



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



**ANÁLISE TRANSCRICIONAL DOS GENES *ERF* E *PR* EM RESPOSTA
AO ATAQUE DA VESPA-DA-GALHA-DO-EUCALIPTO (*LEPTOCYBE
INVASA*) EM MUDAS DE EUCALIPTO INOCULADAS COM O FUNGO
*BEAUVERIA BASSIANA***

MATHEUS MARTINS DAUDE

Palmas – TO

2024

MATHEUS MARTINS DAUDE

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL DOS GENES *ERF* E *PR* EM RESPOSTA
AO ATAQUE DA VESPA-DA-GALHA-DO-EUCALIPTO (*LEPTOCYBE
INVASA*) EM MUDAS DE EUCALIPTO INOCULADAS COM O FUNGO
*BEAUVERIA BASSIANA***

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

Orientador: Prof. Dr. Horllys Gomes Barreto

Coorientador: Prof. Dr. Renato de Almeida Sarmiento

Palmas - TO

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

D238a Daude, Matheus Martins.

Análise transcricional dos genes ERF e PR em resposta ao ataque da vespa-da-galha-do-eucalipto (*Leptocybe invasa*) em mudas de eucalipto inoculadas com o fungo *Beauveria bassiana*. / Matheus Martins Daude. – Palmas, TO, 2024.

127 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Doutorado) em Biodiversidade e Biotecnologia, 2024.

Orientador: Horíllys Gomes Barreto

Coorientador: Renato de Almeida Samento

1. Expressão gênica. 2. Genes endógenos. 3. Análise genética. 4. Patogênese. I. Título

CDD 660.6

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

MATHEUS MARTINS DAUDE

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL DOS GENES *ERF* E *PR* EM RESPOSTA
AO ATAQUE DA VESPA-DA-GALHA-DO-EUCALIPTO (*LEPTOCYBE
INVASA*) EM MUDAS DE EUCALIPTO INOCULADAS COM O FUNGO
*BEAUVERIA BASSIANA***

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

Aprovada em 31/05/2024

Banca examinadora

Documento assinado digitalmente



HORLLYS GOMES BARRETO

Data: 17/07/2024 16:50:16-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Horllys Gomes Barreto
Universidade Federal do Tocantins

Documento assinado digitalmente



ANTONIO CHALFUM JUNIOR

Data: 17/07/2024 20:03:12-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Antonio Chalfum Junior
Universidade Federal do Lavras

Documento assinado digitalmente



MAIRA IGNACIO SARMENTO

Data: 19/07/2024 10:49:38-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Máira Ignacio Sarmiento
Universidade Federal do Tocantins

Documento assinado digitalmente



ELISANDRA SCAPIN

Data: 24/07/2024 14:38:51-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Elisandra Scapin
Universidade Federal do Tocantins

Documento assinado digitalmente



EMERSON ADRIANO GUARDA

Data: 29/07/2024 13:46:34-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Emerson Adriano Guarda
Universidade Federal do Tocantins

Dedico...

À Deus, por ser a luz que guia meus passos e fonte suprema de sabedoria. Aos meus pais, Ana Angela e Donizete, pelo amor incansável e apoio constante. À minha família, por todo suporte. A todos que contribuíram, tornando esta conquista possível.

AGRADECIMENTOS

À Deus, detentor do dom da vida e fonte inesgotável de amor. A Ele devo minha existência e a oportunidade de perseguir meus sonhos, apesar das imperfeições e falhas que carrego.

Aos meus amados pais, Ana Angela Martins da Silva Daude e Donizete Aparecido Daude, companheiros incansáveis nos caminhos que conduzem aos meus sonhos. Vocês são o pilar que sustenta minha jornada, ensinando-me com amor, educação e exemplo os valores que moldaram meu caráter. Agradeço o amor incondicional, incentivo, paciência e força.

Aos meus queridos irmãos, Bruno Martins Siqueira e Davi Antônio de Queiroz Daude, por todo o apoio e suporte. A jornada de vocês é um espelho inspirador na busca pelo caminho vitorioso.

Aos meus avós, Zuleica Caroni Silva, José Martins da Silva e Ilza Felisberto de Jesus, por todo amor, carinho e dedicação.

À toda minha família, pois essa conquista é um somatório da contribuição direta e indireta de cada um de vocês.

Ao meu orientador, Horllys Gomes Barreto, cuja orientação encorajadora e apoio moldou não apenas meu trabalho, mas também meu crescimento como estudante, pessoa e pesquisador. Sua dedicação e conhecimento foram fundamentais para o sucesso desta jornada. Agradeço por ser um mentor inspirador.

Ao meu coorientador, Renato de Almeida Sarmiento, pela confiança e disponibilidade durante todo o desenvolvimento do estudo.

A professora Solange Sággio, que sempre se dispôs a ajudar e contribuir para meu crescimento pessoal, acadêmico e profissional.

A Universidade Federal do Tocantins e ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (Rede Bionorte) pela oportunidade de realizar um curso de pós-graduação.

