



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR)**

**BACTÉRIAS DO ABDÔMEN DE FORMIGAS CORTADEIRAS (SUBTRIBO
ATTINA): CULTIVO, SEQUENCIAMENTO E FISIOLOGIA**

RENATA DE OLIVEIRA AQUINO ZANI

Rio Claro - SP
Dez - 2020



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR)**

**BACTÉRIAS DO ABDÔMEN DE FORMIGAS CORTADEIRAS (SUBTRIBO
ATTINA): CULTIVO, SEQUENCIAMENTO E FISIOLOGIA**

RENATA DE OLIVEIRA AQUINO ZANI

Orientador: Prof. Dr. Maurício Bacci Júnior

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas (Área: Biologia Celular e Molecular).

Rio Claro - SP
Dez -2020

Z31b

Zani, Renata de Oliveira Aquino

Bactérias do abdômen de formigas cortadeiras (subtribo attina):
cultivo, sequenciamento e fisiologia / Renata de Oliveira Aquino Zani.

-- Rio Claro, 2020

82 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Mauricio Bacci Junior

1. Biologia Molecular. 2. Alphaproteobacteria. 3. Mollicutes. 4.
nifH. 5. gene 16S rRNA. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

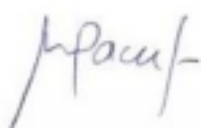
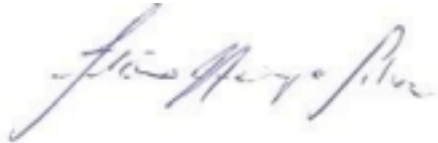
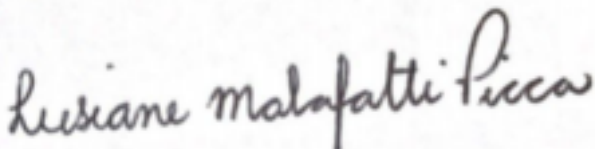
TÍTULO DA TESE: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DO ABDÔMEN DE FORMIGAS CORTADEIRAS (TRIBO ATTINI): CULTIVO, SEQUENCIAMENTO, MORFOLOGIA E FISILOGIA

AUTORA: RENATA DE OLIVEIRA AQUINO ZANI

ORIENTADOR: MAURÍCIO BACCI JÚNIOR

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão

Examinadora:

 Prof(a). Dr(a). Mauricio Bacci Junior CEIS / IB Rio Claro	 Prof(a). Dr(a). Flavio Henrique da Silva Departamento de Genética e Evolução / Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR
 Prof(a). Dr(a). André Rodrigues Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro	 Prof(a). Dr(a). Henrique Ferreira Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro
 Prof(a). Dr(a). Lusiane Malafatti Picca Universidade Paulista	

Título alterado para: "BACTÉRIAS DO ABDÔMEN DE FORMIGAS CORTADEIRAS (SUBTRIBO ATTINA): CULTIVO, SEQUENCIAMENTO E FISILOGIA"

Rio Claro, 16 de dezembro de 2020.

Dedico a Minha Família

AGRADECIMENTOS

Início os agradecimentos às pessoas que me deram toda base e estrutura durante as etapas cumpridas, ao incentivo, os ensinamentos e a sabedoria nas palavras. Agradeço ao meu querido pai (**Luis Aquino**) que tenho como modelo de superação de vida, às vezes frágil, às vezes incrivelmente forte. À minha tão amada mãe (**Elisabete Aquino**) a quem tenho como ícone de amor, carinho, dedicação. A quem sempre esteve nos bastidores de todas as minhas cenas. À minha irmã **Roberta**, por nossos momentos de descontração e cumplicidade. Muito obrigada por tudo, amo vocês demais.

Ao meu marido **Marcelo**, que em todos os momentos esteve presente, ele mais do que ninguém sabe de todos os desafios que passei durante este trajeto. O quanto chorei, o quanto duvidei de mim, mas também o quanto aprendi ao longo do caminho. Dedico grande parte desde projeto a você, querido.

Obrigada a minha querida tia **Marilda**, tia **Márcia** e a minha avó **Diva**, que sempre acreditaram e apoiaram essa jornada acadêmica desde o início.

Agradeço todos os dias a Deus por tê-los ao meu lado.

Agradeço a oportunidade de ter ingressado na Pós-Graduação. Foi uma caminhada com muitas transformações e desafios. Confesso que houve momentos em que me questioneei sobre o porquê deste propósito, porém procurei cumpri-lo da melhor maneira possível. Aos poucos compreendi minha maneira de ver e fazer ciência.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP - Campus Rio Claro, pela estrutura e apoio. Ao Programa de Pós-Graduação, à **Ivana Brandt** e em especial ao **Felipe Guimarães**, que sempre sanaram minhas dúvidas relacionadas aos documentos e prazos a serem cumpridos. Meu muito Obrigada.

Agradeço imensamente ao meu orientador prof. **Mauricio Bacci Jr**, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa. Agradeço por toda confiança e ensinamentos.

Aos professores **André Rodrigues**, **Mario Palma**, **Fernando Pagnocca**, **Flavio Henrique Silva**, **Henrique Ferreira**, **Douglas Domingues** e **Maria Ap. Marin**, pela ajuda, direta ou indiretamente, durante etapas deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”. Agradeço imensamente.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos 2017/04824-9 e 2019/03746-0.

Aos colegas **Sergio** (Miagui), **Mariana Lyra**, **Thiago**, **Daiane**, **Quimi**, **Maria**, **Rodolfo**, **Franco** e **Beto**, que estiveram presentes, dividindo seus conhecimentos e/ou compartilhando bons momentos de descontração.

À **Bibiana**, que se tornou uma amiga de ideias, conhecimento e ótimas tardes de café com bolo. Obrigada!

À **Corina**, que compartilhou comigo os mesmos prazos, as mesmas etapas cumpridas, os mesmos simpósios e disciplinas. Estamos no fim desta etapa. Obrigada pelos momentos de descontração, pelos almoços, cafés da tarde. Nunca esquecerei o seu jeitinho todos especial de me chamar de Ré.

Em especial à minha amiga *Milene Ferro*. Amiga esta, com tantas coisas em comum (paixão pelos gatos, loucura das compras, viagens, maridos ciclistas, comidas gostosas e boas conversas). Obrigada por ouvir as minhas confissões e reclamações. Obrigada por tirar minhas dúvidas e me ajudar na etapa mais importante de conclusão deste projeto. Parte dele tem muita dedicação sua também. Não sei como passaria por tudo isso sem o seu apoio.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus,
não sou o que era antes”.

Marthin Luther King.

RESUMO

Interações entre insetos e microrganismos são comuns na natureza. As formigas pertencentes à tribo Attini interagem com uma complexa comunidade de microrganismos, alguns mediando a nutrição das formigas, outros causando infecções e outros protegendo as formigas de tais infecções. Além do fungo basidiomiceto mutualístico obrigatório que medeia a nutrição das formigas, procariotos Diazotróficos das Ordens Enterobacteriales presentes no jardim de fungos e Rhizobiales intestinais foram propostos por mediar a incorporação de nitrogênio atmosférico em proteínas de formigas. Entomoplasmatales também foram propostos para alimentar o metabolismo energético das formigas com acetato. Assim, as cortadoras de folhas parecem depender de uma comunidade microbiana para acessar os carbonos e o nitrogênio necessários à produção de milhões de indivíduos encontrados em uma única colônia. No presente trabalho, utilizamos técnicas independentes de cultivo assim como isolamento em meios de cultura para analisar microrganismos presentes nos abdomens de formigas do gênero *Atta* e *Acromyrmex*. Para abordagem independente de cultivo analisamos a classificação taxonômica dos amplicons gerados pelo sequenciamento de nova geração (NGS) das regiões V3 e V4 do gene ribossomal 16S bacteriano, que revelaram a diversidade na composição das comunidades bacterianas. Já em cultura encontramos três novos candidatos a parceiros, isolando frequentemente Rhizobiales, Burkholderiales e Pseudomonadales fixadores de nitrogênio quase idênticos do abdômen de diferentes gêneros e espécies de formigas cortadeiras. Esses isolados continham o gene *nif* e apresentaram capacidade de crescer em meios de cultivo a partir de nitrogênio molecular. Esses resultados apontam para múltiplas estratégias de nutrição de formigas para acessar o nitrogênio atmosférico. Este estudo destaca a importância das comunidades bacterianas associadas a formigas e fornece bases para estudos futuros sobre processos ecológicos que impulsionam o sucesso de formigas cultivadoras de fungos.

PALAVRAS-CHAVE Attini, Alphaproteobacteria, diversidade microbiana, Mollicutes, *nif*H, gene 16S rRNA.

ABSTRACT

Interactions between insects and microorganisms are common in nature. Ants belonging to Attini tribe interact with a complex community of microorganisms, some mediating ants nutrition, others causing infections and others protecting ants from such infections. In addition to mandatory mutualistic basidiomycete fungus that mediates nutrition of ants, Diazotrophic prokaryotes from Enterobacterial Orders present in fungal garden and intestinal Rhizobiales have been proposed to mediate incorporation of atmospheric nitrogen into ant proteins. Entomoplasmatales have also been proposed to feed ants energy metabolism with acetate. Thus, leaf cutters seem to depend on a microbial community to access carbons and nitrogen needed to produce millions of individuals found in single colony. In present work, we used independent cultivation techniques as well isolation in culture media from of ants abdomen of *Atta* and *Acromyrmex* genera. For culture-independent approach, we analyzed taxonomic classification of amplicons generated by Next Generation Sequencing (NGS) of V3 and V4 regions of bacterial 16S ribosomal gene, which revealed the diversity in composition of bacterial communities. In culture, we found three new candidates for partners, often isolating Rhizobiales, Burkholderiales or Pseudomonadales nitrogen fixers almost identical to abdomen of leaf-cutting ants. These results point to multiple nutrition strategies for ants with atmospheric nitrogen. This study highlights importance of bacterial communities associated with ants and provides basis for future studies on ecological processes that drive success of fungus-growing ants.

KEYWORDS Attini, Alphaproteobacteria, microbial diversity, Mollicutes, *nifH*, 16S rRNA gene.

Sumário

PARTE 1

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Simbiose em insetos	17
2.2 As formigas Attina.....	17
2.3 As Formigas Attina e suas associações mutualísticas	18
2.4 Principais bactérias encontradas em formigas.....	21
2.5 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)	24
2.6 Análise de diversidade microbiana através de técnicas dependentes e independentes de cultivo.	27
2.6.1 A dificuldade do cultivo <i>in vitro</i>	28
2.7 Sequenciamento de DNA	28
2.7.1 Gene 16S rRNA	29
3. OBJETIVOS	31

PARTE 2

Abstract	32
1. INTRODUCTION	34
2. MATERIAL AND METHODS.....	35
2.1 Collection and identification of ants	36
2.2 Sanitization of ant samples	36
2.3 DNA extraction, 16S libraries preparation, read preprocessing and diversity analyses	36
2.4 Dominant bacterial genera shared within ant species	37
2.5 Bacterial isolation	37
2.6 Molecular identification of bacterial isolates	38
2.7 PCR amplification of the <i>nifH</i> gene	38
2.8 Analysis of nitrogen fixation	39
2.9 Comparison between isolated colonies and 16S rRNA libraries	39
2.10 Comparison of 16S rRNA libraries with 16S sequences from leafcutter symbionts	39
3. RESULTS.....	40
3.1 Species identification	40
3.2 Sequencing of 16S libraries	40
3.3 Rarefaction and PCoA Analyses	40
3.4 Bacterial diversity	42
3.5 Taxonomic classification based on 16S rRNA libraries	44
3.6 Shared bacterial taxonomic genera	44

3.7 Comparing 16S rRNA libraries with 16S sequences from leafcutter symbionts	45
3.8 Molecular and physiological analysis of bacterial isolates	46
4. DISCUSSION	48
Data accessibility	53
Acknowledgements	54
Funding	54
REFERENCES	54
Supporting information.....	61
PARTE 3	
CONCLUSÃO.....	64
ANEXOS	65
BIBLIOGRAFIA CITADA	70

Lista de Figura

PARTE 1

Figura 1. Associação mutualística entre microrganismos e insetos	17
Figura 2. Filogenia das formigas Attini e os tipos de agricultura	20
Figura 3. Reação realizada pela enzima nitrogenase	25
Figura 4. Estrutura do complexo Nitrogenase	26
Figura 5. Gene 16S rRNA desenhado com base na sequência de <i>E.coli</i>	30
Figura 6. Diagrama de Venn relacionando a diferenciação taxonômica baseada nas regiões V3, V4 e V6 baseados nos filos detectados nas sequências disponíveis em bancos de dados.....	30

PARTE 2

Figure 1. Rarefaction curve	41
Figure 2. Principal coordinate analysis (PCoA) based on bacterial genus associated with ant species.....	41
Figure 3. Taxonomic classification based on bacterial genus associated with the ants	44
Figure 4. Venn diagrams showing shared or exclusive bacterial genera found in ant samples. <i>Liberibacter</i> , <i>Terasakiella</i> , <i>Bartonella</i> and <i>Rhodovulum</i> predominated within the 54 genera shared by sanitized samples; <i>Liberibacter</i> , <i>Bartonella</i> , <i>Terasakiella</i> , <i>Rodovulum</i> and <i>Wolbachia</i> predominated within the 69 shared genera in non-sanitized samples	45

PARTE 3 – ANEXOS

Figura 1. Espécies de formigas <i>Atta</i> e <i>Acromyrmex</i> utilizadas para estudos de associações bacterianas	65
Figura 2. Localizações de coleta para <i>Atta</i> e <i>Acromyrmex</i> na cidade de Rio Claro.....	65
Figura 3. Localização de coleta para <i>Atta laevigata</i> na cidade de Itirapina.....	66
Figura 4. Microrganismos cultivados em placa de petri nos meios YMA e DIGS e seus respectivos esfregaços corados pela técnica de Gram	67
Figura 5. Fixação de nitrogênio observada pela formação da película em NFb	69

LISTA DE TABELAS

PARTE 1

Tabela 1. Sistemas de agricultura (ou fungicultura), de acordo com a afiliação filogenética dos fungos mutualistas	19
---	----

PARTE 2

Table 1. Bacteria identified in the leafcutter abdomen by 16S sequencing or isolation methods. # Read %: percentage of library reads mapped on a given 16S sanger read as obtained by BOWTIE2	43
--	----

Table S1. Number and percentage of sequences in bacterial genera found in all sanitized ant samples. <i>Liberibacter</i> , <i>Terasakiella</i> , <i>Bartonella</i> and <i>Rhodovulum</i> corresponded to 98.11% of sequences	61
---	----

Table S2. Number and percentage of sequences in bacterial genera found in all not sanitized ant samples. <i>Liberibacter</i> , <i>Bartonella</i> , <i>Terasakiella</i> , <i>Rhodovulum</i> and <i>Wolbachia</i> corresponded to 97.65% of sequences	62
--	----

Table S3. Frequency of bacterial genera isolate in ant species. (RC) = Rio Claro and (IT) = Itirapina	63
--	----

PARTE 3

Tabela 1. Meios de cultura utilizados para crescimento de microrganismos (DIGS) e meio teste para fixação de nitrogênio (NFb)	66
--	----

Tabela 2. Condições para reações de PCR e Sequenciamento	69
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- *A. laevigata* – *Atta laevigata*
- *A. sexdens* – *Atta sexdens*
- *A. rugosus* – *Acromyrmex rugosus*
- *A. coronatus* – *Acromyrmex coronatus*
- ATP - Adenosina trifosfato
- % - por cento
- °C - graus Celsius
- CaCl₂ – Cloreto de cálcio
- COI / COII - genes que codificam as subunidades I e II da citocromo oxidase
- CuSO₄ – Sulfato de Cobre
- BLAST- *Basic Local Alignment Search Tool* (Ferramenta de busca de alinhamento local básica)
- DNA - Ácido desoxirribonucléico
- EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
- *E.coli* – *Eschericia coli*
- FBN – Fixação Biológica de Nitrogênio
- Fe - Ferro
- GenBank - *Genetic Sequence Database*
- H₂O – Água
- HCl – Ácido Clorídrico
- H₃BO₃ – Ácido Bórico
- H₂SO₄ – Ácido sulfúrico
- KOH - Hidróxido de potássio
- K₂HPO₄ – Fosfato dipotassico
- L- Litros
- M - Molar
- m – Metros
- min - minutos
- mL – mililitro
- MgSO₄ - Sulfato de magnésio
- MoFe - Proteína molibdênio-ferro
- Mn – Manganês
- NCBI - *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional de Informação Biotecnológica)
- ng – nanogramas
- N₂ - Azoto atmosférico
- NaCl – Cloreto de Sódio
- NaOH – Hidróxido de Sódio
- Na₂MoO₄ – Molibdato de Sódio

- MnSO_4 – Sulfato de Manganês
- NH_3 - Amônia
- NH_4^+ - Íon amônio
- OTU - *Operational Taxonomic Unit* (Unidade taxonômica operacional)
- pb - Pares de bases
- PCoA - Análise de coordenadas principais
- PCR - *Polimerase Chain Reaction* (Reação da Polimerase em Cadeia)
- pH – potencial hidrogênio iônico
- RDP - *Ribosomal Database project*
- RNA – Ácido ribonucleico
- rpm – rotações por minuto
- q.s.p – quantidade suficiente para
- rRNA Ácido ribonucleico ribossômico
- SDS – Dodecil sulfato de sódio
- Tris - Hidroximetil) Aminometano
- μM – micro molar
- YMA – yeast extract mannitol medium
- ZnSO_4 – Sulfato de Zinco

PARTÉ 1

1. INTRODUÇÃO

Formigas cortadeiras, ou seja, aquelas nos gêneros *Atta* ou *Acromyrmex* são conhecidas como saúvas e quenquéns, respectivamente, e apresentam um notável sucesso ecológico, colonizando uma vasta área geográfica no continente americano. Seu comportamento especializado e organização social as tornam modelos de estudo notáveis (RABELING; BROWN; VERHAAGH, 2008). Por serem importantes herbívoros, podem ser consideradas como pragas, podendo causar danos irreversíveis e até a morte para as plantas (ZANETTI et al., 2014).

O sucesso ecológico dessas formigas depende da associação com microrganismos, sendo que a associação primária ocorre quando usam matéria vegetal para cultivar um fungo basidiomiceto mutualístico conhecido como *Leucoagaricus gongylophorus*. O fungo cresce sobre o material vegetal, produzindo hifas e gongilídeos dentro dos ninhos em um sistema semelhante a fermentação, denominado “jardim de fungos”. Este fungo medeia parte da nutrição de formigas pela hidrólise dos polissacarídeos vegetais (QUINLAN; CHERRETT; 1979; SILVA et al., 2003; SOMERA et al., 2015).

Além do fungo mutualístico, bactérias diazotróficas (capazes de fixar nitrogênio atmosférico) também podem contribuir para a dieta das formigas, potencialmente mediando a assimilação do nitrogênio. É o caso de Enterobacterales que vivem no jardim de fungos (PINTO-TOMAS et al., 2009) e Rhizobiales que vivem no intestino de formigas (SAPOUNTZIS et al., 2015; ZHUKOVA et al., 2017).

Finalmente, tanto Entomoplasmatales intracelulares quanto extracelulares que vivem no intestino foram propostos suplementar a dieta das formigas com acetato, fornecendo energia extra para a produção em larga escala, de biomassa das formigas cortadeiras em comparação com outras formigas atíneas desprovidas deste simbiote (SAPOUNTZIS et al., 2018).

Na presente investigação, analisamos por meio de técnicas de Nova Geração, utilizando MiSeq Illumina para região V3-V4 do gene 16S rRNA, bactérias associadas ao abdômen de formigas cortadeiras e descobrimos que Rhizobiales sempre foram o grupo

bacteriano dominante, o que é compatível com uma função mutualística obrigatória. Encontramos também Entomoplasmales que, dependendo da espécie, podem dominar ou estar ausentes em colônias gigantes de formigas saudáveis, assemelhando-se a uma associação parasitária ou comensal fortuita. Além disso, o gênero *Rhodovulum* (Rhodobacterales) e o gênero *Wolbachia* (Rickettsiales) também foram frequentemente encontrados em grandes quantidades relativas.

Também acompanhamos quatro colônias de formigas cortadeiras por 24 meses (*Atta laevigatta*, *Atta sexdens*, *Acromyrmex rugosus* e *Acromyrmex coronatus*), isolando periodicamente representantes bacterianos do seu abdômen, e frequentemente encontramos diazotróficos quase idênticos nos gêneros *Ralstonia* (Burkholderiales) e *Methylobacterium* (Rhizobiales). Esses isolados provavelmente vivem fortemente aderidos ao corpo das formigas e são novos candidatos à integração da comunidade mutualística microbiana, facilitando o acesso das formigas ao nitrogênio atmosférico e outras funções.

A presente Tese foi redigida detalhando os aspectos mencionados acima e, para tanto, foi estruturada em três partes:

- **Parte 1.** Parte introdutória escrita em língua portuguesa, composta por resumo, palavras-chave, Introdução, Revisão da literatura e Objetivos.
- **Parte 2.** Consiste em um artigo (submetido) oriundo da Tese, escrito em língua inglesa, intitulado: New diazotrophic bacteria possibly mediating leaf-cutter ant nutrition on atmospheric nitrogen.
- **Parte 3.** Parte final escrita em língua portuguesa contendo as conclusões e anexos.

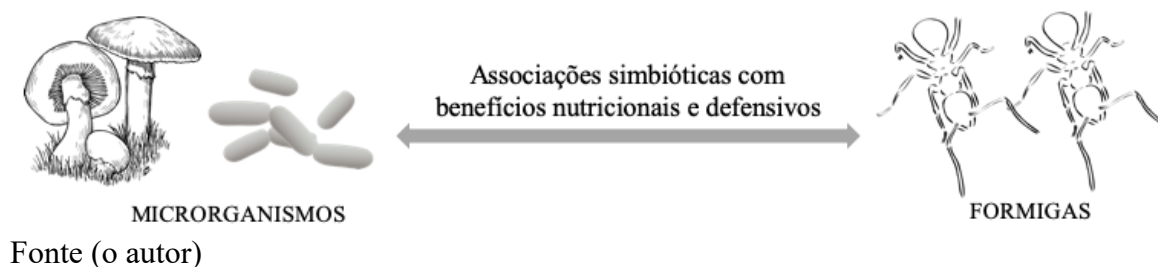
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Simbiose em insetos

A simbiose foi inicialmente definida por Anton de Bary e é um termo usado para descrever a “convivência” a longo prazo entre espécies distintas (BARY, 1879). Frequentemente, o parceiro menor é chamado de simbiote, já o parceiro maior é chamado de hospedeiro. O efeito do simbiote no hospedeiro irá definir o tipo de relação simbiótica. Três formas de simbiose são reconhecidas: mutualismo (relação entre indivíduos de espécies diferentes, em que ambos são beneficiados), comensalismo (associação entre indivíduos em que um deles se aproveita dos restos alimentares do outro sem prejudicá-lo) e parasitismo (relação desarmônica em que um deles é o parasita beneficiário vivendo dentro ou sobre o corpo hospedeiro) (LOPES; ROSSO, 2010).

