

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 16/12/2021.



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 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

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

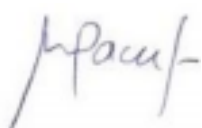
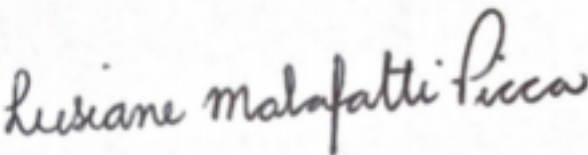
TÍTULO DA TESE: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DO ABDÔMEN DE FORMIGAS CORTADEIRAS (TRIBO ATTINI): CULTIVO, SEQUENCIAMENTO, MORFOLOGIA E FISILOGIA

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 questionei 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, *nifH*, 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 dipotássico
- 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

PARTE 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.

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.

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 Associadasly*.

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 Associ*, 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>