A todos do grupo de pesquisa do Laboratório de Análises Moleculares (LAM - Saúde Humana) e do Laboratório de Ecologia Aplicada e Funcional (LEAF), pelo apoio, incentivo e amizade.

A todos os professores que fizeram parte diretamente e indiretamente da minha formação. O conhecimento transforma vidas, e esse papel, vocês cumprem brilhantemente.

Aos servidores do câmpus, especialmente, a equipe da limpeza e manutenção predial, por sempre manterem o ambiente de estudo e pesquisa impecáveis. O trabalho de vocês é nobre, e eu agradeço, de coração.

Ao CNPq pelo apoio ao projeto mediante a concessão da bolsa de doutorado durante todo o período.

A todos que, de alguma forma, contribuíram nessa jornada. Sem vocês eu não estaria escrevendo esses agradecimentos! Queria poder dedicar de forma direta cada um que adicionou sua parcela de contribuição a minha formação, porém, isso não é possível. Então, de forma sincera, sintam-se todos presentes aqui, vocês foram fundamentais durante todo o processo.

Muito obrigado a todos!

“A persistência é o segredo do sucesso.”

Henry Ford

RESUMO

O cultivo de *Eucalyptus* L'Hér é essencial para a indústria madeireira. No entanto, desafios como pragas e mudanças climáticas afetam as plantações, especialmente dos híbridos de *E. camaldulensis* e *E. tereticornis*. A *Leptocybe invasa* é uma praga que induz galhas causando danos severos às plantas. Embora estratégias de controle tenham sido implementadas, o uso de genótipos adaptados, porém susceptíveis à *L. invasa*, torna-se inviável em regiões com alta infestação, destacando a necessidade de abordagens integradas, como a associação planta-microrganismo, além de avanços nos estudos genéticos. O uso do fungo *Beauveria bassiana* tem mostrado potencial por conferir resistência às plantas contra essa praga. Além disso, estudos moleculares são fundamentais para entender os mecanismos de resposta genética das plantas ao ataque. Os genes da família *AP2/EREBP* desempenham um papel crucial na resposta das plantas a estresses bióticos e abióticos, além de participarem das vias de transdução de sinal relacionadas a hormônios. Em eucalipto, o etileno é o principal hormônio de defesa contra a *L. invasa* nas fases iniciais após a infestação. A sinalização e interação entre fitormônios são fundamentais nas respostas de defesa das plantas, ativando uma rede de fatores de transcrição (FTs) que regulam a expressão de genes relacionados à patogênese (*PR*). Os genes *ERF* são FTs que atuam na defesa e, embora a maioria dos *ERF* estejam associados a respostas a estresses abióticos, um pequeno grupo está envolvido nas respostas a estresses biótico e conhecidos por regular a imunidade inata. Os insetos galhadores, como a *L. invasa*, apesar de serem artrópodes herbívoros, estabelecem uma relação tão íntima com o hospedeiro que alguns já foram comparados com patógenos. Nesse sentido, a análise dos genes de resposta à patogênese, bem como os fatores de transcrição que os regulam, pode ser um caminho promissor para compreender a resposta genética ao ataque a microvespa. A Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real com transcrição reversa (RT-qPCR) é uma ferramenta comum para análises de expressão gênica, entretanto a confiabilidade nos resultados depende de diversos fatores, como a escolha adequada de genes de referência. Nesse contexto, o objetivo do estudo foi a validação de genes de referência para estudos de expressão gênica por RT-qPCR em híbridos de *Eucalyptus*, além da análise de expressão relativa dos genes *ERF* e *PR* em diferentes condições experimentais. Neste estudo, os melhores genes de referência em todos os tratamentos avaliados foram *EcPTB*, *EcPP2A-1* e *EcEUC12*. A avaliação da expressão relativa dos genes *EcERF1*, *EcERF6*, *EcERF96*, *EcORA59* e *EcPR4* mostrou que, exceto para *EcERF6*, todos os genes apresentaram seus maiores níveis de expressão em ápice foliar de plantas infestadas com a *L. invasa*, com a redução da expressão quando houve a inoculação do *B. bassiana*. Este estudo é o primeiro a identificar os genes de referência adequados e investigar a

expressão dos genes *ERF* e *PR* nestas condições específicas. Os resultados obtidos fornecem uma base sólida para futuros estudos de expressão gênica e descobertas importantes para compreender os mecanismos de defesa do eucalipto contra o ataque da *L. invasa*.

Palavras-chave: Expressão gênica; Genes endógenos; *APETALA-2*; Análise genética; Patogênese; Espécie florestal.