Microorganismos simbiotes de insetos podem incluir bactérias, fungos e outros eucariontes unicelulares, podendo afetar seu hospedeiro de diferentes maneiras ao longo do tempo ou em resposta ao ambiente, por exemplo, protegendo seus insetos hospedeiros contra patógenos, sintetizando toxinas ou modificando o sistema imunológico do inseto, além de contribuir para a nutrição, especialmente fornecendo aminoácidos essenciais, vitaminas e, no caso de parceiros fúngicos, esteroides (NASIR; NODA, 2003; DOUGLAS, 2015; SAPOUNTZIS *et al.*, 2015; PALUDO *et al.*, 2018; Figura 1).

Figura 1. Associação mutualística entre microrganismos e insetos.



2.2 As Formigas da Subtribo Attina

As formigas apresentam grande sucesso ecológico e possuem ampla distribuição geográfica (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Elas estão distribuídas em 326 gêneros, 16

subfamílias e 13.094 espécies (BOLTON, 2015). Trazem como característica o seu comportamento especializado, organização social e sucesso evolutivo que as levam a ser um modelo de estudo em muitas áreas (RABELING; BROWN; VERHAAGH, 2008). As formigas da Subtribo Attini ocorrem em 18 gêneros (*Acromyrmex*, *Amoimyrmex*, *Apterostigma*, *Atta*, *Cyphomyrmex*, *Kalathomyrmex*, *Mycetagroicus*, *Mycetarotes*, *Mycetomoellerius*, *Mycetophylax*, *Mycetosoritis*, *Mycocepurus*, *Myrmicocrypta*, *Paramycetophylax*, *Paratrachymyrmex*, *Pseudoatta*, *Sericomyrmex* e *Trachymyrmex*) e mais de 250 espécies válidas (BOLTON, 2015; SOLOMON, *et al.*, 2019; CRISTIANO *et al.*, 2020).

As colônias destas formigas são extremamente eficientes na prevenção contra infecções por patógenos, devido a sua organização social associada com o seu comportamento higiênico. Suas glândulas mandibulares são capazes de secretar substâncias antifúngicas e antibióticas (LIMA-MENDONÇA *et al.*, 2009), assim como sua cavidade infrabucal é capaz de filtrar e neutralizar partículas (DELLA *et al.*, 2014). Assim, é um desafio para os patógenos colonizarem este ambiente.

2.3 As Formigas da Subtribo Attina e suas associações mutualísticas

Vários microrganismos já são conhecidos por apresentarem relações com insetos, podem estar presentes tanto interna quando externamente e manter ou não relações complexas com este hospedeiro (ALVES, 1998). Muitos insetos desenvolveram associações simbióticas com fungos. Os cultivadores mais antigos são os besouros *Platypodinae ambrosia* (SMITH *et al.*, 2018). Mais tarde as formigas attíneas e os cupins também desenvolveram essa prática, porém em larga escala (SCHULTZ; BRADY, 2008; NYGAARD *et al.*, 2016), embora seus jardins de fungos sejam estruturados de maneira bastante diferenciada (MUELLER *et al.*, 2005).

A maioria das espécies da tribo Attini cultiva fungos pertencentes aos gêneros *Leucoagaricus* e *Leucocoprinus*, da tribo *Leucocoprineae*, e um pequeno grupo cultiva fungos pertencentes à Família *Pterulaceae* (SCHULTZ; MEIER, 1995; SCHULTZ; BRADY, 2008). As attíneas utilizam os jardins de fungos como fonte de nutrientes e enzimas (WEBER, 1972; DE SIQUEIRA *et al.*, 1998; CURRIE, 2001; SILVA *et al.*, 2003). Nestas associações mutualísticas entre insetos e fungos, ocorrem adaptações que facilitam a

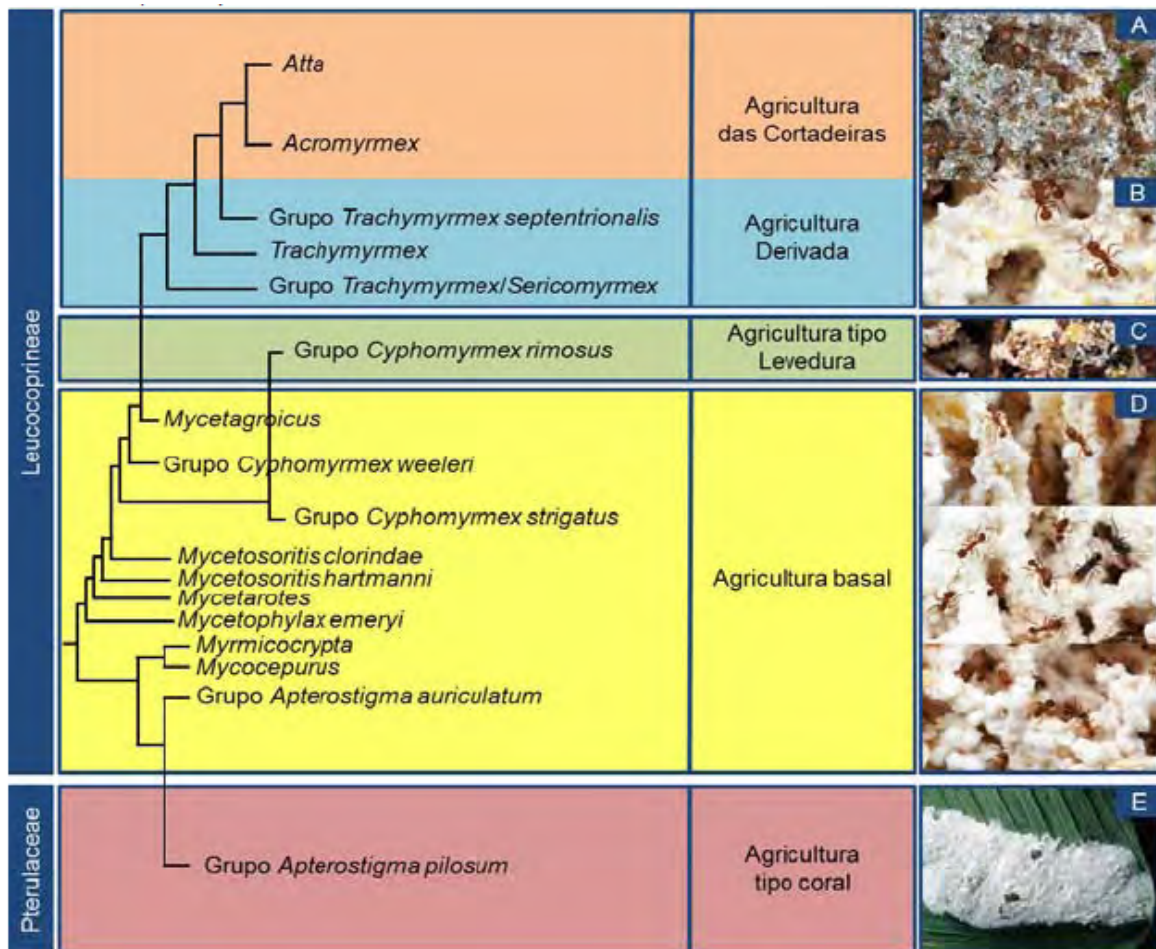
perpetuação da associação e promovem relações de interdependência. Os insetos se beneficiam pela aquisição de alimento (micofagia, produtos da digestão fúngica dos polissacarídeos vegetais) e os fungos recebem um ambiente adequado para o seu desenvolvimento e propagação (MARTIN, 1992; SILVA *et al.*, 2003; SCHULTZ; BRADY, 2008).

As attíneas divergiram em duas principais linhagens, Paleoattini e Neoattini (SCHULTZ; BRADY, 2008), de acordo com estudos baseados em sequências de genes nucleares e mitocondriais, bem como na morfologia das larvas (SCHULTZ; MEIER, 1995). Cinco sistemas de agricultura (ou fungicultura), de acordo com a afiliação filogenética dos fungos mutualistas, estão distribuídos entre as duas principais linhagens da tribo Attini (Tabela 1), (Figura 2).

Tabela 1. Filogenia das formigas Attineas e os cinco tipos de agricultura.

Tabela 1 – Sistemas de agricultura (ou fungicultura), de acordo com a afiliação filogenética dos fungos mutualistas (SCHULTZ; BRADY, 2008)

1	Agricultura basal	Abrange a maior parte dos gêneros de Attini. Cultivam diversas espécies de basidiomicetos da tribo Leucocoprineae.
2	Agricultura de fungos corais	Cultivo de fungos Pterulaceae por algumas espécies do grupo <i>Apterostigma pilosum</i> , em um clado derivado dentro do gênero <i>Apterostigma</i> .
3	Agricultura de leveduras	Cultivo de fungos da tribo Leucocoprineae por espécies do grupo <i>Cyphomyrmexrimosus</i> , em um clado derivado dentro do gênero <i>Cyphomyrmex</i> .
4	Agricultura derivada	Praticado por mais de 60 espécies de formigas não cortadeiras mais derivadas, as quais cultivam fungos pertencentes à tribo Leucocoprineae.
5	Agricultura das cortadeiras	Apresenta o cultivo de uma única espécie fúngica, <i>Leucoagaricus gongylophorus</i> , que é incapaz de viver fora do mutualismo com as attíneas. Esta agricultura é praticada pelas formigas <i>Atta</i> e <i>Acromyrmex</i> , conhecidas como cortadeiras.

Figura 2. Os tipos de agricultura das Attíneas

Os tipos de agricultura estão separados por retângulos coloridos e são definidos por grupos filogeneticamente distintos dos cultivares de fungos associados às attíneas. (A) Agricultura das cortadeiras: jardim de fungo de *Atta* (WILD, 2001); (B) Agricultura derivada: jardim de fungo de *Trachymyrmex* (WILD, 2001); (C) Agricultura tipo levedura: jardim de fungo de *Cyphomyrmex* WILD, 2001); (D) Agricultura basal: jardins de fungo de *Mycocepurus*, *Mycetarotes*, *Cyphomyrmex* (WILD, 2001); (E) Agricultura fungos *Pterulaceae*: jardim de fungo de *Apterostigma* (SCHULTZ; BRADY, 2008). Figura adaptada (MEHDIABADI; SCHULTZ, 2010).

As Formigas attíneas e suas associações mutualísticas também trazem benefícios atuando nos ecossistemas primários e secundários e servem como fonte de alimento para uma grande diversidade de espécies animais. Podem ser descritas também como agentes de aeração do solo, renovação e transformação da biomassa vegetal, além de serem considerados agentes de polinização (RICO-GRAY, 1980; UKAN, 2011).

Além dos fungos mutualistas, bactérias podem se associar à superfície externa das formigas, aderindo à sua cutícula, ou internamente, na hemolinfa, no intestino, dentro de

células ou estruturas especializadas (FELDHAAR; GROSS, 2009; KIKUCHI, 2009). Dentre os benefícios apresentados, o fator nutricional tem sido a principal função atribuída a estas bactérias simbiotes, pois elas são capazes de sintetizar aminoácidos essenciais ao hospedeiro (LATORRE *et al.*, 2005), fixar nitrogênio (ZIENTZ *et al.*, 2005; SAPOUNTZIS *et al.*, 2015), biossintetizar cofatores e vitaminas (AKMAN *et al.*, 2002) e produzir enzimas que auxiliam na digestão do alimento ingerido (DILLON; DILLON, 2004; JANSON *et al.*, 2008). Além do fator nutricional, estudos supõem a presença de bactérias contidas em espécie de formigas cortadeiras relacionando efeitos fisiológicos e comportamentais, como por exemplo produção de pirazina associadas ao feromônio de trilha (SILVA-JUNIOR *et al.*, 2018), efeitos também identificado em *Drosophila* e sua capacidade de escolha de parceiros e dinâmica de acasalamento (RINGO *et al.*, 2011; ARBUTHNOTT *et al.*, 2016; MORIMOTO *et al.*, 2017).

Por serem consideradas pragas, devido ao fato de cortarem material vegetal fresco, ocasionando danos muitas vezes irreversíveis para as plantas (DELLA *et al.*, 2014; ZANETTI *et al.*, 2014), as formigas cortadeiras, ou seja, aquelas nos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*, possuem importância econômica. A utilização extensiva de folhas, caules e flores frescas é realizada para a manutenção de seus fungos mutualistas, considerados o alimento de larvas e rainhas (MARICONI, 1970; AMANTE, 1972). Além da fonte de nutrientes para o fungo, microrganismos podem ser vetorizados para dentro do ninho das formigas através do material coletado, podendo estabelecer diversas relações simbióticas.

2.4 Principais bactérias encontradas em formigas

Diversas bactérias já foram relatadas associadas a formigas inteiras (CAFARO *et al.*, 2011, LIBERTI *et al.*, 2015; RAMALHO *et al.*, 2017; RONQUE *et al.*, 2020) ou partes de formigas, como hemolinfa (TUFTS; BEXTINE, 2009), tórax e abdome (MEIRELLES, 2016), trato digestivo (BILLEN; BUSCHINGER, 2000; VAN BORM *et al.*, 2002; SAPOUNTZIS *et al.*, 2015; RUSSELL; SANDERS; MOREAU, 2017; VIEIRA *et al.*, 2017; HU *et al.*, 2018). Nos tecidos contidos no interior do abdome, a incidência bacteriana, provavelmente ocorre por ser um local rico em nutrientes e possibilitar a colonização por diversos grupos de microrganismos (RAJAGOPAL, 2009). A diversidade bacteriana desse

ambiente está relacionada, entre outros fatores, com o pH, potencial redox, enzimas digestivas presentes no intestino e o tipo de alimento ingerido (DILLON; DILLON, 2004).

Além das pesquisas descreverem microrganismos e associações a formigas cortadeiras, seus jardins de fungos também têm sido associados a bactérias, como por exemplo, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* e *Pantoea* (PINTO-TOMÁS *et al.*, 2009; SUEN *et al.*, 2010; AYLWARD *et al.*, 2012; AYLWARD *et al.*, 2014), *Mesoplasma*, *Pseudomonas* e *Acinetobacter* (MEIRELLES *et al.*, 2016).

Estudos realizados em nosso laboratório (MARCHIORI, 2013) utilizaram técnicas de amplificação por PCR, seguida da determinação de sequências do gene 16S rRNA e identificaram algumas bactérias como *Rhizobiales*, *Spiroplasma*, *Burkholderia*, *Acetobacter*, *Wolbachia*, colonizando o interior do intestino de Attini. Alguma já haviam sido relatadas associadas às formigas Attini (MUELLER *et al.*, 2008; RUSSELL *et al.*, 2009; ISHAK *et al.*, 2011a; SAPOUNTZIS *et al.*, 2015), ou não Attini (STOLL *et al.*, 2007; FUNARO *et al.*, 2011; ISHAK *et al.*, 2011b; ANDERSON *et al.*, 2012; KAUTZ *et al.*, 2013).

Vários outros microrganismos estão presentes em formigas. Liberti e colaboradores (2015), encontraram quantidades significativas de *Acinetobacter* nos corpos das formigas nos gêneros *Sericomyrmex*, *Trachymyrmex* e *Cyphomyrmex*. Portanto *Acinetobacter* parece ser um tipo bacteriano associada com muitos gêneros de Attini. A *Pseudonocardia* é uma bactéria que já foi encontrada em tegumentos de formigas *Trachymyrmex* e *Acromyrmex* tanto em operárias quanto em rainhas (ANDERSEN *et al.*, 2012; MEIRELLES *et al.*, 2014; HEINE *et al.*, 2018) e algumas de suas espécies isoladas de formigas Attini podem ter funções nos ninhos. CURRIE e colaboradores (1999) sugerem que elas estão relacionadas ao estímulo do crescimento do fungo simbionte, entretanto a principal função seria a produção de substâncias com atividade antimicrobiana que inibem o crescimento do fungo parasita *Escovopsis* spp., protegendo a colônia contra a ação desse fungo.

Outra bactéria encontrada em estudos anteriores é *Spiroplasma*. Bactérias deste tipo não são incomuns em formigas, porém não se tem um amplo conhecimento de qual seria sua função. Alguns especulam sobre seu efeito patogênico (BOVÉ, 1997), outros especulam sobre seus efeitos protetores contra organismos oportunistas (JAENIKE *et al.*, 2010). SAPOUNTZIS *et al.* (2015) documentaram dois principais tipos de Entomoplasmatales como simbiontes intra e extracelulares em *Acromyrmex*, um deles intimamente relacionada

a *Mesoplasma*, sugerindo que esta bactéria possa facilitar o processamento da quitina, um componente presente na cutícula de insetos e que algumas estirpes possam ter efeitos benéficos ou mesmo patogênicos, contribuindo para a mortalidade das colônias de formigas, mas estas hipóteses precisam ser testadas.

Já foi descrito em alguns insetos sociais, como as formigas, abelhas, vespas e cupins, que algumas bactérias podem ser herdadas por transmissão materna (vertical) ou por transmissão horizontal, podendo contribuir no desenvolvimento desses insetos (FROST, 2010; KOCH; SCHMID-HEMPEL, 2011; GERARDO; PARKER, 2014; MUELLER; SACHS 2015, RAMALHO *et al.*, 2018).

Entre as variadas funções que os microrganismos desempenham junto aos insetos, observa-se a capacidade de alguns microrganismos de fixarem nitrogênio atmosférico. Também conhecidas como diazotróficos eles fazem conversão de nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia (NH_3) (SAWADA *et al.*, 2003; SAMADDAR *et al.*, 2011; SABINO *et al.*, 2012). Isto pode ocorrer de duas maneiras distintas, na associação de bactérias com plantas ou em bactérias de vida livre (DIALLO *et al.*, 2004). Esta capacidade de fixação de nitrogênio de um microrganismo está ligada à presença e atividade de um complexo enzimático conhecido como nitrogenase, que tem como principal função a combinação de proteínas codificadoras pelos genes conhecidos como *Nif* (RAIMOND *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2011).

A maioria dos organismos necessita de uma fonte de nitrogênio numa forma mais reduzida do que aquele presente na atmosfera, para que este elemento possa ser assimilado. Microrganismos nas Ordens Rhizobiales e Burkholderiales são bem estudados por terem esta capacidade. Estes microrganismos poderiam então estar mediando a fixação de nitrogênio para as formigas attíneas, tal como ocorre com Rhizobiales intestinais de outros grupos de formigas (VAN BORM *et al.*, 2002; STOLL *et al.*, 2007; RUSSELL *et al.*, 2009; ANDERSON *et al.*, 2012; KAUTZ *et al.*, 2013; SAPOUNTZIS *et al.*, 2015). Do ponto de vista agrônomo, ecológico e econômico, a simbiose entre bactérias fixadoras de nitrogênio e leguminosas é muito importante por poder dispensar parcial ou totalmente a utilização de fertilizantes nitrogenados sintéticos, contribuindo assim para a nutrição de plantas e aumento do nitrogênio disponível no solo (REIS *et al.*, 2006), reduzindo o alto custo através de uma agricultura sustentável onde ocorre o aproveitamento eficiente do nitrogênio atmosférico

(GRAHAM; VANCE, 2000). Assim, faz sentido pensar que a grande quantidade de biomassa de insetos gerada pelas grandes populações de cortadeiras possa depender da fixação bacteriana simbiote de nitrogênio molecular.

Certos membros de Burkholderiales poderiam, além de fixar nitrogênio, produzir antibióticos contra fungos (SANTOS *et al.*, 2004; ANDERSON *et al.*, 2012). Em nossos estudos esta bactéria foi encontrada na cutícula de *A. laevigata*, tendo sido também encontrada em formigas do gênero *Tetraponera* pertencente à família Formicidae (VAN BORM *et al.*, 2002) e em intestino de percevejos *Plinachtus* (KIKUCHI; HOSOKAWA; FUKATSU, 2011), o que sugere ações mutualísticas com diferentes insetos.

Assim como a Rhizobiales espécies de *Acetobacter* podem ser fixadoras de nitrogênio, porém elas também possuem prováveis envolvimento com aspectos da biologia de insetos como moscas, mosquitos, abelhas e cigarrinhas, atuando no seu metabolismo pelo fornecimento de nutrientes, por oxidação de certos substratos. Podem atuar na defesa contra microrganismos nocivos, devido a diminuição do pH do intestino destes insetos, ou ainda por exclusão competitiva. Estudos ainda revelam que podem interferir com a comunicação célula-célula por meio da produção de compostos voláteis e manutenção de um consórcio microbiano por fornecimento de metabólitos a outros microrganismos benéficos ao inseto (CROTTI *et al.*, 2010).

2.5 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)

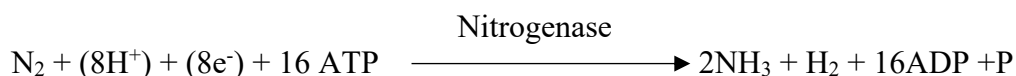
O nitrogênio é um elemento essencial para a vida na Terra. Ele é necessário, por exemplo, para a síntese de ácidos nucleicos, como componente das bases nitrogenadas e para a síntese de proteínas, como componente de aminoácidos. Na atmosfera o elemento químico N_2 está presente abundantemente em sua forma mais estável e esta estabilidade se dá devido à presença de uma forte ligação tríplice, entre as duas moléculas de N. Porém, a maioria dos organismos, animais e vegetais, não consegue incorporar essa forma de nitrogênio aos esqueletos de carbono de suas moléculas. Para que esta incorporação aconteça é necessário que essa ligação tríplice seja rompida e o nitrogênio seja transformado em íons amônio (NH_4^+) (REITZER, 2003).

Para a obtenção do NH_4^+ , existem diversas possibilidades, como a decomposição de

resíduos, através de descargas elétricas na atmosfera, e também oriundas de forma química, ou seja, por fertilizantes químicos. Contudo, uso de fertilizantes nitrogenados pode causar problemas ambientais como acidificação do solo, eutrofização de rios e emissão de óxidos de nitrogênio na atmosfera, além dos aspectos econômicos e da grande quantidade de energia fóssil utilizada para a produção destes fertilizantes (REJESUS; HORNBAKER, 1999; DIXON; KAHN, 2004; GALLOWAY *et al.*, 2008).

