Biodivers Conserv**, v. 5, p. 486-497, 2013.

SIMON, M. F.; GREYER, R.; DE QUEIROZ, L. P.; SÄRKINEN, T. E.; DUTRA, V. F.; HUGHES, C. E. The evolutionary history of *Mimosa* (Leguminosae): toward a phylogeny of the sensitive plants. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 7, p. 1201-1221, 2011.

SOLOMON, M.; GEDALOVICH, E.; MAYER, A.; POLJAKOFF-MAYBER, A. Changes induced by salinity to the anatomy and morphology of excised pea roots in culture. **Annals of Botany**, v. 57, n. 6, p. 811-818, 1986.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. **Handbook for rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology**, 2012,

SOUZA MOREIRA, F.; SILVA, M. F.; SÉRGIO MIANA, F. Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region of Brazil. **New Phytologist**, v. 121, n. 4, p. 563-570, 1992.

SPENCER, T.; SCHUERCH, M.; NICHOLLS, R. J.; HINKEL, J.; LINCKE, D.; VAFEIDIS, A. T.; REEF, R.; MCFADDEN, L.; BROWN, S. Global coastal wetland change under sea-level rise and related stresses: The DIVA Wetland Change Model. **Global and Planetary Change**, v. 139, p. 15-30, 2016.

SPRENT, J. I. Bacteria nodulating legumes. In: **Legume Nodulation: A Global Perspective** Wiley Online Library, 2009.p. 45-78.

SPRENT, J. I. Evolution of Nodulation. In: **Legume Nodulation** Wiley-Blackwell, 2009.p. 51-63.

SPRENT, J. I.; GARDENS, R. B. **Nodulation in legumes**. Kew : Royal Botanic Gardens, 2001,

STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C.; RUNJANEK, N. G.; BORGES, W. L.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. Diversidade de rizóbios capazes de nodular

leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias (Agrária)**, v. 2, n. 4, p. 249-256, 2015.

STOWERS, M. D. Carbon metabolism in Rhizobium species. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 89-108, 1985.

TU, J. C. EFFECT OF SALINITY ON RHIZOBIUM-ROOT-HAIR INTERACTION, NODULATION AND GROWTH OF SOYBEAN. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 61, n. 2, p. 231-239, 1981.

USDA, S. S. S. **Keys to Soil Taxonomy**. Washington, DC, 2010,

WALKLEY, A.; BLACK, I. A. An Examination of the Degtjareff Method for Determining Soil Organic Matter, and A Proposed Modification of the Chromic Acid Titration Method. **Soil Science**, v. 37, n. 1, p. 29-38, 1934.

WANG, Y.; NAUMANN, U.; WRIGHT, S. T.; WARTON, D. I. mvabund– an R package for model-based analysis of multivariate abundance data. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 3, n. 3, p. 471-474, 2012.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WOOD, D. E.; SALZBERG, S. L. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. **Genome Biology**, v. 15, n. 3, p. 1-12, 2014.

XU, L.; ZHANG, Y.; WANG, L.; CHEN, W.; WEI, G. Diversity of endophytic bacteria associated with nodules of two indigenous legumes at different altitudes of the Qilian Mountains in China. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 457-465, 2014.

ZAHARAN, H. Conditions for successful Rhizobium-legume symbiosis in saline environments. **Biology and Fertility of Soils**, v. 12, n. 1, p. 73-80, 1991.

ZGADZAJ, R.; JAMES, E. K.; KELLY, S.; KAWAHARADA, Y.; DE JONGE, N.; JENSEN, D. B.; MADSEN, L. H.; RADUTOIU, S. A legume genetic framework controls infection of nodules by symbiotic and endophytic bacteria. **PLoS Genet**, v. 11, n. 6, p. e1005280, 2015.