ABSTRACT

The cultivation of *Eucalyptus* L'Hér is essential for the timber industry. However, challenges such as pests and climate change directly affect plantations, especially *E. camaldulensis* and *E. tereticornis* hybrids. *Leptocybe invasa* is a pest that induces galls, causing severe damage to plants. Although control strategies are available, the use of adapted genotypes, albeit susceptible to *L. invasa*, is not feasible in regions with high infestation rates, highlighting the need for integrated approaches, such as plant-microorganism association, along with advances in genetic studies. The use of the fungus *Beauveria bassiana* has shown great potential in conferring resistance to plants against this pest. In Addition, molecular studies are essential to understand the plant genetic response mechanisms to the pest. Genes from the *AP2/EREBP* family play a crucial role in plant response to biotic and abiotic stresses, and also participate in hormone-related signal transduction pathways. In eucalyptus, ethylene is the main defense hormone against *L. invasa* at the early stages of infection. Signaling and interaction among phytohormones are crucial in plant defense responses, activating a network of transcription factors (TFs) that regulate the expression of genes related to pathogenesis (*PR*). *ERF* genes are TFs that act in plant defense and, although most *ERFs* are associated with responses to abiotic stresses, some genes are involved in responses to biotic stresses and regulating plant innate immunity. Gall-inducing insects, such as *L. invasa*, despite being herbivorous arthropods, establish such an intimate relationship with the host that some of them have been compared to pathogens. In this sense, the analysis of *PR* genes, as well as the TFsw that regulate them, may be a promising path to understanding the genetic response to the micro-wasp attack. Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) is a common tool for gene expression analysis; however, the reliability of results depends on various factors, such as the appropriate choice of reference genes. In this context, the aim of the study was to validate reference genes for RT-qPCR gene expression studies in *Eucalyptus* hybrids, in addition to analyzing the relative expression of *ERF* and *PR* genes under different experimental conditions. In this study, the best reference genes in all evaluated treatments were *EcPTB*, *EcPP2A-1*, and *EcEUC12*. The evaluation of the relative expression of the genes *EcERF1*, *EcERF6*, *EcERF96*, *EcORA59*, and *EcPR4* showed that, except for *EcERF6*, all genes had their highest expression levels in leaf apices of plants infested with *L. invasa*, and reduced expression levels were observed under *B. bassiana* inoculation. This study is the first to identify suitable reference genes and investigate the expression of *ERF* and *PR* genes in *Eucalyptus* under these specific conditions. The results obtained provide a solid basis for future gene expression studies and important insights into understanding eucalyptus defense mechanisms against *L. invasa* attack.

Keywords: Gene expression; Endogenous genes; *APETALA-2*; Genetic analysis; Pathogenesis; Forest species.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Foto de uma microvespa-da-galha do eucalipto (*L. invasa*) fêmea. 31
- Figura 2** - Formação de galhas em *E. camaldulensis* após a infestação com *L. invasa*: 33
a) folha 3 dias após a oviposição, mostrando secreções brancas das feridas de oviposição; **b)** folha após 3 semanas, mostrando estágios iniciais da formação de galhas; **c)** galha após 6–7 semanas; **d)** e **e)** galhas maduras, mostrando orifícios de saída.
- Figura 3** - Modelo simplificado da rede regulatória dos genes *ERF* em resposta a 39
patógenos necrotróficos. **(1)** A infecção por necrotróficos, como *Botrytis cinerea*, desencadeia sinalizações de defesa nas células vegetais, incluindo as vias hormonais de JA e ET e as cascatas de MAPK (MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES). Essas vias provocam eventos subsequentes (2–8) para reprogramar a célula visando a ativação da defesa. **(2)** O fator de transcrição *EIN3* (*ETHYLENE INSENSITIVE 3*) integra as vias de sinalização de JA e ET. **(3)** *EIN3* se liga aos promotores de *ERF1* e, potencialmente, *ORA59*, ativando subsequentemente a expressão de *ERF1* e *ORA59*. **(4)** O fator de transcrição *WRKY33*, que é fosforilado pela cascata de *MAPK*, ativa a expressão de *ERF1* e *ORA59* através da ligação direta aos seus promotores. **(5)** *ERF96* é induzido pelas vias de JA e ET. A indução de *ERF96* por ET depende de um *ORA59* funcional. **(6)** O promotor de *ORA59* é alvo de *ERF96* e, potencialmente, de *ERF1*, sugerindo um possível ciclo de *feedback* positivo para ativar a sinalização de defesa. **(7)** A expressão de *ERF6*, assim como a fosforilação e ativação da proteína *ERF6*, dependem das cascatas de *MAPK*. **(8)** *ERFs* induzidos pela infecção de *B. cinerea* ativam a transcrição de genes de *PR*, que possuem regiões GCC em seus promotores, incluindo *PDF1.2*, *PR3* e *PR4*. Setas vermelhas indicam a regulação positiva da via. Setas pretas referem-se aos efeitos positivos na transcrição. Setas azuis, amarelas e verdes indicam a ligação aos promotores por fatores de transcrição. Setas com linhas pontilhadas indicam uma ligação potencial de fatores de transcrição aos promotores.