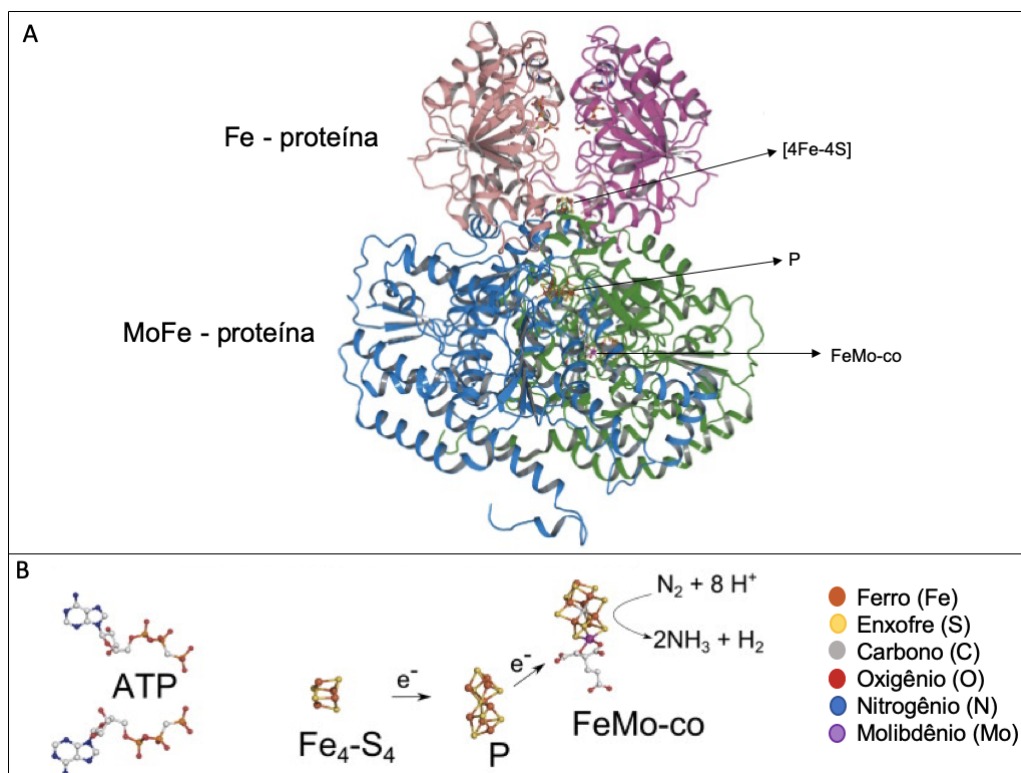
Outra fonte muito importante de aquisição, está relacionada a algumas espécies de bactéria que são capazes de realizar a reação de redução do N_2 a NH_4^+ . Esse processo biológico é conhecido como Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) (FRANCHE *et al.*, 2009). A elevada diversidade genética das bactérias fixadoras de Nitrogênio garante a ocorrência da FBN em um determinado ecossistema, como também, nos mais diferentes tipos de sistemas terrestres e adicionalmente no solo e nas plantas (FRANCHE *et al.*, 2009).

Figura 3. Reação realizada pela enzima nitrogenase



A fixação biológica do nitrogênio é catalisada pela enzima nitrogenase, que é composta de duas unidades: a dinitrogenase redutase (também chamada de Fe-proteína), contendo um centro $[4Fe-4S]$, e a dinitrogenase (ou MoFe-proteína), contendo um centro $[8Fe-7S]$ chamado de centro P e um co-fator FeMo (LANCASTER *et al.*, 2011; SPATZAL *et al.*, 2011) onde o cofator MoFe é o sítio catalítico da enzima (DIXON; KAHN, 2004). Nesse complexo enzimático, essas unidades interagem cooperativamente durante o processo de FBN onde ocorre a transferência dependente de ATP dos elétrons da Fe-proteína para a MoFe-proteína (REES; HOWARD, 2000). A reação resultante possui elevada energia de ativação e é inibida na presença do oxigênio (CANFIELD, 2010) (Figura 3).

Figura 4. Estrutura do complexo Nitrogenase.



Em (A) estão Fe – proteína (acima), $\alpha\beta$ -dímero da proteína MoFe (abaixo). Em (B) estão as características moléculas e a transferência de elétrons da Fe-proteína para a MoFe-proteína. Fonte: Adaptado (SEEFELDT *et al.*, 2013).

Neste processo os genes *nif* (do inglês *nitrogen fixation*) são responsáveis pela codificação de subunidades da nitrogenase que são altamente conservadas e que são encontradas nos microrganismos fixadores de nitrogênio (FALKOWSKI; FENCHEL; DELONG, 2008). Em relação aos genes *nif*, os que são codificadores das proteínas do complexo nitrogenase são os (*nifD*, *nifH* e *nifK*) (SARITA *et al.*, 2008), onde Fe-proteína se relaciona o gene *nifH* e para MoFe-proteína se relaciona o *nifD* e *nifK* (HOWARD; REES, 1996). Embora os genes *nifHDK* sejam bastante conservados, a capacidade de fixar nitrogênio está presente em organismos filogeneticamente muito distantes como Proteobactérias, Cianobactérias e Arqueias (RAYMOND *et al.*, 2004).

A filogenia obtida a partir dos genes *nif* mostrou ser parecida a obtida no gene 16S rRNA e, devido a isso, passou a ser usada na caracterização da diversidade de bactérias diazotróficas (ZEHR *et al.*, 2003). Assim, pode-se basear um estudo da comunidade fixadoras de nitrogênio na detecção, quantificação e análise da diversidade de genes 16S

(TAKETANI *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2011). No entanto, Burgmann e colaboradores (2005) destacam o *nifH* como sendo um melhor indicador da atividade real da nitrogenase.

2.6 Análise de diversidade microbiana com técnicas dependentes ou independentes de cultivo.

Os métodos para analisar a diversidade microbiana e a função da comunidade podem ser divididos em métodos independentes e métodos dependentes de cultivo (JUCK *et al.*, 2000), sendo que ambos devem incluir técnicas de caracterização genética (VAN HAMME; SINGH; WARD, 2003).

Os métodos dependentes de cultivo estão baseados nas diferenças morfológicas, metabólicas e fisiológicas dos microrganismos. Isto inclui o isolamento, cultivo e identificação em meio de cultura, podendo incluir a avaliação de características macroscópicas (temperatura ótima de crescimento, aero ou anaerobiose, morfologia das colônias) e microscópicas (tamanho, formato, mobilidade, presença ou ausência de flagelos, padrões de agregação celular e coloração de Gram) a qual proporciona a análise tintorial e morfologia celular (HOLT, 1994).

Pelo fato dos microrganismos realizarem variadas atividades bioquímicas utilizando nutrientes obtidos a partir do ambiente em que eles se encontram, técnicas chamadas de provas bioquímicas constituem uma ótima opção na diferenciação de bactérias cultiváveis. (BLAZEVIC; EDERER, 1975). As principais e mais utilizadas provas são as de utilização de fontes de carbono e de nitrogênio (NDOWORA *et al.*, 1996).

Para se avaliar comunidades microbianas tidas como não cultiváveis, uma alternativa é o uso de técnicas moleculares, baseadas na extração direta do material genético das amostras. Estas técnicas são capazes de permitir o acesso à comunidade bacteriana em seu habitat natural, como a análise do gene de 16S rRNA por exemplo (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995). Os ácidos ribonucléicos ribossomais (rRNA) são considerados os biopolímeros mais adequados para estudos de diversidade microbiana. Seus genes são universalmente distribuídos entre os diferentes grupos de seres vivos, sendo a molécula com o maior grau de conservação existente (REIS JUNIOR *et al.*, 2002). A frequente utilização destas sequências de rRNA se dá devido a disponibilidade de comparação de novas sequências obtidas, com as mais variadas bases de dados de livre acesso, como Genbank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), RDP (*Ribosomal Database Project*) (<http://rdp.cme.msu.edu/html>) e Greengenes (<https://rnacentral.org/expert-database/greengenes>).

O interessante destas análises moleculares é a possibilidade de estudar comunidades microbianas sem a necessidade do cultivo prévio, onde podem ocorrer interferências devido a mudanças artificiais na estrutura e na atividade metabólica da comunidade bacteriana. Além disso, métodos moleculares diretos preservam as características metabólicas *in situ* e a composição da comunidade microbiana (ALVAREZ, 2007). A análise molecular também pode ser utilizada para substituir as provas bioquímicas, onde a extração de DNA ocorre a partir de colônias puras previamente cultivadas (MENDES, 2009).

2.6.1 A dificuldade do cultivo *in vitro*.

Um dos problemas nos estudos é a dificuldade do cultivo *in vitro* de algumas bactérias. Elas são conhecidas como não-cultiváveis ou bactérias ainda não cultivadas, muitas vezes, por serem exigentes para isolamento *in vitro* e/ou difíceis de se identificar fenotipicamente (COLWELL, 1993; VEJA-ORELLANA *et al.*, 2017). Um exemplo disso são *Phytoplasmas* (KIRKPATRICK; SMART, 1995) e *Mycoplasma* (MAGGI *et al.*, 2013), bactérias da classe Mollicutes que não se tem cultivo eficiente em laboratório, assim como o gênero *Liberibacter* da classe Rhizobiales (GILKES *et al.*, 2019). Dessa forma, a aplicação de técnicas moleculares tem sido amplamente utilizada na análise e diferenciação deste tipo de bactérias.

2.7 Sequenciamento de DNA

Atualmente é possível, em relativamente pouco tempo, conhecer um genoma suficientemente bem para delinear um esquema do funcionamento celular do organismo e suas principais vias metabólicas (KOONIN; WOLF, 2008), auxiliando os estudos ecológicos e evolutivos de sistemas complexos (KYRPIDES, 2009). O sequenciamento de DNA teve início com a técnica de Sanger em 1977, que detecta bases individuais e a variação do DNA no nível de nucleotídeo único (SANGER, 1977). Cerca de 25 anos depois, novas tecnologias de sequenciadores automatizados, considerados *high throughput sequencing* (sequenciamento em larga escala ou NGS), assim como o desenvolvimento de ferramentas

de bioinformática, tornaram o sequenciamento de genomas e metagenomas muito mais fácil, rápido e barato (XU, 2011). As tecnologias de NGS são capazes de sequenciar grandes quantidades de DNA em um curto período de tempo. Uma das várias tecnologia utilizadas é a MiSeq da Illumina. As plataformas Illumina adotam o sequenciamento por síntese, ou seja, utilizam DNA polimerase e nucleotídeos marcados com diferentes fluoróforos. Os fragmentos de DNA ligados a adaptadores fixos são desnaturados em DNA fita simples, inseridos e fixados a uma lâmina de vidro onde ocorre o sequenciamento. Em seguida, é feita a amplificação dos fragmentos de DNA ligados através de uma estrutura em forma de “ponte” para formar clusters que contém 28 fragmentos de DNA clonados. Os nucleotídeos com corantes fluorescentes diferentes são incorporados e o sinal gerado é captado e interpretado pelo sequenciador (LIU *et al.*, 2012).

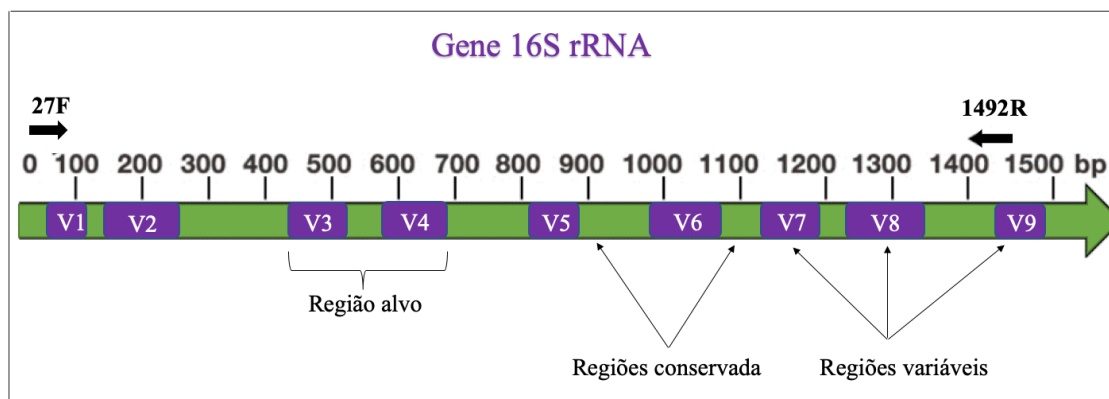
2.7.1 Gene 16S rRNA

O sistema de identificação por PCR e sequenciamento com *primers* específicos permite a avaliação rápida de diferentes microrganismos ao mesmo tempo e grande parte das vezes fornece sua confirmação definitiva (YANG *et al.*, 2001). O marcador molecular 16S rRNA é conhecido como “Universal”, pois está presente em todas as células procarióticas e tem regiões de sequência conservadas e variáveis, possui aproximadamente 1500 pb, ou seja, é grande o suficiente para fins de estudos taxonômicos (PATEL, 2001). Seu maior atrativo é fornecer identificação com alta especificidade para gênero e espécie em isolados bacterianos que não se enquadram em nenhum perfil bioquímico conhecido (DRANCOURT *et al.*, 2000). As dificuldades encontradas na obtenção de uma identificação, incluem o reconhecimento de novos táxons, poucas sequências depositadas em bancos de dados e espécies que compartilham sequências semelhantes e/ou idênticas (WOO *et al.*, 2003; MIGNARD; FLANDROIS, 2006). Para amplificação do gene 16S utiliza-se diversos iniciadores, como por exemplo os 27F e 1492R (LANE, 1991), utilizado neste trabalho.

Os *Primers* universais são frequentemente escolhidos como complementares às regiões conservadas, mas além destas regiões o gene 16S rRNA contém regiões hipervariáveis que podem fornecer assinaturas específicas da espécie, úteis para a identificação do microrganismo (PEREIRA *et al.*, 2010). Claesson e colaboradores, (2010) após estudos com *primers* das regiões V1 a V9, levando em consideração maior precisão e a

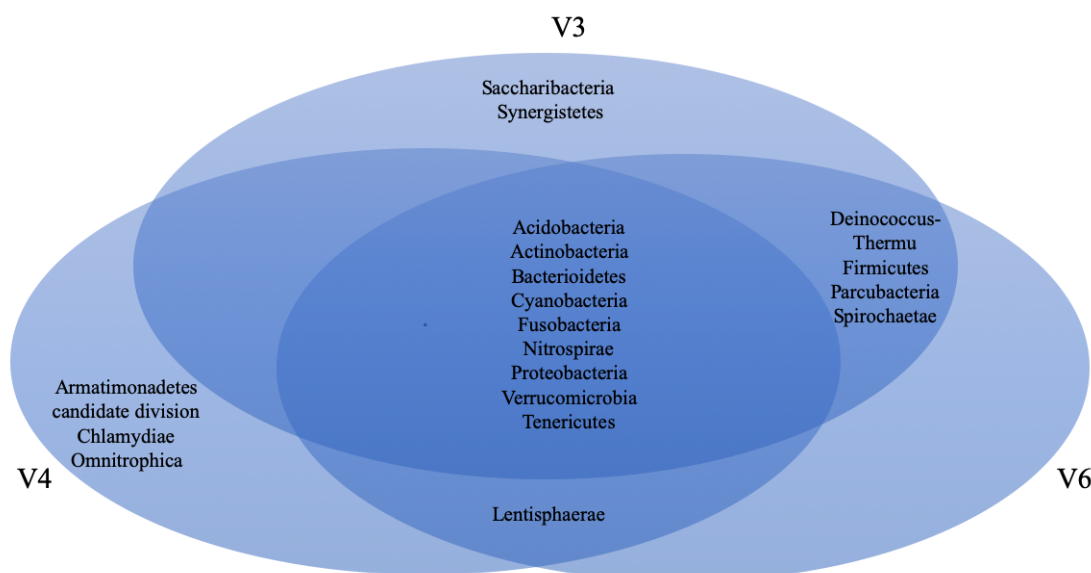
eficiências de classificação, observaram que as regiões V3 e V4 mostraram maior preferência de amplificação em comparação a outras regiões. Sendo assim, com base em vários estudos, as regiões hipervariadas mais utilizadas para identificação taxonômica são as regiões, V3, V4 e V6 (ZHANG *et al.*, 2018), (Figura 4 e 5).

Figura 5. Gene 16S rRNA com base na sequência de *E.coli* (BROSIUS *et al.*, 1981).



As flechas apontam as regiões variáveis (roxo) entre os gêneros ou espécies bacterianas e as regiões conservadas (verde) no domínio bactéria. A chave representa a região V3-V4 hipervariável utilizada na classificação taxonômica (NGS). As setas horizontais indicam o local de anelamento dos *primers* 27F e 1492R utilizados para sequenciamento Sanger.

Figura 6. Diagrama de Venn relacionando a diferenciação taxonômica baseada nas regiões V3, V4 e V6 baseados nos filós detectados nas sequências disponíveis em bancos de dados.



Fonte Adaptada (ZHANG *et al.*, 2018; LI; YUE, 2016).

Sendo assim, a análise fisiologia bacteriana e molecular são opções valiosas capazes de produzir grandes quantidades de dados em detalhes, com fluxos de trabalho de laboratório relativamente simples e rápidos.

3. OBJETIVOS

Geral:

Caracterizar as comunidades bacterianas associadas a formigas Attini *Atta laevigata*, *Atta sexdens*, *Acromyrmex rugosus* e *Acromyrmex coronatus* utilizando tanto métodos dependentes como métodos independentes de cultivo.

Específicos:

1. Aprimoramento de protocolos para isolamento e cultivo em meios de cultura específicos das possíveis bactérias diazotróficas encontradas no abdômen das formigas.
2. Caracterização genômica e fisiológica dos isolados quanto à fixação de nitrogênio.
3. Análise da comunidade bacteriana presente no abdômen destas espécies de formigas utilizando a técnica independente de cultivo NGS – Illumina MiSeq, assim como a identificação de bactérias compartilhadas entre diferentes espécies de formigas cortadeiras.

PARTE 2

New diazotrophic bacteria possibly mediate leafcutter ant nutrition with atmospheric nitrogen

Renata de Oliveira Aquino Zani^{#1*}, Milene Ferro^{#1}, Maurício Bacci Jr^{1,2}

¹Center for the Study of Social Insects, UNESP – São Paulo State University, Rio Claro, SP, Brazil.

²Department of General and Applied Biology – UNESP – São Paulo State University, Rio Claro, SP, Brazil

Correspondence to:

*Renata de Oliveira Aquino Zani (renata.aquino@gmail.com) or Maurício Bacci Júnior (mauricio.bacci@unesp.br): UNESP - Universidade Estadual Paulista. Avenida 24A, 1515 – Bela vista – Rio Claro/SP. Caixa Postal 199, 13506-900 Rio Claro, SP, Brazil

These authors contributed equally to this work

ORCID

Renata de Oliveira Aquino Zani: <https://orcid.org/0000-0002-2693-0922>

Milene Ferro: <https://orcid.org/0000-0002-3960-9062>

Maurício Bacci Júnior: <https://orcid.org/0000-0002-5619-1411>

ABSTRACT

In leaf-cutting ant pests, an obligate mutualistic basidiomycete mediates the ants' nutrition with carbons from vegetal matter using a fermenter-like system inside the nest, called a “fungus garden.” Diazotrophs such as Enterobacteriales in the fungus garden and intestinal Rhizobiales were proposed to mediate the incorporation of atmospheric nitrogen into ant

proteins; Entomoplasmatales were proposed to power the fungus metabolism. Leafcutters likely rely on a microbial community to access the carbon and nitrogen necessary for the production of the millions of individuals found in a single giant colony. In the present investigation, we found that mutualism between the leafcutter and Rhizobiales occurs in a wide geographic range and mainly between three closely related species within the Rhizobiales genera *Liberibacter*, *Bartonella*, and *Terasakiella*. However, the association between the ant and the Entomoplasmatales genus *Mesoplasma* is likely parasitic or commensal, since giant leafcutter colonies may be either massively invaded by or completely devoid of these bacteria, suggesting that these endosymbionts are not essential for high yields of ant biomass. We also found three new candidate mutualists, frequently isolated from the ant abdomen, including nearly identical diazotrophs of the genera *Methylobacterium* (Rhizobiales) and *Raltonia* (Burkholderiales) and non-diazotrophs of the genus *Acinetobacter*. These results point to multiple non-competitive and complementary strategies for atmospheric nitrogen nutrition within the leafcutter system.

KEYWORDS Attini, Alphaproteobacteria, microbial diversity, Mollicutes, *nifH*, 16S rRNA gene.

1 INTRODUCTION

Leafcutter ants, that is, those in the *Atta* and *Acromyrmex* genera, present a distinguished ecological success colonizing a vast geographic area in the American Continent (Hölldobler & Wilson, 1990). These characteristics, as well as their specialized behavior, social organization, and pest status, have made them excellent study models (Rabeling et al., 2008).

The ecological success of leafcutter ants relies on their associations with microorganisms, the primary association being with a basidiomycete fungus cultured on leaf matter in a fermenter-like system inside the nests, called a “fungus garden,” which mediates assimilation of carbons from vegetal polysaccharides in ants (Quinlan & Cherrett, 1979; Silva et al., 2003; Somera et al., 2015).

In addition to the mutualistic fungus, diazotrophic bacteria may also contribute to the ant diet, potentially mediating the assimilation of atmospheric nitrogen; examples are Enterobacteriales living in the fungus garden (Pinto-Tomás et al., 2009) and Rhizobiales inhabiting the ants’ intestines (Sapountzis et al., 2015; Zhukova et al., 2017).

Finally, both intracellular and extracellular Entomoplasmatales living in the guts have been proposed to supplement the ant diet with acetate, providing extra energetic input for the larger-scale ant biomass produced by leafcutters, as compared with other attine ants devoid of this symbiont (Sapountzis et al., 2018).

In the present investigation, we analyzed the bacteria associated with the abdomen of leaf-cutting ants and found that Rhizobiales were the dominant group, with a consistent obligate mutualistic function; however, Entomoplasmatales may also either dominate or be absent from the giant and healthy ant colonies, resembling a fortuitous parasitic or

commensal association. In addition, the Rhodobacterales genus *Rhodovulum* and the Rickettsiales genus *Wolbachia* were often found in relatively large numbers.

We followed four leafcutter ant colonies for 24 months, periodically isolating bacterial representatives from the ant abdomen, and found nearly identical diazotrophs of the *Ralstonia* and *Methylobacterium* genera or the non-diazotroph of *Acinetobacter* genus. These isolates likely tightly adhere to the ant's body and are new candidates integrating the microbial mutualistic community, facilitating ant access to atmospheric nitrogen and other functions.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1. Collection and identification of ants We sampled soldiers from five ant colonies in the counties of Rio Claro and Itirapina in southeastern Brazil: 10 to 12 mm long *Atta laevigata* individuals from either (1) Rio Claro (22°23'42" S, 47°32'33" W) or (2) Itirapina (22°14'41" S, 47°50'38" W), (3) 8 to 11 mm *Atta sexdens* individuals from Rio Claro (22°23'43" S, 47°32'32" W), (4) 6 to 8 mm *Acromyrmex rugosus* from Rio Claro (22°23'44" S, 47°32'47" W), and (5) 6 to 8 mm *Acromyrmex coronatus* from Rio Claro (22°23'42" S, 47°32'44" W). Samples were generally collected at the entrance of the nest; *Acromyrmex coronatus* samples were collected on the trail due to the difficulty of accessing the arboreal nest. The species were identified by morphological and molecular analysis, first with differentiation keys (Borgmeier, 1959; Gonçalves, 1961) and then using barcode sequencing of mitochondrial genes COI and COII (Hebert et al., 2003). To extract DNA, we followed a protocol described by Sambrook et al. (1989), and to amplify DNA we followed the conditions described by Martins et al. (2007). Amplicon concentration was measured using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and purified using exonuclease

I and alkaline phosphatase enzymes (Thermo Fisher Scientific, USA). Sequencing was performed by applying the same forward or reverse primers (Martins et al., 2007) used for amplification and using the BigDye™ terminator sequencing kit version 3.1 (Applied Biosystems™, CA, USA) on a Sanger Sequencing 3500 Series Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, CA, USA). The generated sequences were edited with the BIOEDIT 7.0.5 program (Hall, 1999), followed by BLASTn analysis (v.2.6.0+) (Altschul et al., 1990) using the GenBank NR database as a reference.

2.2 Sanitization of ant samples Ants were sequentially washed once with 5 mL 70% ethanol, once with 5 mL of 2% sodium hypochlorite, and six times with 8 mL of ultrapure water. Based on their sizes, ants were immersed individually (*Atta*) or in pairs (*Acromyrmex*) in each tube and then manually homogenized for 10 s. The purpose of washing the ants was to remove microorganisms weakly adhered to their cuticles.

2.3. DNA extraction, 16S library preparation, read preprocessing, and diversity analyses Eight libraries were prepared, two for each of the Rio Claro colonies, either before or after sanitizing the ant samples, except from Itirapina colony. The ant abdomen (approximately 20 mg, wet weight) was removed, macerated, and subjected to DNA extraction with the (Norgen Biotek Corp Kit® 2016, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions. The extracted DNA was sent to Macrogen Inc. (South Korea), where amplicon libraries of the V3-V4 region of the 16S ribosomal RNA gene were prepared, and sequenced on the MiSeq Illumina platform (paired-end 2x 300 bp). We then submitted the generated data to quality control in the FastQC program version 0.11.5 (Babraham

Bioinformatics; www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/), trimmed out low quality raw reads (Phred Q score <20) using SeqyClean (Zhbannikov et al., 2017), and carried out taxonomic identification with the OmicsBox platform (BioBam Bioinformatics S.L., Valencia, Spain) using the taxonomic sequence classification system Kraken (Wood & Salzberg, 2014), which compared our sequences to a curated database (Kraken database (2019_06)). Rarefaction curves were generated in the OmicsBox platform and represented as the number of expected bacterial genera (Y-axis) per number of reads (X-axis). Principal coordinate analysis (PCoA) was implemented using OmicsBox with the Bray-Curtis distances to compare bacterial community composition in different libraries. Bacterial alpha-diversity indices were estimated for each sample on the same platform.

2.4 Dominant bacterial genera shared within ant species Venn diagrams were generated with Bioinformatics & Evolutionary Genomics tools (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/venn/>), to identify bacterial genes that were shared between ant colony samples. Shared genera with higher amounts of 16S sequences were identified as dominant.

2.5 Bacterial isolation In total, 23 isolation experiments were performed on the five studied ant colonies from October 2017 to September 2019. *Atta* soldiers are larger than their *Acromyrmex* counterparts; therefore, less *Atta* were collected (10) compared with *Acromyrmex* (15) from each sampling. Each soldier was washed, the abdomen was separated and macerated, and portions of the macerate were streaked on solid culture media surfaces. Washing removed many of the fast-growing yeasts, making bacterial isolation more efficient. For the isolation of Rhizobiales, the culture medium used was YMA (yeast extract mannitol

agar, pH 7.0) from Sigma-Aldrich (cod. 101417911) and 0.25% congo red (Sigma-Aldrich; cod. 6767). The media surfaces were incubated for approximately 3 to 4 days at 30 °C (Fred & Waksman, 1928). DIGS medium was used for the isolation of other diazotrophic bacterial species, with incubation at 30 °C for 3 to 4 days (Döbereiner et al., 1999; Sabino et al., 2012).

2.6 Molecular identification of bacterial isolates DNA extraction was performed as described by Sampaio et al. (2001) with some modifications. Two loopfuls of each isolate were suspended in 500 µL of lysis solution (Tris 50 mmol/L, NaCl 250 mmol/L, EDTA 50 mmol/L, and SDS 0.3 % at pH 8.0), glass beads were added, the suspension was vortexed for 4 min and incubated in a dry bath at 65 °C for 1 h, and centrifuged at 13,000 rpm for 15 min. The aqueous phase was transferred to a 1.5 ml microtube and stored at -20 °C. Amplification was performed using 10 µM of 16S universal primers (Lane, 1991). PCR conditions included an initial 95 °C incubation for 3 min followed by 30 cycles of: 95 °C for 30s, 55 °C for 30s, and 72 °C for 90s, followed by a final extension of 72 °C for 5 min. Amplicon purification and sequencing followed the procedures described in Section 2.1. The generated sequences were preprocessed with the BIOEDIT 7.0.5 program (Hall, 1999) and the taxonomic assignments of each sequence were performed using the Ribosomal Database Project classifier (Cole et al., 2009). Sequences were also compared with each other using multiple alignments in the MAFFT program (Katoh et al., 2002).

2.7 PCR amplification of the *nifH* gene The *nifH* gene was amplified using the conditions described by Ueda et al. (1995), only changing the annealing temperature to 47 °C. We used the nitrogen fixative *Klebsiella pneumonia* (Roberts et al., 1978) as the positive control. Amplicon purification and sequencing were performed following the procedures described

in section 2.1. The generated sequences were edited using the BIOEDIT 7.0.5 program (Hall, 1999) and identified using the BLASTn v.2.6.0 program (Altschul et al., 1990) against the NR database.

2.8 Analysis of nitrogen fixation Isolates were subjected to physiological analysis for nitrogen fixation using *Klebsiella pneumoniae* as the positive control. The test was performed in tubes containing 5 mL of semi-solid, nitrogen-free NFb culture medium for approximately 72 h at 28 °C. This assay was performed in duplicate. The formation of a growth film in the culture medium indicated the capacity to fix nitrogen (Döbereiner et al., 1995). After film formation, isolates were streaked in Petri dishes containing YMA and molecularly identified.

2.9 Comparison between isolated colonies and 16S rRNA libraries We created a formatted local database BLAST for each 16S library and used the OmicsBox platform to run a BLASTn search (E-value cutoff 1e-03) against Sanger sequences obtained from every isolate. When no hit was found, the isolate was considered absent from the 16S library. If hits were found, identities were calculated for the first 500 best hits. We also mapped reads from each of the 16S libraries to the Sanger 16S sequences, using the Bowtie2 (Langmead & Salzberg, 2012) tool to verify the number of reads corresponding to each of the isolates.

2.10 Comparison of 16S rRNA libraries with 16S sequences from leafcutter symbionts For each predominant genus we selected a representative sequence of their respective ant species, assembled using CAP3 (Huang & Madan, 1999). BLASTn (minimum E-value 1e-03) in the OmicsBox platform was used to compare each representative sequence against GenBank sequences for Rhizobiales (RhiAcro1, GenBank accession # KR336619),

Mesoplasma (EntAcro1 - GenBank accession # KR336618), and *Entomoplasma* (EntAcro2, GenBank accession # KR336617) obtained from *Acromyrmex* and generated by Sapountzis et al. (2015). Representative sequences were also assigned to a bacterial genus using the Kraken OmicsBox tool.

3 RESULTS

3.1 Species identification Ant species were identified using taxonomic keys and were confirmed by comparing the COI and COII gene sequences (Martins et al., 2007) with sequences contained in the GenBank. This comparison resulted in the closest matches with the following identities and E-values: *Atta laevigata* from Itirapina: 92.95% / 8e-82; *Atta laevigata* from Rio Claro: 98.17 / 0.0; *Atta sexdens*: 99.8 / 0.0; *Acromyrmex rugosus*: 79.55 / 1e-28; and *Acromyrmex coronatus* 88.16 / 7e-20.

3.2 Sequencing of 16S libraries The 16S rRNA libraries contained 1,735,340 reads with 300bp; after filtering there remained 1,691,678 reads with 20 Phred value ≥ 20 .

3.3 Rarefaction and PCoA analyses The gradual flattening of the rarefaction curves (Figure 1) indicates that the variety of each sample is close to saturation (Wood & Salzberg, 2014), and therefore, the bacterial community can be confidently characterized. PCoA analysis (Figure 2) showed that the bacterial communities are similar in both the *Acromyrmex* species. These communities are distinct from the bacterial communities associated with *Atta* species. However, the bacterial community associated with *Atta sexdens* is distinct from that

associated with *Atta laevigata*. The predominant bacterial communities are similar in sanitized and unsanitized samples of the same ant species.

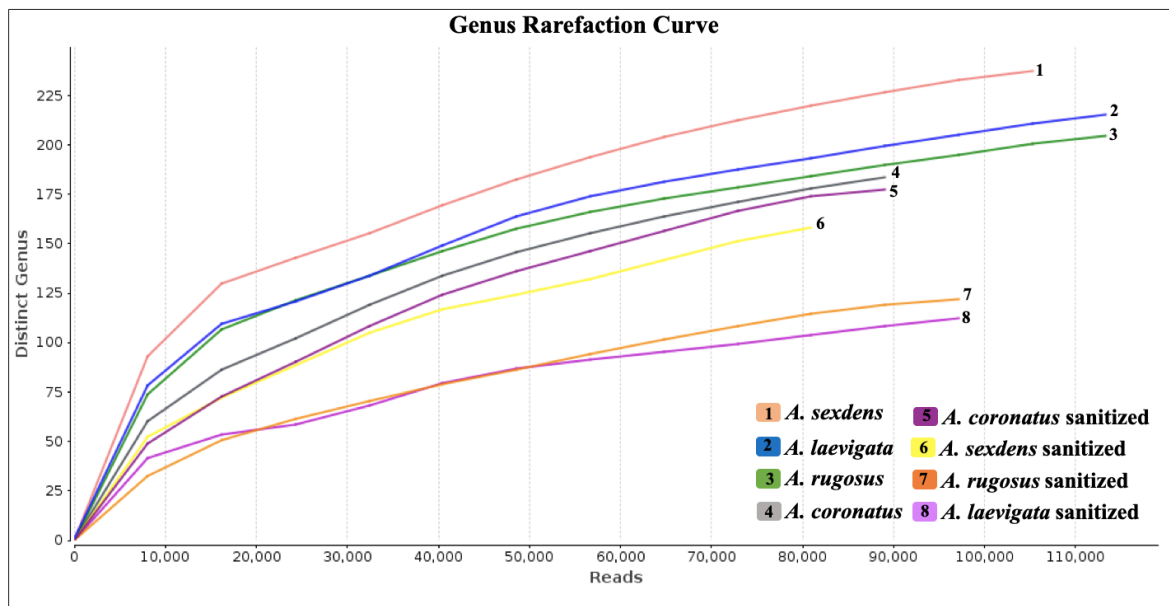


FIGURE 1. Rarefaction curve.

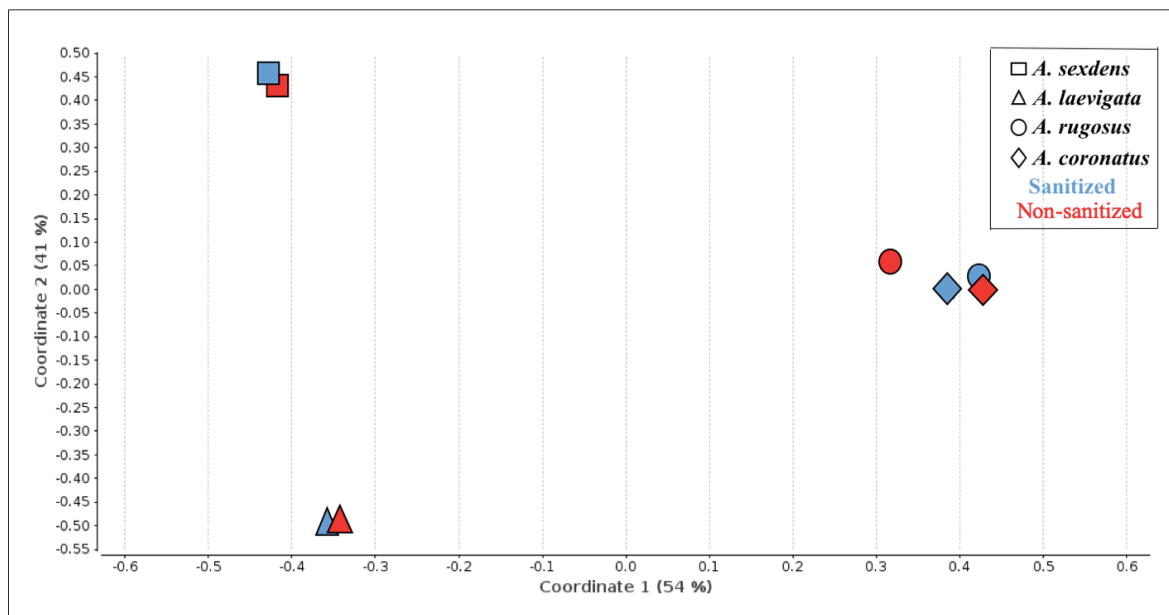


FIGURE 2. Principal coordinate analysis (PCoA) based on bacterial genus associated with ant species.

3.4 Bacterial diversity Shannon and Simpson indices (Table 1) showed that species of *Atta* had greater diversity than *Acromyrmex* species, and that sanitizing samples resulted in decreased diversity.

Next		Sequencing		Isolation				
Sample (Colony number)	16S Library Read Pairs/Classified	Shannon (H')	Simpson (C)	16S Library Order / Genus (% Reads)	Order / Genus	nifH	Growth on N-free medium	Found in the 16S Library [Identity (read %)] #
<i>Atta laevigata</i> Sanitized (1)	108,938 / 99.87%	2.724	0.8502	Rhizobiales / <i>Liberibacter</i> (88.58) Rhizobiales / <i>Terasakiella</i> (1.3) Rhodobacterales / <i>Rhodovulum</i> (0.5)	Rhizobiales / <i>Methylobacterium</i> Burkholderiales / <i>Ralstonia</i> Actinomycetales / <i>Brachybacterium</i> Pseudomonadales / <i>Acinetobacter</i>	+ + - -	-/+ + - -	86.7 - 94.2 (7.2) No 83.8 - 93.6 (0.006) 94.7 - 98.6 (0.017)
<i>Atta laevigata</i> (1)	126,678 / 99.77%	3.688	0.9406	Rhizobiales / <i>Liberibacter</i> (89.45) Rhodobacterales / <i>Rhodovulum</i> (0.78)				
<i>Atta sexdens</i> Sanitized (3)	82,680 / 99.9%	3.016	0.8298	Rhizobiales / <i>Bartonella</i> (92.98) Rhodobacterales / <i>Rhodovulum</i> (1.48) Rhizobiales / <i>Liberibacter</i> (1.17)	Burkholderiales / <i>Ralstonia</i> Rhizobiales / <i>Methylobacterium</i> Pseudomonadales / <i>Acinetobacter</i>	+ + -	+ + -	91.5 - 93.9 (0.008) 94.7 - 99.1 (0.59) No
<i>Atta sexdens</i> (3)	24,222 / 99.73%	3.263	0.8532	Rhizobiales / <i>Bartonella</i> (80.3) Rhodobacterales / <i>Rhodovulum</i> (1.56) Rhizobiales / <i>Liberibacter</i> (1.1)				
<i>Acromyrmex</i> <i>rugosus</i> Sanitized (4)	106,078 / 99.97%	0.84	0.4828	Entomoplasmatales / <i>Mesoplasma</i> (56.42) Rhizobiales / <i>Terasakiella</i> (27.56) Entomoplasmatales / <i>Entomoplasma</i> (5.84) Rhizobiales / <i>Liberibacter</i> (3.2) Rhodobacterales / <i>Rhodovulum</i> (2.27) Entomoplasmatales / <i>Spiroplasma</i> (1.15)	Pseudomonadales / <i>Acinetobacter</i> Pseudomonadales / <i>Pseudomonas</i>	- +	- -/+	No No
<i>Acromyrmex</i> <i>rugosus</i> (4)	119,161 / 99.98%	1.249	0.5944	Entomoplasmatales / <i>Mesoplasma</i> (33.73) Rhizobiales / <i>Terasakiella</i> (32.57) Rhizobiales / <i>Bartonella</i> (9.66) Rhizobiales / <i>Liberibacter</i> (8.76) Entomoplasmatales / <i>Entomoplasma</i> (3.34) Rhodobacterales / <i>Rhodovulum</i> (2.33) Entomoplasmatales / <i>Spiroplasma</i> (1.11)				
<i>Acromyrmex</i> <i>coronatus</i> Sanitized (5)	100,217 / 99.97%	0.916	0.4868	Rhizobiales / <i>Terasakiella</i> (56.21) Entomoplasmatales / <i>Mesoplasma</i> (25.72) Rhizobiales / <i>Liberibacter</i> (5.69) Entomoplasmatales / <i>Entomoplasma</i> (3.02) Rhodobacterales / <i>Rhodovulum</i> (2.4) Entomoplasmatales / <i>Spiroplasma</i> (0.96)	Pseudomonadales / <i>Acinetobacter</i> Burkholderiales / <i>Ralstonia</i>	- +	- +	92.9 - 93.3 (0.11) No
<i>Acromyrmex</i> <i>coronatus</i> (5)	98,703 / 99.96%	0.948	0.5223	Entomoplasmatales / <i>Mesoplasma</i> (50.93) Rhizobiales / <i>Terasakiella</i> (31.81) Entomoplasmatales / <i>Entomoplasma</i> (5.35) Rhizobiales / <i>Liberibacter</i> (3.49) Rhodobacterales / <i>Rhodovulum</i> (2.36) Entomoplasmatales / <i>Spiroplasma</i> (1.41)				
<i>Atta laevigata</i> Sanitized (2)					Rhizobiales / <i>Methylobacterium</i> Burkholderiales / <i>Ralstonia</i> Pseudomonadales / <i>Acinetobacter</i>	+ + -	-/+ + -	

TABLE 1. Bacteria identified in the leafcutter abdomen by 16S sequencing or isolation methods. # Read %: percentage of library reads mapped on a given 16S Sanger read as obtained by BOWTIE2.

3.5 Taxonomic classification based on 16S rRNA libraries Microbial communities of each ant sample predominantly contained bacteria of a few specific genera: *Liberibacter* genus in *Atta laevigata*, *Bartonella* genus in *Atta sexdens*, and *Terasakiella* and *Mesoplasma* genera in both *Acromyrmex rugosus* and *Acromyrmex coronatus* (Table 1 and Figure 3).

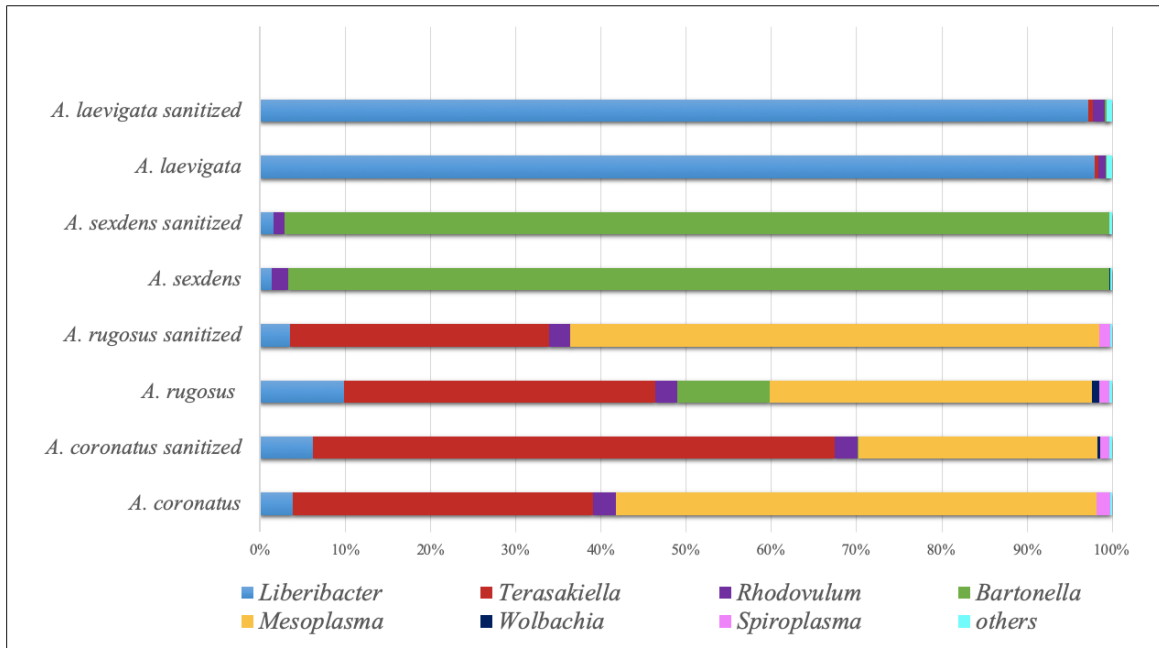


FIGURE 3. Taxonomic classification based on bacterial genus associated with the ants.

3.6 Shared bacterial taxonomic genera We found 54 shared genera in sanitized samples and 69 shared genera in non-sanitized samples (Figure 4). *Liberibacter*, *Bartonella*, *Terasakiella*, *Rhodovulum*, and *Wolbachia* were represented by at least 1,000 sequences each. The sum of sequences within these five genera corresponded to at least 98% of those found in sanitized and non-sanitized groups (Supporting information, Tables S1 and S2).

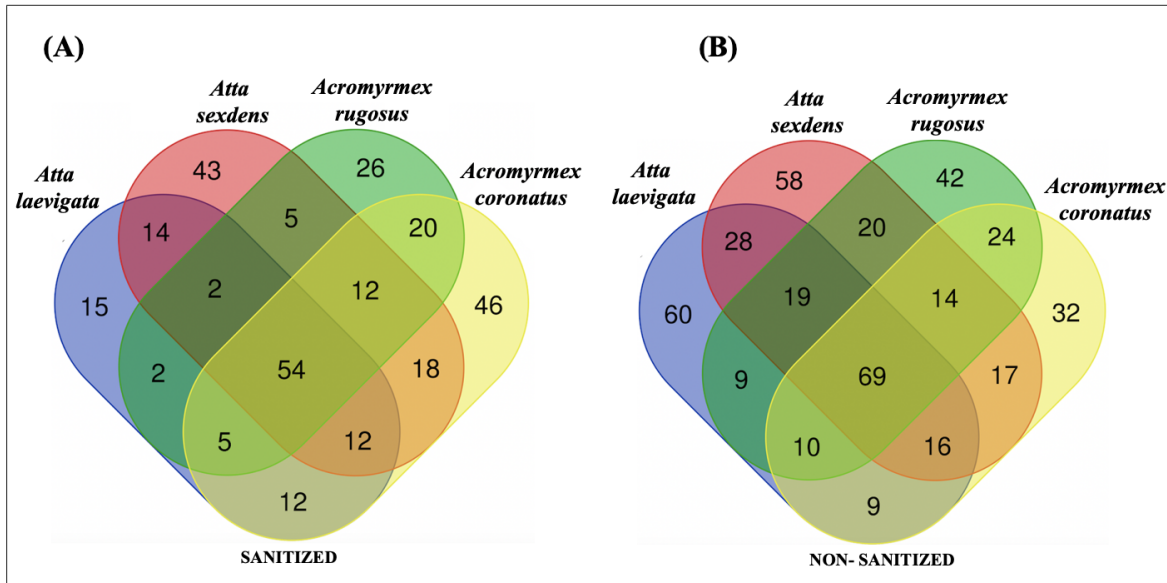


FIGURE 4. Venn diagrams showing shared or exclusive bacterial genera found in ant samples. *Liberibacter*, *Terasakiella*, *Bartonella* and *Rhodovulum* predominated within the 54 genera shared by sanitized samples (A); *Liberibacter*, *Bartonella*, *Terasakiella*, *Rhodovulum*, and *Wolbachia* predominated within the 69 shared genera in non-sanitized samples (B).