CAPÍTULO I

- Figura 1** - Níveis de expressão de genes de referência candidatos com base nos dados 60
de Cq (Ciclo de quantificação) obtidos a partir de caules, folhas e ápice foliar de plantas de eucalipto sob diferentes condições de tratamento **(a)**, plantas controle **(b)**, plantas matrizes **(c)**, plantas inoculadas com *B. bassiana* **(d)**, plantas infestadas por *L. invasa* **(e)** e plantas inoculadas com *B. bassiana* e infestadas por *L. invasa* **(f)**. As barras verticais representam o desvio padrão e os pontos pretos representam os valores médios de Cq.
- Figura 2** - Classificação dos genes de referência candidatos de acordo com seu valor 67
de estabilidade calculado pelos algoritmos geNorm **(a)**, NormFinder **(b)**, BestKeeper **(c)**, Delta-Ct **(d)** e RefFinder **(e)**, utilizando os dados de Cq obtidos de todos os cinco tratamentos (Plantas controle; Plantas matrizes; Plantas inoculadas com *B. bassiana*;

Plantas infestadas com *L. invasa*; Plantas inoculadas com *B. bassiana* e infestadas com *L. invasa*).

Figura 3 - Padrão de expressão relativa do gene *EcDREB2*, normalizado com os genes de referência mais estáveis (*EcPP2A-1*, *EcULP7* e *EcSAND*) e menos estáveis (*EcH2B*, *EcEF1- α* e *EcACT*), de acordo com o algoritmo RefFinder, em caule e ápice foliar de plantas de *Eucalyptus* submetidas à inoculação por *B. bassiana* e infestação por *L. invasa*. As colunas representam a diferença na expressão gênica em relação a uma amostra calibradora (caule). Os níveis de expressão foram obtidos a partir de três replicatas biológicas e as barras de erro representam o desvio padrão entre essas replicatas. **68**

Figura S1 - Curvas de *melting* de todos os genes analisados. As letras R, C, F e AF, significam, respectivamente, raiz, caule, folha e ápice foliar. **100**

CAPÍTULO II

Figura 1 - Padrão de expressão relativa de todos os genes analisados. A) *EcERF1*. B) *EcERF6*. C) *EcERF96*. D) *EcORA59*. E) *EcPR4*. As colunas representam a diferença na expressão gênica em relação a uma amostra calibradora. Para todos os genes, a amostra calibradora foi o caule (testemunha), exceto para o gene *EcERF6* que utilizou o ápice foliar (testemunha). Os níveis de expressão foram obtidos a partir de três replicatas biológicas e as barras de erro representam o desvio padrão entre essas replicatas. As médias com a mesma letra não são significativamente diferentes entre si, sendo letras maiúsculas usadas para comparar médias de expressão entre os tecidos e as letras minúsculas para comparar médias de expressão entre os tratamentos, segundo o teste de *Scott-Knott* ($p \leq 0.05$). **115**

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- Tabela 1** - Classificação dos candidatos a genes de referência gerada de acordo com seus valores de estabilidade calculados pelos algoritmos geNorm, NormFinder, BestKeeper, Delta-Ct e Refiner, utilizando os dados de Cq obtidos de caule, folha e ápice foliar de plantas controle. **62**
- Tabela 2** - Classificação dos candidatos a genes de referência gerada de acordo com seus valores de estabilidade calculados pelos algoritmos geNorm, NormFinder, BestKeeper, Delta-Ct e Refiner, utilizando os dados de Cq obtidos de caule, folha e ápice foliar de plantas matrizes. **63**
- Tabela 3** - Classificação dos candidatos a genes de referência gerada de acordo com seus valores de estabilidade calculados pelos algoritmos geNorm, NormFinder, BestKeeper, Delta-Ct e Refiner, utilizando os dados de Cq obtidos de caule, folha e ápice foliar de plantas inoculadas com *B. bassiana*. **64**
- Tabela 4** - Classificação dos candidatos a genes de referência gerada de acordo com seus valores de estabilidade calculados pelos algoritmos geNorm, NormFinder, BestKeeper, Delta-Ct e Refiner, utilizando os dados de Cq obtidos de caule, folha e ápice foliar de plantas infestadas com *L. invasa*. **65**
- Tabela 5** - Classificação dos candidatos a genes de referência gerada de acordo com seus valores de estabilidade calculados pelos algoritmos geNorm, NormFinder, BestKeeper, Delta-Ct e Refiner, utilizando os dados de Cq obtidos de caule, folha e ápice foliar de plantas inoculadas com *B. bassiana* e infestadas com *L. invasa*. **66**
- Tabela 6** - Descrições das sequências dos *primers* para RT-qPCR, nome do gene, número de acesso, temperatura de *melting* (Tm), tamanho do *amplicon*, coeficiente de correlação (R²) e eficiência de amplificação (E%) dos genes de referência e alvo analisados. **78**
- Tabela S1** - Ciclos de quantificação (Cq) para todos os genes e amostras das plantas matrizes de eucalipto. As amostras foram processadas em três repetições biológicas, cada uma delas executada em triplicata técnica. As letras R, C, F e AF representam, respectivamente, raiz, caule, folha e ápice foliar. Os números à frente de cada letra indicam as repetições biológicas. Ec = *E. camaldulensis*. **87**
- Tabela S2** - Ciclos de quantificação (Cq) para todos os genes e amostras das plantas testemunhas (controle) de eucalipto. As amostras foram processadas em três repetições biológicas, cada uma delas executada em triplicata técnica. As letras R, C, F e AF representam, respectivamente, raiz, caule, folha e ápice foliar. Os números à frente de cada letra indicam as repetições biológicas. Ec = *E. camaldulensis*. **89**