3.7 Comparing 16S rRNA libraries with 16S sequences from leafcutter symbionts

We found that the representative sequences for each predominant Rhizobiales genus: *Liberibacter*, *Bartonella*, and *Terasakiella*, were 99.55%, 99.09%, and 98.86% identical to that of the RhiAcro1 symbiont (GenBank accession # KR336619), respectively. This symbiont was originally found in the guts of *Acromyrmex* ants from Gamboa, Panama (Sapountzis et al., 2015). In addition, the *Mesoplasma* representative sequences from *Acromyrmex coronatus* and *Acromyrmex rugosus* showed 99.57% and 99.78% identity, respectively, with EntAcro1 (GenBank accession # KR336618). The *Entomoplasma* representative sequence had 91.42% (*Acromyrmex coronatus*) and 91.85% (*Acromyrmex rugosus*) identity with EntAcro2 (GenBank accession # KR336617), which was also described by Sapountzis et al. (2015).

These results indicate that leafcutters from Central or South America present nearly identical Rhizobiales and that *Acromyrmex* from both geographic sites present nearly identical Entomoplasmatales strains.

3.8 Molecular and physiological analysis of bacterial isolates Diazotrophic bacteria have been reported to live in association with the ant abdomen (van Borm et al., 2002; Sapountzis et al., 2015), therefore, we used appropriate culture media to isolate bacterial diazotrophs from the leafcutter's abdomen. During the two-year period, we visited the five nests studied in the current report, collected ant samples, performed 23 isolation experiments, and obtained 42 bacterial isolates (Supporting information – Table S3).

Twenty-one representative isolates were sequenced and classified in five different bacterial genera within Rhizobiales, Burkholderiales, Pseudomonadales, and Actinomycetales. Of these 21 isolates, 12 were found to fix nitrogen as they had the *nifH* gene and grew on N-free media (Table 1): four nearly identical (97.4% to 100% 16S) *Methylobacterium* (Order Rhizobiales) isolates from *Atta laevigata* and *Atta sexdens*, six nearly identical (85.8% to 99.7%) *Ralstonia* isolates (order Burkholderiales) from *Atta laevigata*, *Atta sexdens*, and *Acromyrmex coronatus*, and two nearly identical *Pseudomonas* (Order Pseudomonadales) isolates (99.3%) from *Acromyrmex rugosus*.

Notably, eight non-nitrogen-fixing *Acinetobacter* (Pseudomonadales) isolates (97% to 99%) were found in every analyzed ant species and, in addition, one *Brachybacterium* (Order Actinomycetales) was found in *Atta laevigata*.

However, the five identified bacterial genera encompassing isolates (*Methylobacterium*, *Brachybacterium*, *Acinetobacter*, *Ralstonia*, and *Pseudomonas*) were represented in minor amounts (0.0006-7.2%) in the 16S libraries with maximal identity

variation from 93% to 99.1% (Table 1). Therefore, although culturable bacteria have often been recovered from ant samples, they have been under-represented in the 16S libraries, which were dominated by sequences from unculturable bacterial strains.

4 DISCUSSION:

Several bacteria have been reported to be associated with whole ants (Cafaro et al., 2011; Liberti et al., 2015; Ramalho et al., 2017) or ant parts, such as the hemolymph (Tufts & Bextine, 2009) or digestive tract (Billen & Buschinger, 2000; van Borm et al., 2002; Russell et al., 2017; Vieira et al., 2017; Hu et al., 2018).

In the present study, we found a greater diversity in the bacterial communities associated with *Atta* species than those associated with *Acromyrmex* species (Table 1). As expected, after sanitizing the ants, the bacterial diversity decreased. However, it decreased only slightly, which suggests that immersion of soldiers in 70% ethanol followed by 2% sodium hypochlorite was not sufficient to remove the microbes that are more tightly adhered to the ant cuticle.

Alphaproteobacteria represent a large part of the sequences described in our 16S libraries, corroborating previous studies for several species of leafcutter ants in different tract digestive tissues (Sapountzis et al., 2015; Vieira et al., 2017; Teseo et al., 2019). Among these Alphaproteobacteria, the most abundant genera found in our analysis were of the order Rhizobiales: *Liberibacter* in *Atta laevigata*, *Bartonella* in *Atta sexdens*, and *Terasakiella* in *Acromyrmex coronatus*. In *Acromyrmex rugosus*, the predominant genus was *Mesoplasma*, belonging to the class Mollicutes (Table 1). It is interesting to note that *Mesoplasma* was also found to be abundant in *Acromyrmex coronatus*, but not in *Atta laevigata* or *Atta sexdens* individuals. In addition, appreciable amounts of *Terasakiella* and *Liberibacter* were found in

Acromyrmex rugosus and *Acromyrmex coronatus*. Therefore, closely related Rhizobiales having a consistent obligate mutualistic function, were found in every ant species we analyzed, and *Entomoplasmatales* with an occasional parasitic or commensal association were found to a lesser degree.

Nitrogen occurs as N₂, or dinitrogen, in high concentrations in the atmosphere, but most organisms cannot use it as a source of nutrients (Postgate, 1978). The ability to fix nitrogen is restricted to some bacteria called diazotrophs that express the enzyme nitrogenase, capable of reducing atmospheric dinitrogen to ammonia, which can then be assimilated by many organisms (Kneip et al., 2007). These microorganisms in insects have also been suggested to fix atmospheric nitrogen, enabling insects to subsist on low-nitrogen diets (Nardi et al., 2002).

The genus *Liberibacter* has already been associated as an endosymbiont in the Psyllidae *Diaphorina citri*, which causes plant diseases (Wang et al., 2017; Naranjo et al., 2019), but to the best of our knowledge, no study has described the association between *Liberibacter* and Attini ants. *Bartonella* found in *Atta sexdens* has been described in *Harpegnathos saltator* ants (Neuvonen et al., 2016). Bacteria belonging to the Bartonellaceae family are known to establish chronic infections in mammals; they have already been sequenced from the intestines of the *Dolichoderus* ant and have been proposed to be associated with nitrogen recycling (Bisch et al., 2018). Studies carried out by Sapountzis et al. (2015) found that three *Acromyrmex* species from Gamboa, Panama, harbor extracellular bacteria of the Rhizobiales order, which were identified under the operational taxonomic unit RhiAcro1, that formed an intestinal biofilm confined to the ant lumen, and showed potential to fix N₂. RhiAcro1 was also found in *Trachymyrmex cortezi*, *Cyphomyrmex rimosus*, and *Atta cephalotes* (Sapountzis et al., 2018), all of which were from Gamboa, Panama. We

retrieved the RhiAcro1 16S sequence from GenBank and classified it as belonging to the genus *Bartonella* using the Kraken tool. In addition, the RhiAcro1 16S sequence showed 99.09% BLAST similarity with *Bartonella* sequences predominantly found in the *Atta sexdens* library. These results indicate that association with intestinal *Bartonella* in the RhiAcro1 group occurs within a wide geographical range.

The *Terasakiella* genus (order Rhizobiales) was initially proposed by Satomi et al. (2002), and the type species *Terasakiella pusilla* was isolated from a putrid infusion of a marine shellfish (Terasaki, 1973). To our knowledge, prior to our study, representatives of the genus *Terasakiella* have not been associated with insect symbiosis. However, our *Terasakiella* representative sequence in *Acromyrmex coronatus* presented high identity with *Bartonella* (98.64%) and *Liberibacter* (98.86%), and therefore, the Rhizobiales sequences we found represent closely related bacterial species that have already been proposed (Sapountzis et al., 2018) to mediate the nutrition of leafcutters and other attines using atmospheric nitrogen. Our finding that South American leafcutters have nearly the same bacterial mutualists as Central American leafcutters indicates that the proposed strategy for nitrogen supplementation is a general and widespread one for these ants.

We also found high proportions of bacterial representatives in the genus *Mesoplasma* (order Entomoplasmatales) associated only with *Acromyrmex* species. The number of 16S sequences within *Mesoplasma* represented 30% to 65% of that found in the libraries, rivaling the 30% to 60% sequences represented by *Terasakiella*. Bacteria in the *Mesoplasma* genus may protect Ponerinae ants from infection by other prokaryotes (de Oliveira et al., 2016) and have been previously proposed to be parasites, opportunists, or permanent mutualists of *Atta texana* (Meirelles et al., 2016). Our representative *Mesoplasma* sequences obtained from *Acromyrmex coronatus* and *Acromyrmex rugosus* libraries were compared with the

Mesoplasma sequence (GenBank accession # KT248001) extracted from *Atta texana* by Meirelles et al. (2016). We observed 98.47% and 98.98% BLASTn identities, respectively.

The *Mesoplasma* sequence EntAcro1 associated with *Acromyrmex* ants from Gamboa, Panama (Sapountzis et al., 2015) showed 99.57% and 99.78% BLASTn identities with the *Mesoplasma* representative sequences in *Acromyrmex coronatus* and *Acromyrmex rugosus* libraries, respectively, showing that symbiosis with Entomoplasmatales is geographically widespread. However, not one *Mesoplasma* sequence was detected in the four *Atta* libraries encompassing 865,516 16S reads, indicating that these two *Atta* colonies were not associated with *Mesoplasma*. Both *Atta laevigata* and *Atta sexdens* colonies were healthy and very active, and they were apparently, able to produce ant biomass without association with Entomoplasmatales. This finding challenges the hypothesis that additional energy generated from such associations are necessary for leafcutters to reach large-scale insect biomass production.

Two bacterial genera, *Rhodovulum* and *Wolbachia*, were found in all libraries and were represented by a relatively small number of sequences. The genus *Rhodovulum* was previously found in seawater samples from the east coast of India (Visakhapatnam) (Kumar et al., 2008) and in mud collected from a mangrove forest located in Khola, India (Srinivas et al., 2006). After obtaining the draft genome sequence of *Rhodovulum* sp., Khatri et al. (2012) found 24 genes related to nitrogen metabolism, which corroborated the findings of previous studies where endophytic diazotrophic bacteria were associated with corn plants (GenBank accession # AB079628) (Roesch et al., 2007). However, until the present study, there were no previous associations of this bacterium with insects found.

Several reports associate microbes within the *Wolbachia* genus with ants. Kautz et al. (2013) analyzed 95 ant species and found that *Wolbachia* appeared to infect related hosts

from the same geographic region and that the bacteria can be transmitted to offspring (Ramalho et al., 2018). Recent studies with pharaoh ants have shown that colonies infected by *Wolbachia* can undergo an acceleration in the life cycle, causing rapid expansion of colonies and increased spread of *Wolbachia* populations (Singh & Linksvayer, 2020).

Is it likely that different strains of *Wolbachia* infect *Atta* and *Acromyrmex* (van Borm et al., 2001). This microbe may be present in the intestinal lumen and fecal droplets of ants, suggesting that *Wolbachia* may have a mutualistic nutritional role in the ant-fungus symbiosis of *Acromyrmex octospinosus* (Andersen et al., 2012).

Physiological analysis is important to demonstrate various bacterial functions, such as the ability to fix nitrogen. However, some bacteria cannot be grown using standard culture media because they require special conditions that are not provided *in vitro*, or because they are difficult to identify phenotypically (Colwell, 1993; Vega-Orellana et al., 2017). Therefore, in an attempt to highlight some aspects of microbial physiology, our study isolated bacterial colonies of the abdomen after sanitization of ants and compared them with the NGS 16S libraries (Table 1), to verify differences between cultivable and non-cultivable microbiota and associate them with possible functions.

We isolated bacteria from the genus *Ralstonia* (Order Burkholderiales) and found that its 16S sequence was nearly identical to those detected in *Atta sexdens* libraries. Bacteria in the *Ralstonia* genus have already been observed in fungal gardens of *Atta* species (Suen et al., 2010), and associated with the refuse dumps of *Atta cephalotes* ants (Ortiz-Reyes et al., 2016) and the larval intestines of *Atta cephalotes* (Zhukova et al., 2017). The presence of the *nifH* gene and the growth positivity in N-free culture medium demonstrate the ability of our *Ralstonia* isolates obtained from *Atta sexdens*, *Atta laevigata*, and *Acromyrmex coronatus* to fix N₂.

In *Atta laevigata*, we detected *Methylobacterium* (Order Rhizobiales) in the 16S library and our isolates belonging to this genus were found able to fix N₂. Bacteria in the same genus have already been found to be associated with the cuticle of *Acromyrmex coronatus* (Martinez et al., 2019), pupae of *Atta cephalotes* (Zhukova et al., 2017), and the intestines of *Tetraponera*. This suggests that these bacteria have been domesticated by the ants as endosymbionts that recycle N₂ (van Borm et al., 2002).

We also found *Pseudomonas* isolates in *Acromyrmex rugosus*, and bacteria in this genus have been previously isolated from the cuticle of *Acromyrmex coronatus* (Martinez et al., 2019) and molecularly described in both *Acromyrmex echinator* and *Atta cephalotes* larvae (Zhukova et al., 2017).

Acinetobacter isolates were found in the four analyzed ant species and detected in the 16S library of *Atta laevigata* and *Acromyrmex coronatus*. Isolates of this genus have already been reported in the cuticle of *Acromyrmex coronatus* (Martinez et al., 2019), and intestines of *Atta cephalotes* larvae (Zhukova et al., 2017), and they are associated with ants of the genera *Polyrhachis* (Ramalho et al., 2017) and *Pheidole* (Martins & Moreau, 2020). They are also found in thorax, abdomen, and head of *Atta texana* queens (Meirelles et al., 2016). This bacterial genus is thought to be a symbiont associated with the digestive tract of parasitoid wasp *Nasonia*, although, the exact mechanisms are not yet clear (Brucker & Bordenstein, 2012).

In summary, diazotrophic isolates in the genera *Ralstonia* or *Methylobacterium* were consistently isolated from the leafcutter colonies sampled over 24 months. These bacteria are commonly associated with ants, and it is conceivable that they may mediate leafcutter nutrition for atmospheric nitrogen. *Ralstonia* and *Methylobacterium* corresponded to 10 out of the 12 nitrogen-fixing isolates, both in *Atta* and *Acromyrmex* ants; this high frequency

suggests that these isolates are often associated with leaf-cutting ants, possibly in a nutritional role.

Sequences from five of the 21 isolates (Table 1) had no hits within the NGS 16S libraries, possibly because sequencing V3 and V4 regions of the 16S gene were not sufficient for complete taxonomic identification (Zhang & You, 2018), but the majority of the isolates could be identified by NGS. However, genera corresponding to predominant sequences in NGS libraries (*Liberibacter*, *Terasakiella*, *Bartonella*, *Rhodovulum*, and *Wolbachia*) could not be isolated, since they corresponded to microbes that were not cultivable.

Based on our results as compared with previously reported ones, nutrition from atmospheric nitrogen is a key factor for large-scale leafcutter biomass production, and it is based on three complementary strategies involving mediation by bacterial mutualists: (I) unculturable bacteria (Rhizobiales order) located in ants (Sapountzis et al., 2015) and spread over a wide geographic region; (II) culturable *Klebsiella* genus living in the fungus garden (Pinto-Tomás et al., 2009); and (III) culturable bacteria in the genera *Ralstonia* and *Methylobacterium* associated with leafcutter abdomens, as described in the present investigation. Multiple strategies to feed on atmospheric nitrogen may represent an advantage to ant nutrition because they are based on non-competitive colonization of distinct environments within the leafcutter system by diazotrophs.

DATA ACCESSIBILITY

Sequences produced for this study are available in the NCBI Sequence Read Archive (BioProject: PRJNA657082, Biosample accessions: SAMN15815005-SAMN15815012, SRA accessions: SRR12534637-SRR12534644) and Sanger sequences from each isolate were deposited in the GenBank database with accession numbers MT893178-MT893200.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank André Rodrigues, Mario Sergio Palma, Bibiana Monson de Souza, Fernando Carlos Pagnocca, Daiane Polezel, Mariana Lyra, Henrique Ferreira, and Thiago Lima for providing logistic support. Sergio Kakazu and Corina Barrera helped identify the ant species.

FUNDING

This study was financed by FAPESP (2017/04824-9 and 2019/03746-0), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES, Finance Codes 001, 88887.468201/2019-00 and 2016/18380-2), by Capes-PrInt/Unesp Program (88881.333660/2019-01), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (155742/2018-3).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no competing interests.

REFERENCES

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).

Andersen, S. B., Boye, M., Nash, D. R., & Boomsma, J. J. (2012). Dynamic Wolbachia prevalence in *Acromyrmex* leaf-cutting ants: potential for a nutritional symbiosis. *Journal of evolutionary biology*, 25(7), 1340-1350. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02521.x>.

Billen, J., & Buschinger, A. (2000). Morphology and ultrastructure of a specialized bacterial pouch in the digestive tract of *Tetraponera* ants (Formicidae, Pseudomyrmecinae). *Arthropod Structure & Development*, 29(3), 259-266. [https://doi.org/10.1016/S1467-8039\(00\)00029-3](https://doi.org/10.1016/S1467-8039(00)00029-3).

Bisch, G., Neuvonen, M. M., Pierce, N. E., Russell, J. A., Koga, R., Sanders, J. G.,... & Andersson, S. G. (2018). Genome evolution of Bartonellaceae symbionts of ants at the opposite ends of the trophic scale. *Genome biology and evolution*, 10(7), 1687-1704. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy126>.

Borgmeier T. (1959) Revision der Gattung *Atta* Fabricius (Hymenoptera, Formicidae). *Studia ent.* 2, 321-390.

Brucker, R. M., & Bordenstein, S. R. (2012). The roles of host evolutionary relationships (genus: *Nasonia*) and development in structuring microbial communities. *Evolution*:

International Journal of Organic Evolution, 66(2), 349-362. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01454.x>.

Cafaro, M. J., Poulsen, M., Little, A. E., Price, S. L., Gerardo, N. M., Wong, B.,... & Currie, C. R. (2011). Specificity in the symbiotic association between fungus-growing ants and protective *Pseudonocardia* bacteria. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1713), 1814-1822. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.2118>.

Colwell, R. R. (1993). Nonculturable but still viable and potentially pathogenic. *Zentbl. Bacteriol.*, 279, 154-158.

Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J.,... & Tiedje, J. M. (2009). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic acids research*, 37(suppl_1), D141-D145. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn879>.

de Oliveira, T. B., Ferro, M., Bacci, M., de Souza, D. J., Fontana, R., Delabie, J. H. C., & Silva, A. (2016). Bacterial communities in the midgut of ponerine ants (Hymenoptera: Formicidae: (Ponerinae). *Sociobiology*, 63(1), 637-644. <https://doi.org/10.13103/sociobiology.v63il.882>.

Döbereiner, J., Baldani, V. L. D., & Baldani, J. I. (1995). Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. *Embrapa SPI*.

Döbereiner, J., Andrade, V. D. O., & Baldani, V. L. D. (1999). Protocolos para preparo de meios de cultura da Embrapa Agrobiologia. *Embrapa Agrobiologia-Docmentos (INFOTECA-E)*.

Fred, E. B., & Waksman, S. A. (1928). Yeast extract-mannitol agar for laboratory manual of general microbiology. *New York: McGraw*.

Gonçalves, C. R. (1961). O gênero *Acromyrmex* no Brasil (Hym. Formicidae). *Studia Entomologica*, 4(1-4), 113-180.

Hall, T. A. (1999, January). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98). [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000.

Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & Dewaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>.

Hölldobler, B., & Wilson, E. O. (1990). The ants. Harvard University Press, 733.

Hu, Y., Sanders, J. G., Łukasik, P., D'Amelio, C. L., Millar, J. S., Vann, D. R.,... & Pierce, N. E. (2018). Herbivorous turtle ants obtain essential nutrients from a conserved nitrogen-

recycling gut microbiome. *Nature communications*, 9(1), 1-14.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-03357-y>.

Huang, X., & Madan, A. (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome research*, 9(9), 868-877. <https://doi.org/10.1101/gr.9.9.868>.

Khatri, I., Korpole, S., Subramanian, S., & Pinnaka, A. K. (2012). Draft genome sequence of *Rhodovulum* sp. strain PH10, a phototrophic alphaproteobacterium isolated from a soil sample of mangrove of Namkhana, India. <https://doi.org/10.1128/JB.01695-12>.

Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., & Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic acids research*, 30(14), 3059–3066. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>.

Kautz, S., Rubin, B. E., & Moreau, C. S. (2013). Bacterial infections across the ants: frequency and prevalence of *Wolbachia*, *Spiroplasma*, and *Asaia*. *Psyche*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/936341>.

Kneip, C., Lockhart, P., Voß, C., & Maier, U. G. (2007). Nitrogen fixation in eukaryotes—new models for symbiosis. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 55. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-55>.

Kumar, P. A., Aparna, P., Srinivas, T. N. R., Sasikala, C., & Ramana, C. V. (2008). *Rhodovulum kholense* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(7), 1723-1726. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65620-0>.

Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, 115-175.

Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*, 9(4), 357. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>.

Liberti, J., Sapountzis, P., Hansen, L. H., Sørensen, S. J., Adams, R. M., & Boomsma, J. J. (2015). Bacterial symbiont sharing in *Megalomyrmex* social parasites and their fungus-growing ant hosts. *Molecular Ecology*, 24(12), 3151-3169. <https://doi.org/10.1111/mec.13216>.

Martins, C., & Moreau, C. S. (2020). Influence of host phylogeny, geographical location and seed harvesting diet on the bacterial community of globally distributed *Pheidole* ants. *PeerJ*, 8, e8492. <https://doi.org/10.7717/peerj.8492>.

Martins Jr, J., Solomon, S. E., Mikheyev, A. S., Mueller, U. G., Ortiz, A., & Bacci Jr, M. (2007). Nuclear mitochondrial-like sequences in ants: evidence from *Atta cephalotes* (Formicidae: Attini). *Insect molecular biology*, 16(6), 777-784. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2007.00771.x>.