Tabela S3 - Ciclos de quantificação (Cq) para todos os genes e amostras das plantas inoculadas com o fungo *B. bassiana* de eucalipto. As amostras foram processadas em três repetições biológicas, cada uma delas executada em triplicata técnica. As letras R, C, F e AF representam, respectivamente, raiz, caule, folha e ápice foliar. Os números à frente de cada letra indicam as repetições biológicas. Ec = *E. camaldulensis*. **92**

Tabela S4 - Ciclos de quantificação (Cq) para todos os genes e amostras das plantas infestadas com a vespa *L. invasa* de eucalipto. As amostras foram processadas em três repetições biológicas, cada uma delas executada em triplicata técnica. As letras R, C, F e AF representam, respectivamente, raiz, caule, folha e ápice foliar. Os números à frente de cada letra indicam as repetições biológicas. Ec = *E. camaldulensis*. **94**

Tabela S5 - Ciclos de quantificação (Cq) para todos os genes e amostras das plantas inoculadas com o fungo *B. bassiana* e infestadas com a vespa *L. invasa* de eucalipto. As amostras foram processadas em três repetições biológicas, cada uma delas executada em triplicata técnica. As letras R, C, F e AF representam, respectivamente, raiz, caule, folha e ápice foliar. Os números à frente de cada letra indicam as repetições biológicas. Ec = *E. camaldulensis*. **96**

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Descrições das sequências dos primers para RT-qPCR, nome do gene, número de acesso, temperatura de *melting* (Tm), tamanho do *amplicon*, coeficiente de correlação (R²) e eficiência de amplificação (E%) dos genes analisados. **111**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 OBJETIVO GERAL.....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICO	25
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
3.1 <i>Eucalyptus</i> L'Hér	26
3.2 SETOR FLORESTAL E SUA IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	26
3.3 CULTIVO DO EUCALIPTO NO BRASIL	28
3.4 DESAFIOS NO CULTIVO DO EUCALIPTO.....	28
3.4.1 <i>Leptocybe invasa</i>	29
3.5 CONTROLE BIOLÓGICO.....	32
3.6 ESTUDOS MOLECULARES	34
3.6.1 Reação em Cadeia a Polimerase em tempo real.....	34
3.6.2 Genes de referência.....	35
3.6.3 Genes <i>AP2/EREBP</i>	37
3.6.4 Genes <i>PR</i>	39
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
CAPÍTULO I	54
ABSTRACT	55
INTRODUCTION	56
RESULTS.....	58
EXPRESSION LEVELS OF THE CANDIDATE REFERENCE GENES	58
EXPRESSION STABILITY OF THE CANDIDATE REFERENCE GENES	60
Control plants	60
Mother plants.....	61
Plants inoculated with <i>B. bassiana</i>	62
Plants infested with <i>L. invasa</i>	63
Plants inoculated with <i>B. bassiana</i> and infested with <i>L. invasa</i>	64
Overall treatment analysis.....	65
REFERENCE GENE VALIDATION.....	66
DISCUSSION.....	67
EXPRESSION LEVELS OF ALL CANDIDATE REFERENCE GENES	68
REFERENCE GENE EXPRESSION STABILITY	69

REFERENCE GENE VALIDATION.....	71
CONCLUSION	72
METHODS	72
EXPERIMENT DESIGN	72
Study area	73
<i>Eucalyptus</i> seedling production	73
<i>Beauveria bassiana</i> inoculation	73
<i>Leptocybe invasa</i> breeding and infestation	74
Plant material and treatments	74
RNA EXTRACTION	75
DNASE TREATMENT AND cDNA SYNTHESIS.....	75
IDENTIFICATION AND SELECTION OF TARGET AND REFERENCE GENES ...	75
GENE SEQUENCE IDENTIFICATION.....	76
PRIMER DESIGN	76
RT-qPCR ANALYSIS	77
EXPRESSION STABILITY OF THE CANDIDATE REFERENCE GENES	78
DATA AVAILABILITY	78
REFERENCES	78
ACKNOWLEDGEMENTS	85
AUTHOR CONTRIBUTIONS	85
COMPETING INTERESTS	85
SUPPLEMENTARY INFORMATION	86
CAPÍTULO II	101
5 RESUMO	102
6 INTRODUÇÃO	103
7 MATERIAL E MÉTODOS	106
7.1 MONTAGEM DO EXPERIMENTO	106
7.1.1 Área de estudo	107
7.1.2 Produção de mudas de <i>Eucalyptus</i>	107
7.1.3 Preparo e inoculação do fungo <i>Beauveria bassiana</i>	107
7.1.4 Criação e infestação de <i>Leptocybe invasa</i>	108
7.1.5 Coleta de material vegetal	108
7.2 EXTRAÇÃO DE RNA	109
7.3 TRATAMENTO COM A DNASE E SÍNTESE DE CDNA	109
7.4 IDENTIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS GÊNICAS	109