- Martinez, A. F. C., de Almeida, L. G., Moraes, L. A. B., & Cônsoli, F. L. (2019). Microbial Diversity and Chemical Multiplicity of Culturable, Taxonomically Similar Bacterial Symbionts of the Leaf-Cutting Ant *Acromyrmex coronatus*. *Microbial ecology*, 77(4), 1067-1081. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01341-7>.
- Meirelles, L. A., McFrederick, Q. S., Rodrigues, A., Mantovani, J. D., de Melo Rodovalho, C., Ferreira, H.,... & Mueller, U. G. (2016). Bacterial microbiomes from vertically transmitted fungal inocula of the leaf-cutting ant *Atta texana*. *Environmental Microbiology Reports*, 8(5), 630-640. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12415>.
- Naranjo, E., Merfa, M. V., Ferreira, V., Jain, M., Davis, M. J., Bahar, O.,... & De La Fuente, L. (2019). *Liberibacter crescens* biofilm formation in vitro: Establishment of a model system for pathogenic ‘*Candidatus Liberibacter* spp.’. *Scientific reports*, 9(1), 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41495-5>.
- Nardi, J. B., Mackie, R. I., & Dawson, J. O. (2002). Could microbial symbionts of arthropod guts contribute significantly to nitrogen fixation in terrestrial ecosystems?. *Journal of Insect Physiology*, 48(8), 751-763. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(02\)00105-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(02)00105-1).
- Neuvonen, M. M., Tamarit, D., Näslund, K., Liebig, J., Feldhaar, H., Moran, N. A.,... & Andersson, S. G. (2016). The genome of Rhizobiales bacteria in predatory ants reveals urease gene functions but no genes for nitrogen fixation. *Scientific reports*, 6, 39197. <https://doi.org/10.1038/srep39197>.
- Ortiz-Reyes, A., Giraldo-Jaramillo, T. M & Moreno-Herrera, C. X. (2016). Análisis molecular de las bacterias asociadas a los depósitos de desechos de *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 42(2). <https://doi.org/10.25100/socolen.v42i2.6687>.
- Pinto-Tomás, A. A., Anderson, M. A., Suen, G., Stevenson, D. M., Chu, F. S., Cleland, W. W.,... & Currie, C. R. (2009). Symbiotic nitrogen fixation in the fungus gardens of leaf-cutter ants. *Science*, 326(5956), 1120-1123. <https://doi.org/10.1126/science.1173036>.
- Postgate, J.R. (1978) Nitrogen Fixation. E. Arnolg, London.
- Quinlan, R. J., & Cherrett, J. M. (1979). The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). *Ecological Entomology*, 4(2), 151-160. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.1979.tb00570.x>.
- Rabeling, C., Brown, J. M., & Verhaagh, M. (2008). Newly discovered sister lineage sheds light on early ant evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(39), 14913-14917. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806187105>.
- Ramvalho, M. O., Bueno, O. C., & Moreau, C. S. (2017). Microbial composition of spiny ants (Hymenoptera: Formicidae: Polyrhachis) across their geographic range. *BMC Evolutionary Biology*, 17(1), 96. <https://doi.org/10.1186/s12862-017-0945-8>.

Ramalho, M. O., Vieira, A. S., Pereira, M. C., Moreau, C. S., & Bueno, O. C. (2018). Transovarian transmission of Blochmannia and Wolbachia endosymbionts in the Neotropical weaver ant *Camponotus textor* (Hymenoptera, Formicidae). *Current microbiology*, 75(7), 866-873. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1459-3>.

Roberts, G. P., MacNEIL, T. A. N. Y. A., MacNEIL, D. O. U. G. L. A. S., & Brill, W. J. (1978). Regulation and characterization of protein products coded by the nif (nitrogen fixation) genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 136(1), 267-279.

Roesch, L. F. W., Passaglia, L. M. P., Bento, F. M., Triplett, E. W., & Camargo, F. A. O. (2007). Diversity of diazotrophic endophytic bacteria associated with maize plants. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 31(6), 1367-1380. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832007000600015>.

Russell, J. A., Sanders, J. G., & Moreau, C. S. (2017). Hotspots for symbiosis: function, evolution, and specificity of ant-microbe associations from trunk to tips of the ant phylogeny (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecological News*, 24, 43-69. <https://doi.org/10.1128/AEM.01336-10>.

Sabino, D. C. C., Ferreira, J. S., Guimarães, S. L., Baldani, V. L. D., & da Conquista, V. (2012). Bactérias diazotróficas como promotoras do desenvolvimento inicial de plântulas de arroz. *Enciclopédia Biosfera*, 8(15), 2337-2345.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.

Sampaio, J. P., Gadanho, M., Santos, S., Duarte, F. L., Pais, C., Fonseca, A., & Fell, J. W. (2001). Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodospiridium*: *Rhodospiridium kratochvilovae* and related anamorphic species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2), 687-697.

Sapountzis, P., Zhukova, M., Hansen, L. H., Sørensen, S. J., Schiøtt, M., & Boomsma, J. J. (2015). *Acromyrmex* leaf-cutting ants have simple gut microbiota with nitrogen-fixing potential. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(16), 5527-5537. <https://doi.org/10.1128/AEM.00961-15>.

Sapountzis, P., Zhukova, M., Shik, J. Z., Schiøtt, M., & Boomsma, J. J. (2018). Reconstructing the functions of endosymbiotic Mollicutes in fungus-growing ants. *Elife*, 7, e39209. <https://doi.org/10.7554/eLife.39209.001>.

Satomi, M., Kimura, B., Hamada, T., Harayama, S., & Fujii, T. (2002). Phylogenetic study of the genus *Oceanospirillum* based on 16S rRNA and gyrB genes: emended description of the genus *Oceanospirillum*, description of *Pseudospirillum* gen. nov., *Oceanobacter* gen. nov. and *Terasakiella* gen. nov. and transfer of *Oceanospirillum jannaschii* and *Pseudomonas stanieri* to *Marinobacterium* as *Marinobacterium jannaschii* comb. nov. and

Marinobacterium stanieri comb. no. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(3), 739-747. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.01427-0>.

Silva, A., Bacci Jr, M., de Siqueira, C. G., Bueno, O. C., Pagnocca, F. C., & Hebling, M. J. A. (2003). Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. *Journal of Insect Physiology*, 49(4), 307-313. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(03\)00004-0](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(03)00004-0).

Singh, R., & Linksvayer, T. A. (2020). Wolbachia-infected ant colonies have increased reproductive investment and an accelerated life cycle. *Journal of Experimental Biology*, 223(9). <https://doi.org/10.1242/jeb.220079>.

Somera, A. F., Lima, A. M., dos Santos-Neto, Á. J., Lanças, F. M., & Bacci, M. (2015). Leaf-cutter ant fungus gardens are biphasic mixed microbial bioreactors that convert plant biomass to polyols with biotechnological applications. *Applied and environmental microbiology*, 81(13), 4525-4535. <https://doi.org/10.1128/AEM.00046-15>.

Srinivas, T. N. R., Kumar, P. A., Sasikala, C., Ramana, C. V., Süling, J., & Imhoff, J. F. (2006). *Rhodovulum marinum* sp. nov., a novel phototrophic purple non-sulfur alphaproteobacterium from marine tides of Visakhapatnam, India. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(7), 1651-1656. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.64005-0>.

Suen, G., Scott, J. J., Aylward, F. O., Adams, S. M., Tringe, S. G., Pinto-Tomás, A. A.,... & Goodwin, L. A. (2010). An insect herbivore microbiome with high plant biomass-degrading capacity. *PLoS genet*, 6(9), e1001129. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001129>.

Terasaki, Y. (1973). Studies on the genus spirillum Ehrenberg-2-Comments on type and reference strains of Spirillum and description of new species and new subspecies. *Bull Suzugamine Women's Coll Nat Sci* 17:1-71.

Teseo, S., van Zweden, J. S., Pontieri, L., Kooij, P. W., Sørensen, S. J., Wenseleers, T.,... & Sapountzis, P. (2019). The scent of symbiosis: gut bacteria may affect social interactions in leaf-cutting ants. *Animal Behaviour*, 150, 239-254. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2018.12.017>.

Tufts, D. M., & Bextine, B. (2009). Identification of bacterial species in the hemolymph of queen *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *Environmental entomology*, 38(5), 1360-1364. <https://doi.org/10.1603/022.038.0502>.

Ueda, T., Suga, Y., Yahiro, N., & Matsuguchi, T. (1995). Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. *Journal of bacteriology*, 177(5), 1414-1417. <https://doi.org/10.1128/jb.177.5.1414-1417.1995>.

van Borm, S., Wenseleers, T., Billen, J., & Boomsma, J. J. (2001). Wolbachia in leafcutter ants: a widespread symbiont that may induce male killing or incompatible matings. *Journal of Evolutionary Biology*, 14(5), 805-814. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2001.00321.x>

van Borm, S., Buschinger, A., Boomsma, J. J., & Billen, J. (2002). Tetraponera ants have gut symbionts related to nitrogen-fixing root-nodule bacteria. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 269(1504), 2023-2027. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2101>.

Vega-Orellana, O., Poveda, J. B., Rosales, R. S., Bradbury, J. M., Poveda, C. G., Mederos-Iriarte, L. E.,... & Ramírez, A. S. (2017). Comparison of different NAT assays for the detection of microorganisms belonging to the class Mollicutes. *BMC veterinary research*, 13(1), 195. <http://doi.org/10.1186/s12917-017-1116-2>.

Vieira, A. S., Ramalho, M. O., Martins, C., Martins, V. G., & Bueno, O. C. (2017). Microbial communities in different tissues of *Atta sexdens rubropilosa* leaf-cutting ants. *Current microbiology*, 74(10), 1216-1225. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1307-x>.

Wang, N., Pierson, E. A., Setubal, J. C., Xu, J., Levy, J. G., Zhang, Y.,... & Martins Jr, J. (2017). The *Candidatus Liberibacter*-host interface: insights into pathogenesis mechanisms and disease control. *Annual review of phytopathology*, 55, 451-482. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035513>.

Wood, D. E., & Salzberg, S. L. (2014). Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome biology*, 15(3), 1-12. <http://genomebiology.com/2014/15/3/R46>.

Zhang, H., & You, C. (2018). A universal PCR method and its application in sequence-based identification of microorganisms in dairy. *International Dairy Journal*, 85, 41-48. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.05.004>.

Zhbannikov, I. Y., Hunter, S. S., Foster, J. A., & Settles, M. L. (2017, August). SeqyClean: a pipeline for high-throughput sequence data preprocessing. In Proceedings of the 8th ACM International Conference on Bioinformatics, Computational Biology, and Health Informatics (pp. 407-416). <https://doi.org/10.1145/3107411.3107446>.

Zhukova, M., Sapountzis, P., Schiøtt, M., & Boomsma, J. J. (2017). Diversity and transmission of gut bacteria in *Atta* and *Acromyrmex* leaf-cutting ants during development. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1942. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01942>.

SUPPORTING INFORMATION

Bacterial Genus	<i>Atta laevigata</i>	<i>Atta sexdens</i>	<i>Acromyrmex rugosus</i>	<i>Acromyrmex coronatus</i>	Total	%
<i>Liberibacter</i>	96,628	1,229	3,396	5,708	106,961	37.80
<i>Terasakiella</i>	563	29	29,254	56,345	86,182	30.45
<i>Bartonella</i>	151	76,955	44	151	77,301	27.32
<i>Rhodovulum</i>	1,419	968	2,411	2,408	7,206	2.55
<i>Rhodomicrobium</i>	364	59	85	180	688	0.24
<i>Filomicrobium</i>	280	99	73	147	599	0.21
<i>Sphingopyxis</i>	169	129	86	101	485	0.17
<i>Rhizobium</i>	169	55	42	105	371	0.13
<i>Blastochloris</i>	112	41	54	101	308	0.11
<i>Candidatus Phycorickettsia</i>	103	91	41	66	301	0.11
<i>Wolbachia</i>	15	16	2	263	296	0.10
<i>Hyphomicrobium</i>	110	53	28	72	263	0.09
<i>Orientia</i>	69	95	39	52	255	0.09
<i>Pseudomonas</i>	5	191	9	16	221	0.08
<i>Zymomonas</i>	39	68	25	37	169	0.06
<i>Sinorhizobium</i>	82	14	14	53	163	0.06
<i>Acinetobacter</i>	27	38	9	35	109	0.04
<i>Nitratireductor</i>	90	12	1	1	104	0.04
<i>Agrobacterium</i>	40	43	8	12	103	0.04
<i>Devosia</i>	13	27	2	53	95	0.03
<i>Sphingomonas</i>	7	54	3	19	83	0.03
<i>Klebsiella</i>	57	6	2	16	81	0.03
<i>Methylobacterium</i>	13	18	5	26	62	0.02
<i>Octadecabacter</i>	11	21	6	20	58	0.02
<i>Massilia</i>	1	15	1	35	52	0.02
<i>Tistrella</i>	21	11	5	2	39	0.01
<i>Hirschia</i>	11	9	3	10	33	0.01
<i>Thalassospira</i>	10	6	5	10	31	0.01
<i>Chelativorans</i>	1	1	1	24	27	0.01
<i>Bacillus</i> <firmicutes>	7	4	8	6	25	0.01
<i>Mycobacterium</i>	9	3	2	10	24	0.01
<i>Halocynthiaibacter</i>	8	11	2	3	24	0.01
<i>Gemmobacter</i>	6	8	3	6	23	0.01
<i>Ehrlichia</i>	10	7	4	1	22	0.01
<i>Maricaulis</i>	6	5	3	7	21	0.01
<i>Brevundimonas</i>	6	11	1	3	21	0.01
<i>Clostridium</i>	1	2	8	5	16	0.01
<i>Neorhizobium</i>	7	5	1	3	16	0.01
<i>Rhodopseudomonas</i>	2	10	2	2	16	0.01
<i>Methylocella</i>	5	2	4	4	15	0.01
<i>Sphingobium</i>	2	6	2	3	13	0.005
<i>Phenylobacterium</i>	6	4	1	2	13	0.005
<i>Rickettsia</i>	2	3	1	6	12	0.004
<i>Asticcacaulis</i>	4	5	1	2	12	0.004
<i>Desulfurella</i>	2	1	1	6	10	0.004
<i>Staphylococcus</i>	2	3	3	2	10	0.004
<i>Lactobacillus</i>	1	3	2	3	9	0.003
<i>Haemophilus</i>	1	4	2	1	8	0.003
<i>Candidatus Nucleicultrix</i>	1	1	1	4	7	0.002
<i>Candidatus Fokinia</i>	1	4	1	1	7	0.002
<i>Aeromonas</i>	2	1	1	2	6	0.002
<i>Parasaccharibacter</i>	1	1	1	2	5	0.002
<i>Desulfobacca</i>	2	1	1	1	5	0.002
<i>Rhodobacter</i>	1	1	2	1	5	0.002
Total	100,675	80,459	36,703	66,154	282,991	100%

TABLE S1. Number and percentage of sequences in bacterial genera found in all sanitized ant samples. *Liberibacter*, *Terasakiella*, *Bartonella* and *Rhodovulum* accounted for 98.11% of the sequences.

Bacterial Genus	<i>Atta laevigata</i>	<i>Atta sexdens</i>	<i>Acromyrmex rugosus</i>	<i>Acromyrmex coronatus</i>	Total	%
<i>Liberibacter</i>	113,583	1,371	10,438	3,444	128,836	39.26
<i>Bartonella</i>	155	100,022	11,516	34	111,727	34.05
<i>Terasakiella</i>	490	67	38,815	31,416	70,788	21.57
<i>Rhodovulum</i>	996	1,943	2,782	2,328	8,049	2.45
<i>Wolbachia</i>	4	101	944	12	1,061	0.32
<i>Nocardioidea</i>	38	46	862	44	990	0.30
<i>Rhodomicrobium</i>	367	67	140	119	693	0.21
<i>Filomicrobium</i>	272	114	114	70	600	0.18
<i>Bacillus</i> <Firmicutes>	466	43	4	5	518	0.16
<i>Sphingopyxis</i>	115	136	81	87	419	0.13
<i>Rhizobium</i>	238	42	95	33	408	0.12
<i>Corynebacterium</i>	253	7	42	4	306	0.09
<i>Hyphomicrobium</i>	122	69	58	42	291	0.09
<i>Blastochloris</i>	129	33	68	59	289	0.09
<i>Orientia</i>	61	126	63	36	286	0.09
<i>Candidatus Phycorickettsia</i>	88	87	45	40	260	0.08
<i>Sphingomonas</i>	42	87	12	26	167	0.05
<i>Zimomonas</i>	36	64	34	21	155	0.05
<i>Sinorhizobium</i>	73	17	28	20	138	0.04
<i>Pseudomonas</i>	42	10	5	81	138	0.04
<i>Agromyces</i>	1	3	110	17	131	0.04
<i>Mycobacterium</i>	12	82	14	3	111	0.03
<i>Agrobacterium</i>	13	68	17	13	111	0.03
<i>Acinetobacter</i>	36	46	9	7	98	0.03
<i>Christensenella</i>	3	77	5	13	98	0.03
<i>Streptococcus</i>	4	76	8	3	91	0.03
<i>Micrococcus</i>	1	2	34	54	91	0.03
<i>Tessaracoccus</i>	31	1	51	3	86	0.03
<i>Methylobacterium</i>	9	52	11	13	85	0.03
<i>Niastella</i>	4	11	68	2	85	0.03
<i>Negativicoccus</i>	2	20	8	43	73	0.02
<i>Pseudonocardia</i>	11	33	22	5	71	0.02
<i>Brucella</i>	37	3	15	16	71	0.02
<i>Devosia</i>	16	25	7	9	57	0.02
<i>Cutibacterium</i>	13	30	3	3	49	0.01
<i>Ornithinimicrobium</i>	20	19	7	2	48	0.01
<i>Octadecabacter</i>	17	14	7	4	42	0.01
<i>Streptomyces</i>	2	9	30	1	42	0.01
<i>Flavisolibacter</i>	23	10	6	2	41	0.01
<i>Rickettsia</i>	1	33	1	5	40	0.01
<i>Massilia</i>	30	2	3	1	36	0.01
<i>Moraxella</i>	24	1	3	6	34	0.01
<i>Staphylococcus</i>	3	19	8	4	34	0.01
<i>Microbacterium</i>	1	5	16	8	30	0.01
<i>Klebsiella</i>	2	19	7	2	30	0.01
<i>Hirschia</i>	9	7	10	3	29	0.01
<i>Ketogulonicigenium</i>	2	15	5	3	25	0.01
<i>Lactobacillus</i>	6	3	6	9	24	0.01
<i>Thalassospira</i>	14	5	2	1	22	0.01
<i>Synechococcus</i>	1	10	1	8	20	0.01
<i>Clostridium</i>	5	5	4	4	18	0.01
<i>Flavonifractor</i>	5	2	4	7	18	0.01
<i>Halocynthiaibacter</i>	6	5	4	2	17	0.01
<i>Candidatus puniceispirillum</i>	3	1	6	6	16	0.005
<i>Bosea</i> <alphaproteobacteria>	2	3	10	1	16	0.005
<i>Candidatus nucleicultrix</i>	6	4	1	4	15	0.005
<i>Ehrlichia</i>	7	3	2	2	14	0.004
<i>Gemmobacter</i>	3	6	2	2	13	0.004
<i>Pseudolabrys</i>	7	2	2	1	12	0.004
<i>Asticcacaulis</i>	4	5	1	2	12	0.004
<i>Methilocella</i>	4	4	1	2	11	0.003
<i>Roseitalea</i>	2	1	1	6	10	0.003
<i>Erythrobacter</i>	3	2	3	1	9	0.003
<i>Rhodopseudomonas</i>	2	3	2	1	8	0.002
<i>Brevibacillus</i>	1	3	1	3	8	0.002
<i>Desulfurella</i>	5	1	1	1	8	0.002
<i>Parathodospirillum</i>	1	1	2	3	7	0.002
<i>Alteromonas</i>	1	1	2	1	5	0.002
<i>Methyloceanibacter</i>	1	1	1	1	4	0.001
Total	107,966	105,235	66,690	38,234	328,145	100%

TABLE S2. Number and percentage of sequences in bacterial genera found in all unsanitized ant species. *Liberibacter*, *Bartonella*, *Terasakiella*, *Rhodovulum* and *Wolbachia* accounted for 97.65% of the sequences.

<i>Microorganism</i>	Amount of isolates	Ant species
<i>Methylobacterium</i>	4	<i>Atta laevigata</i> (RC) <i>Atta Laevigata</i> (IT)
<i>Ralstonia</i>	6	<i>Atta sexdens</i> <i>Atta laevigata</i> (RC) <i>Atta Laevigata</i> (IT) <i>Atta sexdens</i>
Burkholderiales	6	<i>Acromyrmex coronatus</i> <i>Atta laevigata</i> (RC) <i>Atta Laevigata</i> (IT)
Actinomycetales	2	<i>Atta laevigata</i> (RC)
<i>Brachybacterium</i>	1	<i>Atta laevigata</i> (RC)
<i>Acinetobacter</i>	8	<i>Atta laevigata</i> (RC) <i>Atta Laevigata</i> (IT) <i>Atta sexdens</i> <i>Acromyrmex coronatus</i> <i>Acromyrmex rugosus</i>
Gamaproteobacteria	3	<i>Atta sexdens</i> <i>Acromyrmex rugosus</i>
<i>Pseudomonas</i>	2	<i>Acromyrmex rugosus</i>
Proteobacteria	10	<i>Atta laevigata</i> (RC) <i>Atta Laevigata</i> (IT) <i>Atta sexdens</i>
Total	42	

TABLE S3. Frequency of bacterial genera isolated from ant species. (RC) = Rio Claro and (IT) = Itirapina.

PARTE 3

CONCLUSÃO

Os métodos aplicados no presente estudo permitiram o conhecimento da diversidade das comunidades bacterianas presentes no abdômen das formigas cortadeiras analisadas.

Utilizando técnicas moleculares foi possível observar grupos de bactérias que são compartilhadas entre os quatro gêneros de formigas, sendo o grupo bacteriano predominante formado por Rhizobiales, provavelmente mutualistas diazotróficas. Porém, Entomoplasmatales pode eventualmente predominar em um gênero de *Acromyrmex*, agindo com parasita em infecções ocasionais. Baseado na comparação e similaridade de nossas bibliotecas com sequências depositadas em bancos de dados de bactérias intestinais presentes em cortadeiras sul-americanas, podemos supor que a associação das cortadeiras com bactérias em ambos os grupos é geograficamente difundida assim como a estratégia proposta para a suplementação de nitrogênio.

Isolamos e cultivamos dois representantes nos gêneros bacterianos *Methylobacterium*, a partir de formigas no gênero *Atta*, e *Ralstonia*, a partir de cortadeiras nos gêneros *Atta* e *Acromyrmex*. Estas bactérias são comprovadamente fixadoras de nitrogênio, pois apresentam genes *nifH* e crescimento a partir de nitrogênio atmosférico. Sendo assim, as formigas cortadeiras analisadas parecem depender de comunidades bacterianas para a produção de sua biomassa e nos parece que podem utilizar múltiplas estratégias, onde bactérias diazotróficas (cultiváveis e não cultiváveis) presentes no abdômen e no jardim de fungos podem fixar nitrogênio mediando a nutrição destas formigas.

ANEXOS

Figura 1. Espécies de formigas *Atta* e *Acromyrmex* utilizadas para estudos de associações bacterianas.



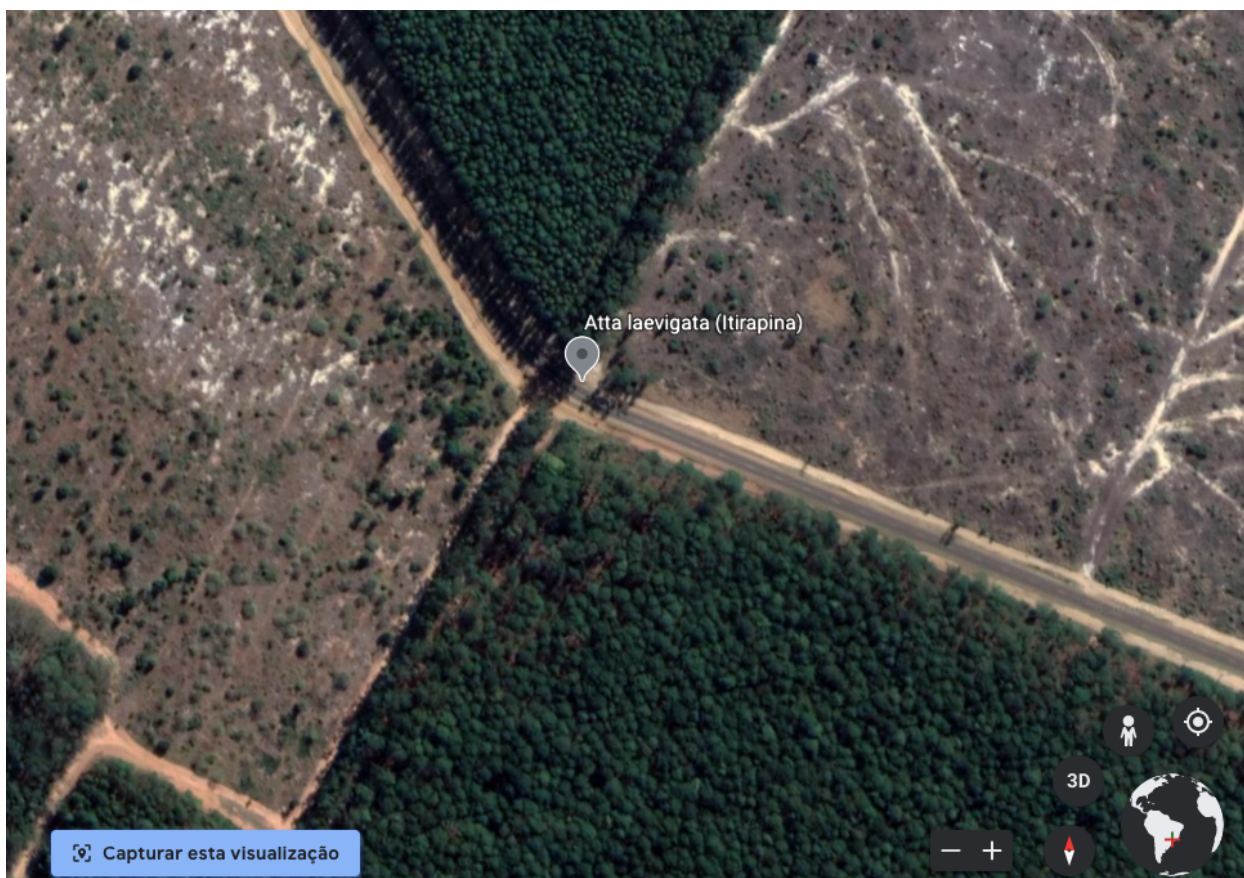
Fonte: o autor.

Figura 2. Localizações de coleta para *Atta* e *Acromyrmex* na cidade de Rio Claro



Fonte Adaptada de Google Earth.

Figura 3. Localização de coleta para *Atta laevigata* na cidade de Itirapina



Fonte Adaptada de Google Earth.

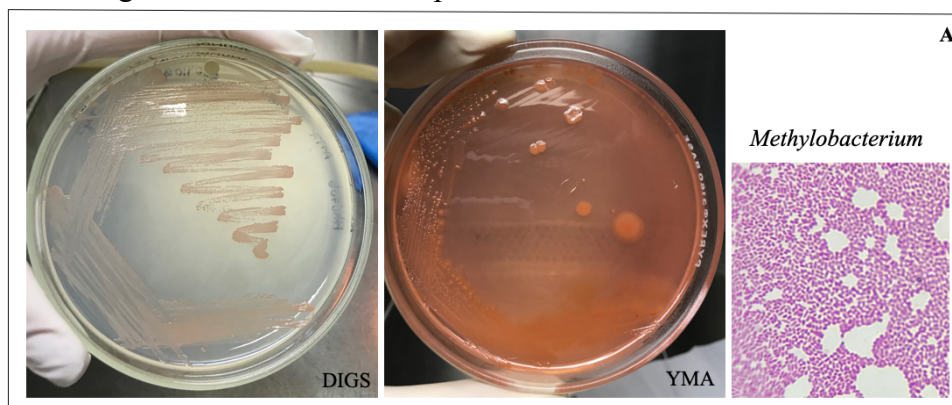
Tabela 1. Meios de cultura utilizados para crescimento de microrganismos (DIGS) e meio teste para fixação de nitrogênio (NFb).

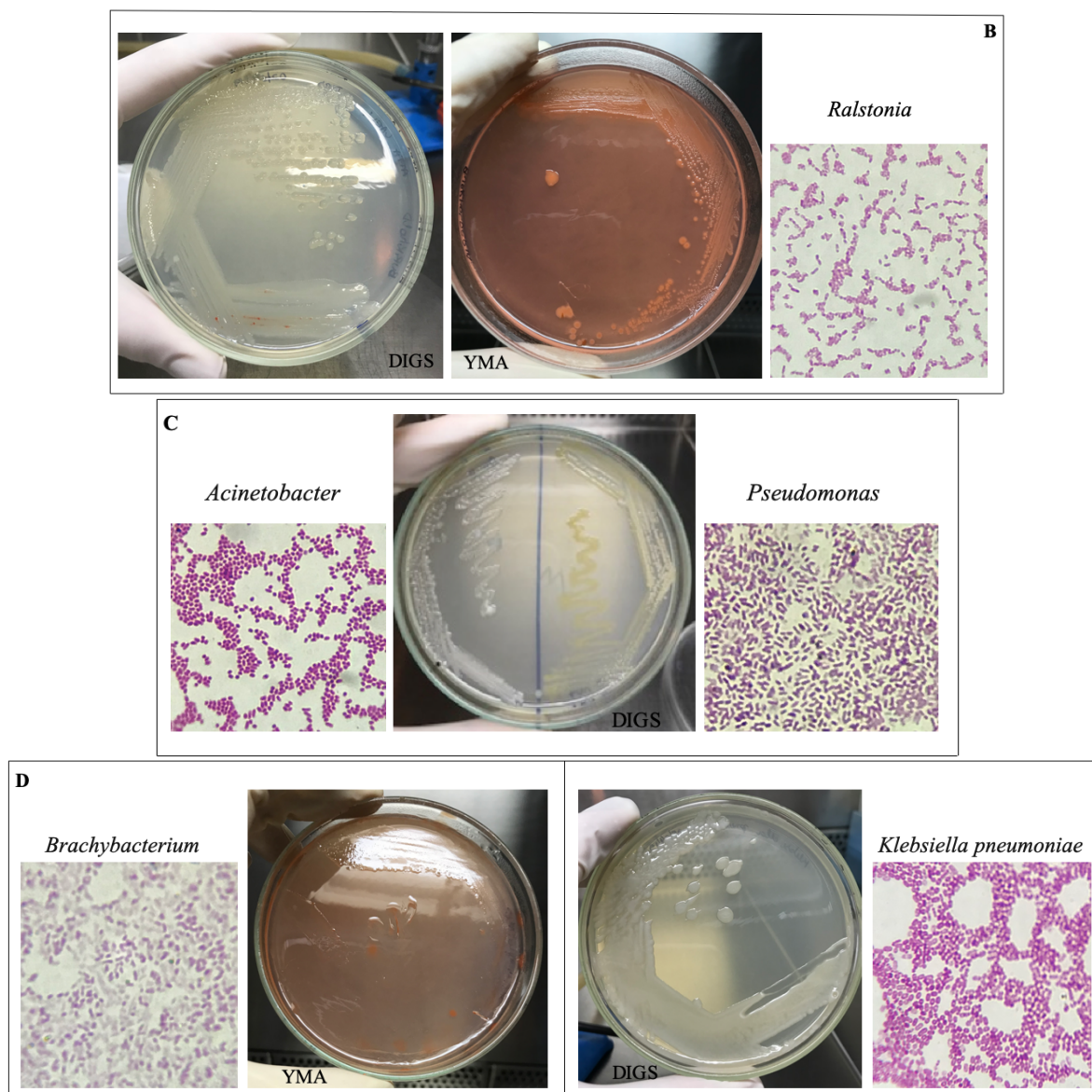
Tabela 1. Meios de cultura utilizados	
DIGS	
REAGENTE	QUANTIDADES
Glicose	2,0 g
Ácido Málico	2,0 g
Peptona Bacteriológica	1.5 g
Extrato de Levedura	2,0 g
Fosfato de Potássio Dibásico	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
Ácido Glutâmico	1.5 g
Agar	15 g
Água destilada	q.s.p 1000 mL
Ajustar pH para 6,0 com KOH ou H ₂ SO ₄	

Nfb	
REAGENTE	QUANTIDADES
Ácido málico	5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,02 g
KOH	4,5 g
Solução de azul de bromotimol (0,5% em 0,2 KOH)	2 mL
Solução de FeEDTA (solução 1,64%)	4 mL
Solução vitaminas	1 mL
solução de micronutrientes	2 mL
Água destilada	q.s.p 1000 mL
Ajustar pH para 6,8 com NaOH	
Solução de Micronutrientes	
REAGENTE	QUANTIDADES
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,04 g/L
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	1,2 g/L
H ₃ BO ₃	1,4 g/L
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	1,0 g/L
MnSO ₄ . H ₂ O	1,175 g/L
Solução de Vitamina	
Biotina	10 mg
Piridoxol HCl	20 mg
Água destilada	q.s.p 100 mL

Fonte: (Döbereiner; Baldani; Baldani, 1995; Döbereiner, Andrade; Baldani, 1999)

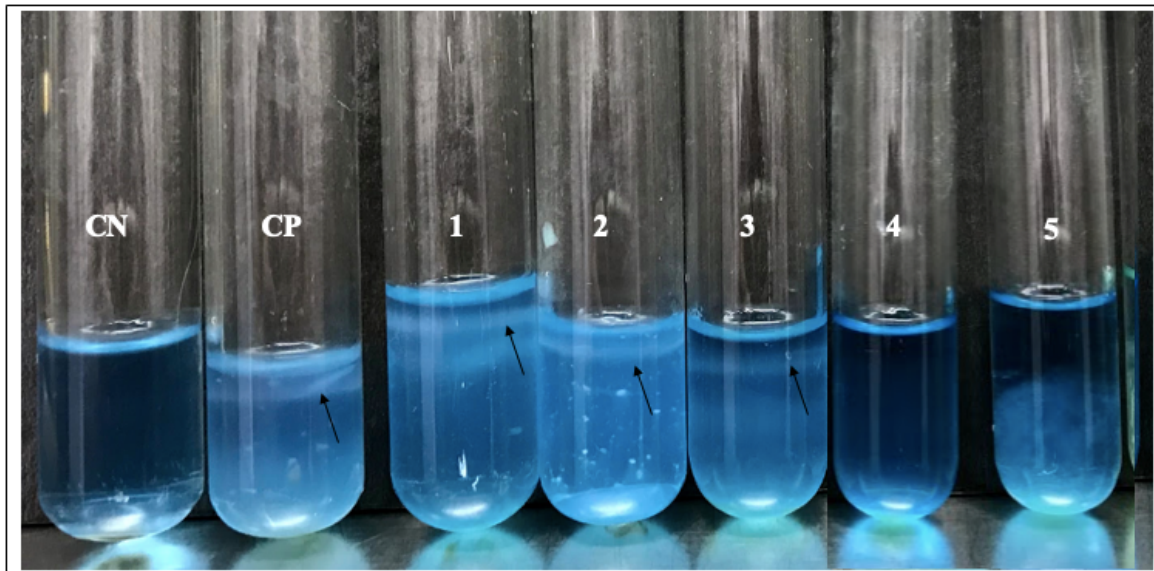
Figura 4. Microrganismos cultivados em placa de Petri nos meios YMA e DIGS





Microrganismos cultivados em placa de Petri nos meios YMA e DIGS e seus respectivos esfregaços corados pela técnica de Gram. A imagem das lâminas coradas foi capturada em microscopia com aumento de 1000x. Em (A) encontra-se *Methylobacterium* em cada um dos meios de cultura e a direita a coloração de Gram. Em (B), *Ralstonia* em cultivo em cada um dos meios e, à direita, a coloração de Gram. Em (C), a placa dividida ao meio, onde à esquerda encontra-se *Acinetobacter* em cultura e teste de Gram e, à direita *Pseudomonas*. Já em (D) observa-se, à esquerda, *Brachybacterium* em cultura e lâmina corada em Gram e, na direita, a bactéria *Klebsiella pneumoniae*, utilizada como controle nos testes moleculares e fisiológicos.

Figura 5. Fixação de nitrogênio observada pela formação da película em NFb.



Fixação de nitrogênio observada pela formação da película em NFb. (CN) Meio de cultura sem inóculo, (CP) Controle positivo *Klebsiella Pneumoniae*, (1) *Methylobacterium*, (2) *Ralstonia*, (3) *Pseudomonas*, (4) *Brachybacterium* e (5) *Acinetobacter*.

As setas em (1, 2 e 3) demonstram a película indicando positividade para a fixação de nitrogênio e (4 e 5) isolados negativos para fixação de nitrogênio.

Tabela 2. Condições para PCR e Sequenciamento

Par de <i>primer</i> 5'- 3' / condições para PCR	Gene	Referência
ANT-F (ATTCATTCTTATCTTGAAATATTATTTC) ANT-R (TTCATAAGTTCAGTATCATTGGTG) Desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguida de 30 ciclos (94 °C por 1 min, 47 °C por 1 min, 68 °C por 2 min) e extensão final por 15 min a 68 °C	COI / COII	MARTINS Jr et al., 2007
27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) Desnaturação inicial 95 °C por 3 min, seguida de 30 ciclos de (95 °C por 30s, 55 °C por 30s, 72 °C por 90s) e extensão final por 5 min a 72 °C	16S	LANE, 1991
19F (GCIWTYTAYGGIAARGGIGG) 407R (AAI CCRCCRCAIACIACRTC) Desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, seguida de 40 ciclos (94 °C por 30s, 46 °C por 1 min, 72 °C por 1 min) e extensão final por 3 min a 72 °C	<i>nifH</i>	UEDA et al., 1995

Reação de sequenciamento

Desnaturação inicial a 95 °C por 1 min, seguida de 28 ciclos (95 °C por 20s, 50 °C por 40s, 60 °C por 4 min)	Idem PCR	PRISM, 1998 Adaptado
--	-------------	-------------------------

Tabela 2. Condições para PCR e Sequenciamento demonstrando os primers utilizados em cada reação, assim como as tempo / temperaturas na PCR.

BIBLIOGRAFIA CITADA

Akman, L., Yamashita, A., Watanabe, H., Oshima, K., Shiba, T., Hattori, M., & Aksoy, S. (2002). Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. *Nature genetics*, 32(3), 402-407. <https://doi.org/10.1038/ng986>.

ALVAREZ, V. (2007). Bioprospecção da população bacteriana halotolerante e biodegradadora de óleo presente em solo impactado na região de Panelas, SE. *Rio de Janeiro: Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes*.

Alves, S. B., & Lecuona, R. E. (1998). Epizootiologia aplicada ao controle microbiano de insetos. *Controle microbiano de insetos*, 2, 97-169.

Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59(1), 143-169.

Amante, E. (1972). Preliminary observations on the sewarming 70ssociad of the leaf-cutting ant, *Atta capiguara* (Hymenoptera:Formicidae). *J Georgia Entomol Soc.* New Jersey, USA, v. 7, p.82-3.

Andersen, S. B., Boye, M., Nash, D. R., & Boomsma, J. J. (2012). Dynamic Wolbachia prevalence in *Acromyrmex* leaf-cutting ants: potential for a nutritional symbiosis. *Journal of evolutionary biology*, 25(7), 1340-1350. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2012.02521.x>.

Anderson, K. E., Russell, J. A., Moreau, C. S., Kautz, S., Sullam, K. E., Hu, Y. I., ... & Wheeler, D. E. (2012). Highly similar microbial communities are shared among related and trophically similar ant species. *Molecular Ecology*, 21(9), 2282-2296. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05464.x>.

Arbuthnott, D., Levin, T. C., & Promislow, D. E. (2016). The impacts of Wolbachia and the microbiome on mate choice in *Drosophila melanogaster*. *Journal of evolutionary biology*, 29(2), 461-468. <https://doi.org/10.1111/jeb.12788>.

Aylward, F. O., Burnum, K. E., Scott, J. J., Suen, G., Tringe, S. G., Adams, S. M., ... & Starrett, G. J. (2012). Metagenomic and metaproteomic insights into bacterial communities in leaf-cutter ant fungus gardens. *The ISME Journal*, 6(9), 1688-1701.

Aylward, F. O., Suen, G., Biedermann, P. H., Adams, A. S., Scott, J. J., Malfatti, S. A., ... & Klepzig, K. D. (2014). Convergent bacterial microbiotas in the fungal agricultural systems of insects. *Mbio*, 5(6).

Bary, A. (1879). *Die erscheinung der symbiose: Vortrag gehalten auf der versammlung deutscher naturforscher und aerzte zu cassel*. Trübner.

Billen, J., & Buschinger, A. (2000). Morphology and ultrastructure of a specialized bacterial pouch in the digestive tract of Tetraponera ants (Formicidae, Pseudomyrmecinae). *Arthropod Structure & Development*, 29(3), 259-266. [https://doi.org/10.1016/S1467-8039\(00\)00029-3](https://doi.org/10.1016/S1467-8039(00)00029-3).

Blazevic, D. J., & Ederer, G. M. (1975). Principles of biochemical tests in diagnostic microbiology.

Bolton, B. (2013). An online catalog of the Ants of the World. Antcat.

Brosius, J., Dull, T. J., Sleeter, D. D., & Noller, H. F. (1981). Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from Escherichia coli. *Journal of molecular biology*, 148(2), 107-127.

Bürgmann, H., Meier, S., Bunge, M., Widmer, F., & Zeyer, J. (2005). Effects of model root exudates on structure and activity of a soil diazotroph community. *Environmental Microbiology*, 7(11), 1711-1724. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00818.x>.

Bové, J. M. (1997). Spiroplasmas: infectious agents of plants, arthropods and vertebrates. *Wiener klinische Wochenschrift*, 109(14-15), 604.

Cafaro, M. J., Poulsen, M., Little, A. E., Price, S. L., Gerardo, N. M., Wong, B., ... & Currie, C. R. (2011). Specificity in the symbiotic association between fungus-growing ants and protective *Pseudonocardia* bacteria. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1713), 1814-1822. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.2118>.

Canfield, D. E., Glazer, A. N., & Falkowski, P. G. (2010). The evolution and future of Earth's nitrogen cycle. *Science*, 330(6001), 192-196. <https://doi.org/10.1126/science.1186120>

Claesson, M. J., & O'Toole, P. W. (2010). Evaluating the latest high-throughput molecular techniques for the exploration of microbial gut communities. *Gut Microbes*, 1(4), 277-278. <https://doi.org/10.4161/gmic.1.4.12306>.

Colwell, R. R. (1993). Nonculturable but still viable and potentially pathogenic. *Zentbl. Bacteriol.*, 279, 154-158.

Currie, C. R., Scott, J. A., Summerbell, R. C., & Malloch, D. (1999). Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. *Nature*, 398(6729), 701-704.

Currie, C. R. (2001). A community of ants, fungi, and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 357-380.

Cristiano, M. P., Cardoso, D. C., Sandoval-Gómez, V. E., & Simões-Gomes, F. C. (2020). *Amoimymex* Cristiano, Cardoso & Sandoval, gen. nov. (Hymenoptera: Formicidae): a new genus of leaf-cutting ants revealed by multilocus molecular phylogenetic and morphological analyses. *Austral Entomology*, 59(4), 643-676. <https://doi.org/10.1111/aen.12493>.

Crotti, E., Rizzi, A., Chouaia, B., Ricci, I., Favia, G., Alma, A., ... & Bandi, C. (2010). Acetic acid bacteria, newly emerging symbionts of insects. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(21), 6963-6970. <https://doi.org/10.1128/AEM.01336-10>.

Demba Diallo, M., Willems, A., Vloemans, N., Cousin, S., Vandekerckhove, T. T., De Lajudie, P., ... & Van der Gucht, K. (2004). Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the N₂-fixing bacterial diversity in soil under *Acacia tortilis* ssp. *Raddiana* and *Balanites aegyptiaca* in the dryland part of Senegal. *Environmental Microbiology*, 6(4), 400-415. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00577.x>.

Della Lucia, T. M., Gandra, L. C., & Guedes, R. N. (2014). Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. *Pest management science*, 70(1), 14-23. <https://doi.org/10.1002/ps.3660>.

Dillon, R. J., & Dillon, V. M. (2004). The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annual Reviews in Entomology*, 49(1), 71-92. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.061802.123416>.

Dixon, R., & Kahn, D. (2004). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology*, 2(8), 621-631. <https://doi.org/10.1038/nrmicro954>.

Döbereiner, J., Baldani, V. L. D., & Baldani, J. I. (1995). Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. *Embrapa SPI*.

Döbereiner, J., Andrade, V. D. O., & Baldani, V. L. D. (1999). Protocolos para preparo de meios de cultura da Embrapa Agrobiologia. *Embrapa Agrobiologia-Documentos (INFOTECA-E)*.

Douglas, A. E. (2015). Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. *Annual review of entomology*, 60, 17. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020822>.

Drancourt, M., Bollet, C., Carlouz, A., Martelin, R., Gayral, J. P., & Raoult, D. (2000). 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of clinical microbiology*, 38(10), 3623-3630.

Falkowski, P. G., Fenchel, T., & Delong, E. F. (2008). The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science*, 320(5879), 1034-1039.

Feldhaar, H., & Gross, R. (2009). Insects as hosts for mutualistic bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, 299(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2008.05.010>.

Franche, C., Lindström, K., & Elmerich, C. (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and soil*, 321(1-2), 35-59. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9833-8>.

Frost, C. L., Fernandez-Marin, H., Smith, J. E., & Hughes, W. O. H. (2010). Multiple gains and losses of Wolbachia symbionts across a tribe of fungus-growing ants. *Molecular Ecology*, 19(18), 4077-4085. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04764.x>.

Funaro, C. F., Kronauer, D. J., Moreau, C. S., Goldman-Huertas, B., Pierce, N. E., & Russell, J. A. (2011). Army ants harbor a host-specific clade of Entomoplasmatales bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(1), 346-350. <https://doi.org/10.1128/AEM.01896-10>.

Galloway, J. N., Townsend, A. R., Erisman, J. W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J. R., ... & Sutton, M. A. (2008). Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science*, 320(5878), 889-892.

Gerardo, N. M., & Parker, B. J. (2014). Mechanisms of symbiont-conferred protection against natural enemies: an ecological and evolutionary framework. *Current Opinion in Insect Science*, 4, 8-14. .

Gilkes, J. M., Sheen, C. R., Frampton, R. A., Smith, G. R., & Dobson, R. C. (2019). The First Purification of Functional Proteins from the Unculturable, Genome-Reduced, Bottlenecked α -Proteobacterium 'Candidatus Liberibacter solanacearum'. *Phytopathology*, 109(7), 1141-1148. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-18-0486-R>.