7.5	DESENHO DOS <i>PRIMERS</i>	110
7.6	RT-qPCR	110
8	RESULTADOS	111
8.1	ANÁLISE DE EXPRESSÃO RELATIVA POR RT-qPCR	111
8.1.1	Gene <i>EcERF1</i>	111
8.1.2	Gene <i>EcERF6</i>	112
8.1.3	Gene <i>EcERF96</i>	112
8.1.4	Gene <i>EcORA59</i>	112
8.1.5	Gene <i>EcPR4</i>	113
9	DISCUSSÃO	114
9.1	ANÁLISE DE EXPRESSÃO RELATIVA POR RT-qPCR	114
9.1.1	Gene <i>EcERF1</i>	114
9.1.2	Gene <i>EcERF6</i>	115
9.1.3	Gene <i>EcERF96</i>	116
9.1.4	Gene <i>EcORA59</i>	116
9.1.5	Gene <i>EcPR4</i>	117
10	CONCLUSÃO	118
11	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
12	CONCLUSÃO	126

1 INTRODUÇÃO

O *Eucalyptus* L'Hér é o gênero florestal mais extensivamente cultivado no mundo, com uma área plantada de cerca de 25 milhões de hectares (ha) (FLORÊNCIO; MARTINS; FAGUNDES, 2022). Este gênero representa uma das principais fontes globais de madeira e amplamente cultivado para uso industrial (DE OLIVEIRA *et al.*, 2012; MOURA *et al.*, 2012; TAMAYO-PENÑA *et al.*, 2024). A matéria-prima derivada do setor florestal é utilizada mundialmente na produção de diversos produtos ou para a geração de energia (REZENDE; DE REZENDE; DE ASSIS, 2014; SNIF, 2020). O Brasil se destaca como o maior produtor mundial de eucalipto e, em 2021, a cultura ocupou 7,53 milhões de ha (75,8%) do total de área plantada com árvores e teve um papel importante na economia nacional, contribuindo significativamente para a receita total de 244,6 bilhões de reais e gerando mais de 2 milhões de empregos (IBÁ, 2022). Assim, a importância econômica e socioeconômica dos recursos florestais tem impulsionado o crescimento do setor, embora a incidência de fatores bióticos, como pragas, e abióticos, tais como a seca advinda das alterações climáticas, ainda representem desafios a serem superados (BOOTH, 2013; GONCALVES *et al.*, 2013; MOTA; BARBOSA; MARCHIORO, 2022; ROCHA *et al.*, 2020).

No Brasil, devido ao incremento na demanda industrial por produtos florestais, a expansão das florestas plantadas em regiões com restrições hídricas relativamente intensas tem reduzido a produtividade e aumentado a taxa de mortalidade em razão da seca (HODECKER *et al.*, 2018). Diante desse cenário, a busca por genótipos mais tolerantes a estresses abióticos, como a seca, tem ganhado destaque, e as espécies *E. camaldulensis*, *E. tereticornis* e seus híbridos estão entre os genótipos de eucalipto mais resistentes à escassez de água (GONÇALVES *et al.*, 2013). Além disso, os fatores bióticos também representam uma ameaça para as plantações de eucalipto (TESHOME; ZHARARE; NAIDOO, 2020). À medida que as áreas de florestas naturais diminuem e as plantações de eucalipto se expandem, a migração de pragas provocada pela globalização, a falta de inimigos naturais nas novas áreas associado às condições ambientais favoráveis, tem possibilitado a disseminação de insetos-pragas exóticos (PAINE; STEINBAUER; LAWSON, 2011; SILVA *et al.*, 2020). Entre os insetos-pragas exóticos que ingressaram no Brasil, destaca-se a microvespa-da-galha do eucalipto, *Leptocybe invasa* (Fisher & LaSalle, 2004 Hymenoptera: Eulophidae) (GONÇALVES *et al.*, 2013). A *L. invasa* representa um fator biótico que impacta a sustentabilidade das plantações de eucalipto, especialmente dos híbridos de *E. camaldulensis* e *E. tereticornis* (MENDEL *et al.*, 2004).

A *L. invasa* é uma praga que induz galhas nas nervuras e pecíolos de folhas jovens e nos entrenós dos ápices dos ramos, causando danos devastadores, como a aparência áspera das

plantas, crescimento atrofiado e, em casos extremos, a morte das plantas (KUMARI *et al.*, 2010; MENDEL *et al.*, 2004; SARMENTO *et al.*, 2021). Embora estratégias de controle e manejo dessa praga tenham sido empregadas, a utilização de genótipos adaptados a diferentes condições climáticas, porém susceptíveis ao ataque da *L. invasa*, torna-se inviável em regiões com alta infestação (NUNES *et al.*, 2023). Nesse contexto, para enfrentar esse desafio, é essencial explorar estratégias integradas, como a associação planta-microrganismo. Nesse sentido, estudos com fungos endofíticos, como o *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill, têm despertado interesse devido à sua capacidade de conferir resistência nas plantas contra insetos-praga, como a vespa-da-galha do eucalipto (BARON *et al.*, 2019; ROCHA *et al.*, 2023). O *B. bassiana* é um fungo entomopatogênico frequentemente usado como biopesticida em culturas agrícolas, devido à sua segurança ambiental, não apresentar risco à saúde humana e provocar mínimos efeitos adversos em organismos não-alvo (ROCHA *et al.*, 2023; ZIMMERMANN, 2007). Em eucalipto, o uso do *B. bassiana* como agente biológico alternativo para o controle do inseto galhador *L. invasa* tem mostrado grande potencial por conferir a planta resistência ao ataque dessa praga (ROCHA *et al.*, 2023).

Os estudos moleculares, assim como os voltados para o controle biológico, tem ganhado progressiva atenção devido as diversas possibilidades que oferecem para as investigações sobre o eucalipto (DAUDE *et al.*, 2024; NUNES *et al.*, 2023; ROCHA *et al.*, 2023). O sequenciamento de *Eucalyptus grandis*, por exemplo, proporcionou avanços nos estudos moleculares ao fornecer informações sobre genes relacionados a vias metabólicas de interesse econômico (MYBURG *et al.*, 2014). Nesse sentido, a análise de expressão gênica é um método importante para auxiliar no entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos por trás de diferentes processos biológicos (BRAZMA; VILO, 2000), como a resposta de defesa a inoculação do *B. bassiana* e a infestação da *L. invasa*. Entre os métodos empregados, a Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real com transcrição reversa (RT-qPCR) é amplamente utilizada para o estudo de processos biológicos em plantas (BARRETO *et al.*, 2019; DAUDE *et al.*, 2021; HUANG *et al.*, 2024) devido à sua rapidez, alta sensibilidade, reprodutibilidade e precisão quanto a determinação dos níveis de expressão gênica (FERNANDES-BRUM *et al.*, 2017; GACHON; MINGAM; CHARRIER, 2004; LUCHO *et al.*, 2018). Contudo, é crucial considerar que o uso da RT-qPCR para quantificação de RNA está sujeito a vários fatores que afetam diretamente a confiabilidade dos resultados (NOLAN; HANDS; BUSTIN, 2006).

A integridade e quantidade de RNA (ácido ribonucleico), a eficiência da síntese do cDNA (DNA complementar) e da amplificação, e a escolha dos genes de referência são fatores cruciais que podem impactar fortemente os resultados das análises por meio da RT-qPCR

(LUCHO *et al.*, 2018; PFAFFL, 2004). Assim, para assegurar a reprodutibilidade e minimizar a variabilidade dos ensaios de RT-qPCR, é essencial avaliar esses parâmetros (NOLAN; HANDS; BUSTIN, 2006). Dentre os fatores mencionados, a determinação adequada dos genes de referência é um dos aspectos mais importantes ao empregar a análise de expressão gênica por RT-qPCR (MOURA *et al.*, 2012). A eficiência da técnica depende da validação de genes de referência apropriados para a normalização precisa dos ensaios e correção de variações inespecíficas (LIN *et al.*, 2023; YANG *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2013). Assim, a determinação de bons genes de referência, considerando sua estabilidade de expressão em diferentes tecidos e condições experimentais, é fundamental para garantir a qualidade e confiabilidade dos resultados (JOSEPH; POOLAKKALODY; SHAH, 2018).

O uso dos genes de referência na normalização de dados de expressão gênica por RT-qPCR é baseada na premissa teórica de que seus níveis de expressão permanecem constantes, independentemente de tecidos, estágios de desenvolvimento ou condições fisiológicas (NGUYEN; EAMENS; GROF, 2018; YANG; ZHANG; ZHOU, 2021). Genes envolvidos em funções celulares básicas em plantas, como *ACT*, *TUB*, *RNA ribossomal*, *GAPDH*, *UBQ*, *EF-1 α* , *UBC* e *PP2A*, são frequentemente escolhidos devido à sua capacidade de se expressar em todas as células (JOSEPH; POOLAKKALODY; SHAH, 2018; LIN *et al.*, 2023; YANG; ZHANG; ZHOU, 2021). No entanto, estudos evidenciam a variabilidade na expressão desses genes, comprometendo a normalização dos dados do gene alvo (LI *et al.*, 2022; REDDY *et al.*, 2016) e indicando a inexistência de genes de referência universais (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022; DONG; ZHANG; ZHANG, 2022; ZHONG *et al.*, 2022). Em eucalipto, estudos sobre genes de referência são relatados (BOAVA *et al.*, 2010; CASSAN-WANG *et al.*, 2012; DE OLIVEIRA *et al.*, 2012; FERNÁNDEZ *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2018; MOURA *et al.*, 2012). Contudo, tal análise ainda é necessária ao considerar genótipos específicos, tecidos variados e diferentes estresses (IMAI *et al.*, 2014; XIAO *et al.*, 2016). Nesse contexto, definir os melhores genes de referência em condições de inoculação por *B. bassiana* e infestação por *L. invasa* torna-se crucial para estudos de expressão gênica relativa, sendo uma lacuna a ser preenchida.