Graham, P. H., & Vance, C. P. (2000). Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Research*, 65(2-3), 93-106. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(99\)00080-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00080-5).

Heine, D., Holmes, N. A., Worsley, S. F., Santos, A. C. A., Innocent, T. M., Scherlach, K., ... & Boomsma, J. J. (2018). Chemical warfare between leafcutter ant symbionts and a co-evolved pathogen. *Nature communications*, 9(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04520-1>.

Hölldobler, B., & Wilson, E. O. (1990). *The ants*. Harvard University Press, 733.

Howard, J. B., & Rees, D. C. (1996). Structural basis of biological nitrogen fixation. *Chemical reviews*, 96(7), 2965-2982.

Hu, Y., Sanders, J. G., Łukasik, P., D'Amelio, C. L., Millar, J. S., Vann, D. R., ... & Pierce, N. E. (2018). Herbivorous turtle ants obtain essential nutrients from a conserved nitrogen-

recycling gut microbiome. *Nature communications*, 9(1), 1-14.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-03357-y>.

Ishak, H. D., Miller, J. L., Sen, R., Dowd, S. E., Meyer, E., & Mueller, U. G. (2011a). Microbiomes of ant castes implicate new microbial roles in the fungus-growing ant *Trachymyrmex septentrionalis*. *Scientific Reports*, 1, 204. <https://doi.org/10.1038/srep00204>.

Ishak, H. D., Plowes, R., Sen, R., Kellner, K., Meyer, E., Estrada, D. A., ... & Mueller, U. G. (2011b). Bacterial diversity in *Solenopsis invicta* and *Solenopsis 74ssociad* ant colonies characterized by 16S amplicon 454 pyrosequencing. *Microbial ecology*, 61(4), 821-831. <https://doi.org/10.1007/S00248-010-9793-4>.

Jaenike, J., Stahlhut, J. K., Boelio, L. M., & Unckless, R. L. (2010). Association between *Wolbachia* and *Spiroplasma* within *Drosophila neotestacea*: an emerging symbiotic mutualism?. *Molecular Ecology*, 19(2), 414-425. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04448.x>.

Janson, E. M., Stireman III, J. O., Singer, M. S., & Abbot, P. (2008). Phytophagous insect-microbe mutualisms and adaptive evolutionary diversification. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 62(5), 997-1012. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00348.x>.

Juck, D., Charles, T., Whyte, L. G., & Greer, C. W. (2000). Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities. *FEMS microbiology ecology*, 33(3), 241-249. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00746.x>.

Holt, J. G., Krieg, N. R., & Sneath, P. H. (1994). *Bergey's manual of determinative Associates*.

Kautz, S., Rubin, B. E., & Moreau, C. S. (2013). Bacterial infections across the ants: frequency and prevalence of *Wolbachia*, *Spiroplasma*, and *Asaia*. *Psyche*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/936341>.

Kirkpatrick, B. C., & Smart, C. D. (1995). Phytoplasmas: can phylogeny provide the means to understand pathogenicity?. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 21, pp. 187-212). Academic Press.

Kikuchi, Y. (2009). Endosymbiotic bacteria in insects: their diversity and culturability. *Microbes and environments*, 0908180109-0908180109. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME09140S>.

Kikuchi, Y., Hosokawa, T., & Fukatsu, T. (2011). An ancient but promiscuous host-symbiont association between *Burkholderia* gut symbionts and their heteropteran hosts. *The ISME Association*, 5(3), 446-460. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.150>.

Koch, H., & Schmid-Hempel, P. (2011). Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(48), 19288-19292. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110474108>.

Koonin, E. V., & Wolf, Y. I. (2008). Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. *Nucleic acids research*, 36(21), 6688-6719. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn668>.

Kyrpides, N. C. (2009). Fifteen years of microbial genomics: meeting the challenges and fulfilling the dream. *Nature biotechnology*, 27(7), 627-632. <https://doi.org/10.1038/nbt.1552>.

Lima Mendonça, A., Da Silva, C. E., de Mesquita, F. L. T., da Silva Campos, R., Do Nascimento, R. R., de Azevedo Ximenes, E. C. P., & Sant'Ana, A. E. G. (2009). Antimicrobial activities of components of the glandular secretions of leaf cutting ants of the genus *Atta*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 95(4), 295-303.

Latorre, A., Gil, R., Silva, F. J., & Moya, A. (2005). Chromosomal stasis versus plasmid plasticity in aphid endosymbiont *Buchnera aphidicola*. *Heredity*, 95(5), 339-347.

Lancaster, K. M., Roemelt, M., Ettenhuber, P., Hu, Y., Ribbe, M. W., Neese, F., ... & DeBeer, S. (2011). X-ray emission spectroscopy evidences a central carbon in the nitrogenase iron-molybdenum cofactor. *Science*, 334(6058), 974-977. <https://doi.org/10.1126/science.1206445>.

Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, 115-175.

Li, X., & Yue, X. (2016). Analysis of the microbiota in naturally fermented cabbage of Northeastern part of China by high-throughput sequencing of the V3-V4 regions of the 16S rRNA gene. *International Journal of Agriculture and Biology*, 18(6). <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0219>.

Liberti, J., Sapountzis, P., Hansen, L. H., Sørensen, S. J., Adams, R. M., & Boomsma, J. J. (2015). Bacterial symbiont sharing in *Megalomyrmex* social parasites and their fungus-growing ant hosts. *Molecular Ecology*, 24(12), 3151-3169. <https://doi.org/10.1111/mec.13216>.

Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., ... & Law, M. (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. *BioMed research international*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/251364>.

Lopes, S., & Rosso, S. (2010). Bio: volume 1. Saraiva.

Maggi, R. G., Mascarelli, P. E., Balakrishnan, N., Rohde, C. M., Kelly, C. M., Ramaiah, L., ... & Breitschwerdt, E. B. (2013). "Candidatus *Mycoplasma haemomacae*" and *Bartonella*

quintana bacteremia in cynomolgus monkeys. *Journal of clinical microbiology*, 51(5), 1408-1411.

Marchiori, A. C. (2013). Diversidade e evolução na simbiose entre bactérias e formigas Attini. Rio Claro: UNESP. 2013.Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

Mariconi, F. A. (1970). *As saúvas* (p. 167). São Paulo: Agronômica Ceres.

Morimoto, J., Simpson, S. J., & Ponton, F. (2017). Direct and trans-generational effects of male and female gut microbiota in *Drosophila melanogaster*. *Biology letters*, 13(7), 20160966. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2016.0966>.

Martin, M. M. (1992). The evolution of insect-fungus associations: from contact to stable symbiosis. *American Zoologist*, 32(4), 593-605.

Martins Jr, J., Solomon, S. E., Mikheyev, A. S., Mueller, U. G., Ortiz, A., & Bacci Jr, M. (2007). Nuclear mitochondrial-like sequences in ants: evidence from *Atta cephalotes* (Formicidae: Attini). *Insect molecular biology*, 16(6), 777-784. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2007.00771.x>.

Mehdiabadi, N. J., & Schultz, T. R. (2010). Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini). *Myrmecological News*, 13, 37-55.

Meirelles, L. A., McFrederick, Q. S., Rodrigues, A., Mantovani, J. D., de Melo Rodovalho, C., Ferreira, H., ... & Mueller, U. G. (2016). Bacterial microbiomes from vertically transmitted fungal inocula of the leaf-cutting ant *Atta texana*. *Environmental Microbiology Reports*, 8(5), 630-640. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12415>.

Meirelles, L. A., Mendes, T. D., Solomon, S. E., Bueno, O. C., Pagnocca, F. C., & Rodrigues, A. (2014). Broad Escovopsis-inhibition activity of *Pseudonocardia* associated with *Trachymyrmex* ants. *Environmental microbiology reports*, 6(4), 339-345.

Mendes, L. W. (2009). Análise molecular das estruturas e diversidade de comunidades microbianas em solo de manguezal preservado da Ilha do Cardoso-SP (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).

Mignard, S., & Flandrois, J. P. (2006). 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. *Journal of microbiological methods*, 67(3), 574-581. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.05.009>.

Mueller, U. G., Gerardo, N. M., Aanen, D. K., Six, D. L., & Schultz, T. R. (2005). The evolution of agriculture in insects. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 36, 563-595.

- Mueller, U. G., Dash, D., Rabeling, C., & Rodrigues, A. (2008). Coevolution between attine ants and actinomycete bacteria: a reevaluation. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 62(11), 2894-2912.
- Mueller, U. G., & Sachs, J. L. (2015). Engineering microbiomes to improve plant and animal health. *Trends in microbiology*, 23(10), 606-617. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.07.009>.
- Nasir, H., & Noda, H. (2003). Yeast-like symbiotes as a sterol source in anobiid beetles (Coleoptera, Anobiidae): possible metabolic pathways from fungal sterols to 7-dehydrocholesterol. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, 52(4), 175-182.
- Ndowora, T. C. R., Kinkel, L. L., Jones, R. K., & Anderson, N. A. (1996). Fatty acid analysis of pathogenic and suppressive strains of *Streptomyces* species isolated in Minnesota. *Phytopathology*, 86(2), 138-143.
- Nygaard, S., Hu, H., Li, C., Schiøtt, M., Chen, Z., Yang, Z., ... Boomsma, J. J. (2016). Reciprocal genomic evolution in the ant-fungus agricultural symbiosis. *Nature Communications*, 7, 12233. <https://doi.org/10.1038/ncomms12233>.
- Paludo, C. R., Menezes, C., Silva-Junior, E. A., Vollet-Neto, A., Andrade-Dominguez, A., Pishchany, G., ... & Clardy, J. (2018). Stingless bee larvae require fungal steroid to pupate. *Scientific reports*, 8(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19583-9>
- Patel, J. B. (2001). 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Molecular diagnosis*, 6(4), 313-321.
- Pereira, F., Carneiro, J., Matthiesen, R., van Asch, B., Pinto, N., Gusmao, L., & Amorim, A. (2010). Identification of species by multiplex analysis of variable-length sequences. *Nucleic acids research*, 38(22), e203-e203. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq865>.
- Pereira e Silva, M. C., Semenov, A. V., van Elsas, J. D., & Salles, J. F. (2011). Seasonal variations in the diversity and abundance of diazotrophic communities across soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 77(1), 57-68. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01081.x>.
- Pinto-Tomás, A. A., Anderson, M. A., Suen, G., Stevenson, D. M., Chu, F. S., Cleland, W. W., ... & Currie, C. R. (2009). Symbiotic nitrogen fixation in the fungus gardens of leaf-cutter ants. *Science*, 326(5956), 1120-1123. <https://doi.org/10.1126/science.1173036>.
- Prism, A. B. I. (1998). BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit. *The Perkin-Elmer Corporation*.
- Quinlan, R. J., & Cherrett, J. M. (1979). The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L.). *Ecological Entomology*, 4(2), 151-160. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.1979.tb00570.x>.

- Rabeling, C., Brown, J. M., & Verhaagh, M. (2008). Newly discovered sister lineage sheds light on early ant evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(39), 14913-14917. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806187105>.
- Raymond, J., Siefert, J. L., Staples, C. R., & Blankenship, R. E. (2004). The natural history of nitrogen fixation. *Molecular biology and evolution*, 21(3), 541-554. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh047>.
- Ramvalho, M. O., Bueno, O. C., & Moreau, C. S. (2017). Microbial composition of spiny ants (Hymenoptera: Formicidae: Polyrhachis) across their geographic range. *BMC Evolutionary Biology*, 17(1), 96. <https://doi.org/10.1186/s12862-017-0945-8>.
- Ramvalho, M. O., Vieira, A. S., Pereira, M. C., Moreau, C. S., & Bueno, O. C. (2018). Transovarian transmission of Blochmannia and Wolbachia endosymbionts in the Neotropical weaver ant Camponotus textor (Hymenoptera, Formicidae). *Current microbiology*, 75(7), 866-873. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1459-3>.
- Rajagopal, R. (2009). Beneficial interactions between insects and gut bacteria. *Indian journal of microbiology*, 49(2), 114-119. <https://doi.org/10.1007/s12088-009-0023-z>.
- Reis, A. R. D., Furlani Junior, E., Buzetti, S., & Andreotti, M. (2006). Diagnóstico da exigência do cafeeiro em nitrogênio pela utilização do medidor portátil de clorofila. *Bragantia*, 65(1), 163-171. <https://doi.org/10.1590/S0006-87052006000100021>.
- Reis Júnior, F. B. D., Mendes, I. D. C., Teixeira, K. R. D. S., & Reis, V. M. (2002). Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de Microrganismos do solo. *Planaltina, DF: Embrapa Cerrados*.
- Reitzer, L. (2003). Nitrogen assimilation and global regulation in Escherichia coli. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1), 155-176.
- Rees, D. C., & Howard, J. B. (2000). Nitrogenase: standing at the crossroads. *Current opinion in chemical biology*, 4(5), 559-566.
- Rejesus, R. M., & Hornbaker, R. H. (1999). Economic and environmental evaluation of alternative pollution-reducing nitrogen management practices in central Illinois. *Agriculture, ecosystems & environment*, 75(1-2), 41-53.
- Rico-Gray, V. (1980). Ants and tropical flowers. *Biotropica*, 12(3), 223-224.
- Ringo, J., Sharon, G., & Segal, D. (2011). Bacteria-induced sexual isolation in Drosophila. *Fly*, 5(4), 310-315. <https://doi.org/10.4161/fly.5.4.15835>.
- Ronque, M. U., Lyra, M. L., Migliorini, G. H., Bacci, M., & Oliveira, P. S. (2020). Symbiotic bacterial communities in rainforest fungus-farming ants: evidence for species and colony specificity. *Scientific reports*, 10(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66772-6>.

Russell, J. A., Moreau, C. S., Goldman-Huertas, B., Fujiwara, M., Lohman, D. J., & Pierce, N. E. (2009). Bacterial gut symbionts are tightly linked with the evolution of herbivory in ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(50), 21236-21241. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907926106>

Russell, J. A., Sanders, J. G., & Moreau, C. S. (2017). Hotspots for symbiosis: function, evolution, and specificity of ant-microbe associations from trunk to tips of the ant phylogeny (Hymenoptera: Formicidae). *Myrmecological News*, 24, 43-69. <https://doi.org/10.1128/AEM.01336-10>.

Sabino, D. C. C., Ferreira, J. S., Guimarães, S. L., Baldani, V. L. D., & da Conquista, V. (2012). Bactérias diazotróficas como promotoras do desenvolvimento inicial de plântulas de arroz. *Enciclopédia Biosfera*, 8(15), 2337-2345.

Solomon, S. E., Rabeling, C., Sosa-Calvo, J., Lopes, C. T., Rodrigues, A., Vasconcelos, H. L., ... & Schultz, T. R. (2019). The molecular phylogenetics of *Trachymyrmex* Forel ants and their fungal cultivars provide insights into the origin and coevolutionary history of 'higher-attine' ant agriculture. *Systematic Entomology*, 44(4), 939-956. <https://doi.org/10.1111/syen.12370>

Samaddar, N., Paul, A., Chakravorty, S., Chakraborty, W., Mukherjee, J., Chowdhuri, D., & Gachhui, R. (2011). Nitrogen fixation in *Asaia* sp.(family Acetobacteraceae). *Current microbiology*, 63(2), 226-231. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9968-3>.

Santos, A. V., Dillon, R. J., Dillon, V. M., Reynolds, S. E., & Samuels, R. I. (2004). Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *FEMS microbiology letters*, 239(2), 319-323. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.09.005>.

Smith, S. M., Kent, D. S., Boomsma, J. J., & Stow, A. J. (2018). Monogamous sperm storage and permanent worker sterility in a long-lived ambrosia beetle. *Nature ecology & evolution*, 2(6), 1009-1018.

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.

Sapountzis, P., Zhukova, M., Hansen, L. H., Sørensen, S. J., Schiøtt, M., & Boomsma, J. J. (2015). *Acromyrmex* leaf-cutting ants have simple gut microbiota with nitrogen-fixing potential. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(16), 5527-5537. <https://doi.org/10.1128/AEM.00961-15>.

Sapountzis, P., Zhukova, M., Shik, J. Z., Schiott, M., & Boomsma, J. J. (2018). Reconstructing the functions of endosymbiotic Mollicutes in fungus-growing ants. *Elife*, 7, e39209. <https://doi.org/10.7554/eLife.39209.001>.

Sarita, S., Priefer, U. B., Prell, J., & Sharma, P. K. (2008). Diversity of nifH gene amplified from rhizosphere soil DNA. *Current Science*, 109-115.

Sawada, H., Kuykendall, L. D., & Young, J. M. (2003). Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *The Journal of general and applied microbiology*, 49(3), 155-179.

Schultz, T. R., & Meier, R. (1995). A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. *Systematic entomology*, 20(4), 337-370.

Schultz, T. R., & Brady, S. G. (2008). Major evolutionary transitions in ant agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(14), 5435-5440. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711024105>.

Seefeldt, L. C., Yang, Z. Y., Duval, S., & Dean, D. R. (2013). Nitrogenase reduction of carbon-containing compounds. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1827(8-9), 1102-1111.

Silva, A., Bacci Jr, M., de Siqueira, C. G., Bueno, O. C., Pagnocca, F. C., & Hebling, M. J. A. (2003). Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. *Journal of Insect Physiology*, 49(4), 307-313. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(03\)00004-0](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(03)00004-0).

Silva-Junior, E. A., Ruzzini, A. C., Paludo, C. R., Nascimento, F. S., Currie, C. R., Clardy, J., & Pupo, M. T. (2018). Pyrazines from bacteria and ants: convergent chemistry within an ecological niche. *Scientific reports*, 8(1), 1-7. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20953-6>.

De Siqueira, C. G., Bacci, M., Pagnocca, F. C., Bueno, O. C., & Hebling, M. J. (1998). Metabolism of Plant Polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the Symbiotic Fungus of the Leaf-Cutting Ant *Atta sexdens* L. *Applied and environmental microbiology*, 64(12), 4820-4822.

Somera, A. F., Lima, A. M., dos Santos-Neto, Á. J., Lanças, F. M., & Bacci, M. (2015). Leaf-cutter ant fungus gardens are biphasic mixed microbial bioreactors that convert plant biomass to polyols with biotechnological applications. *Applied and environmental microbiology*, 81(13), 4525-4535. <https://doi.org/10.1128/AEM.00046-15>.

Spatzal, T., Aksoyoglu, M., Zhang, L., Andrade, S. L., Schleicher, E., Weber, S., ... & Einsle, O. (2011). Evidence for interstitial carbon in nitrogenase FeMo cofactor. *Science*, 334(6058), 940-940. <https://doi.org/10.1126/science.1214025>.

Stoll, S., Gadau, J., Gross, R. O. Y., & Feldhaar, H. (2007). Bacterial microbiota associated with ants of the genus *Tetraponera*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 90(3), 399-412. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2006.00730.x>.

Suen, G., Scott, J. J., Aylward, F. O., Adams, S. M., Tringe, S. G., Pinto-Tomás, A. A., ... & Goodwin, L. A. (2010). An insect herbivore microbiome with high plant biomass-degrading capacity. *PloS genet*, 6(9), e1001129. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001129>.

Taketani, R. G., Dos Santos, H. F., van Elsas, J. D., & Rosado, A. S. (2009). Characterisation of the effect of a simulated hydrocarbon spill on diazotrophs in mangrove sediment mesocosm. *Antonie van Leeuwenhoek*, 96(3), 343-354. <https://doi.org/10.1007/s10482-009-9351-6>.

Tufts, D. M., & Bextine, B. (2009). Identification of bacterial species in the hemolymph of queen *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *Environmental entomology*, 38(5), 1360-1364. <https://doi.org/10.1603/022.038.0502>.

Ueda, T., Suga, Y., Yahiro, N., & Matsuguchi, T. (1995). Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. *Journal of bacteriology*, 177(5), 1414-1417. <https://doi.org/10.1128/jb.177.5.1414-1417.1995>.

van Borm, S., Buschinger, A., Boomsma, J. J., & Billen, J. (2002). Tetraponera ants have gut symbionts related to nitrogen-fixing root-nodule bacteria. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 269(1504), 2023-2027. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2101>.

Van Hamme, J. D., Singh, A., & Ward, O. P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(4), 503-549. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.503-549.2003>.

Veja-Orellana, O., Poveda, J. B., Rosales, R. S., Bradbury, J. M., Poveda, C. G., Mederos-Iriarte, L. E., ... & Ramírez, A. S. (2017). Comparison of different NAT assays for the detection of microorganisms belonging to the class Mollicutes. *BMC veterinary research*, 13(1), 195. <http://doi.org/10.1186/s12917-017-1116-2>.

Vieira, A. S., Ramalho, M. O., Martins, C., Martins, V. G., & Bueno, O. C. (2017). Microbial communities in different tissues of *Atta sexdens rubropilosa* leaf-cutting ants. *Current microbiology*, 74(10), 1216-1225. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1307-x>.

Weber, N. A. (1972). Gardening ants the attines.

Wild, A. (2001). Alex Wild Photography. <http://www.alexanderwild.com>.

Woo, P. C., Ng, K. H., Lau, S. K., Yip, K. T., Fung, A. M., Leung, K. W., ... & Yuen, K. Y. (2003). Usefulness of the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. *Journal of clinical microbiology*, 41(5), 1996-2001. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.5.1996-2001.2003>.

Xu, J. (2011). Microbial ecology in the age of metagenomics. *Handbook of Molecular Microbial Ecology I: Metagenomics and Complementary Approaches*, 111-122. <https://doi.org/10.1002/9781118010518.ch14>.

Yang, C. H., Crowley, D. E., & Menge, J. A. (2001). 16S rDNA fingerprinting of rhizosphere bacterial communities associated with healthy and *Phytophthora* infected avocado roots. *FEMS microbiology ecology*, 35(2), 129-136. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00796.x>.

Zanetti, R., Zanuncio, J. C., Santos, J. C., Da Silva, W. L. P., Ribeiro, G. T., & Lemes, P. G. (2014). An overview of integrated management of leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian forest plantations. *Forests*, 5(3), 439-454. <https://doi.org/10.3390/f5030439>.

Zehr, J. P., Jenkins, B. D., Short, S. M., & Steward, G. F. (2003). Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environmental microbiology*, 5(7), 539-554.

Zhang, J., Ding, X., Guan, R., Zhu, C., Xu, C., Zhu, B., ... & Lu, Z. (2018b). Evaluation of different 16S rRNA gene V regions for exploring bacterial diversity in a eutrophic freshwater lake. *Science of the Total Environment*, 618, 1254-1267. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.228>.

Zhukova, M., Sapountzis, P., Schjøtt, M., & Boomsma, J. J. (2017). Diversity and transmission of gut bacteria in *Atta* and *Acromyrmex* leaf-cutting ants during development. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1942. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01942>.

Zientz, E., Feldhaar, H., Stoll, S., & Gross, R. (2005). Insights into the microbial world associated with ants. *Archives of microbiology*, 184(4), 199-206. <https://doi.org/10.1007/s00203-005-0041-0>