Os genes pertencentes à família AP2/EREBP (*APETALA2/Ethylene-Responsive Element Binding Proteins*) tem um papel crucial no crescimento, desenvolvimento e resposta a estresses em plantas, como temperaturas extremas, seca, alta salinidade e infecção por patógenos (LIU; ZHANG, 2017). Além disso, esses genes participam de vias de transdução de sinal relacionadas a hormônios, incluindo o ácido abscísico (ABA), etileno (ET), citocininas e jasmonato (CHEN *et al.*, 2016; NAKANO *et al.*, 2006). Os fitormônios como o JA, ácido salicílico (SA), ET e ABA desempenham papel crucial na regulação de importantes vias de sinalização de defesa associadas a esses genes (BOUAZIZ *et al.*, 2015). Em eucalipto, o ET é

o principal hormônio de defesa contra a *L. invasa* nas fases iniciais após a infestação, além de ser responsável pela modulação da defesa de plantas contra outros herbívoros e patógenos (BROEKGAAARDEN *et al.*, 2015; SARMENTO, 2019). A sinalização e interação entre fitormônios são fundamentais para orquestrar as respostas de defesa das plantas (PIETERSE *et al.*, 2009, 2012), ativando uma rede de fatores de transcrição (FTs) que regulam a expressão de genes relacionados à patogênese (PR) (HUANG; CATINOT; ZIMMERLI, 2016). O papel dos genes *ERF* (*Ethylene Response Factor*) na defesa de plantas parece ser conservado em todo o reino vegetal, agindo pela capacidade de se ligar ao DNA e a habilidade de ativar ou reprimir a transcrição (HUANG; CATINOT; ZIMMERLI, 2016). Embora, a maioria dos fatores de transcrição *ERF* (*Ethylene Response Factor*) estão associados a respostas a estresses abióticos, um pequeno grupo está envolvido nas respostas a estresses bióticos (FENG *et al.*, 2005; GUTTERSON; REUBER, 2004; LICAUSI; OHME-TAKAGI; PERATA, 2013), como evidenciado pelos genes *ERF1* (*ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1*), *ORA59* (*OCTADECANOIC-RESPONSIVE ARABIDOPSIS AP2/ERF59*), *ERF6* (*ETHYLENE RESPONSE FACTOR 6*) e *ERF96* (*ETHYLENE RESPONSE FACTOR 96*) em *Arabidopsis thaliana*, conhecidos por regular a imunidade inata (HUANG; CATINOT; ZIMMERLI, 2016).

Os genes PR, responsáveis por codificar proteínas com níveis basais ou não detectáveis em tecidos saudáveis, têm suas expressões aumentadas em condições de estresses bióticos, como ataques diretos de diferentes pragas (insetos e outros herbívoros) e patógenos (fungos, bactérias e vírus), e em situações relacionadas a pelo menos duas ou mais combinações planta-patógeno, incluindo a aplicação de produtos químicos que mimetizam o efeito do ataque de patógenos (por exemplo, os fitormônios ET, JA e AS), bem como em respostas a ferimentos (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006; VAN LOON; VAN STRIEN, 1999). Esses genes desempenham um papel crucial na defesa natural de plantas, interagindo com diferentes indutores, como os fitormônios AS, AJ e ET, além do peptídeo sinalizador *systemin* (HERNÁNDEZ *et al.*, 2005). Compreendendo cerca de 19 famílias (PR-1 a PR-19), os genes PR codificam proteínas como β -1,3-glucanases, quitinases, peroxidases, proteínas inativadoras de ribossomos, defensinas e oxalato oxidase, entre outras (STINTZI *et al.*, 1993; ZRIBI; GHORBEL; BRINI, 2021). Essas proteínas, podem exercer efeitos diretos ou indiretos na resistência da planta contra microrganismos, inibindo o crescimento do patógeno e/ou a germinação de esporos, além de atuarem como agentes antimicrobianos, hidrolases, inibidores de proteinase e desempenharem outras atividades (JAIN; KHURANA, 2018; ZRIBI; GHORBEL; BRINI, 2021).

Os insetos galhadores de plantas, como a *L. invasa*, apesar de serem artrópodes herbívoros (STONE; SCHÖNROGGE, 2003), estabelecem uma relação tão íntima com o

hospedeiro que alguns já foram comparados com patógenos (KALOSHIAN; WALLING, 2005). Nesse sentido, a análise dos genes de resposta à patogênese, bem como os fatores de transcrição que os regulam, pode ser um caminho promissor para compreender a resposta gênica ao ataque a microvespa. Nesse contexto, o uso da biotecnologia por meio dos métodos moleculares se apresenta como uma ferramenta poderosa no desenvolvimento de pesquisa básica e aplicada visando alcançar uma gestão sustentável das plantações de eucalipto, bem como, a recomendação de genótipos adequados e menos vulneráveis a fatores bióticos que impactam negativamente a cultura. Portanto, considerando a importância da técnica de RT-qPCR para os estudos de expressão gênica, o objetivo do trabalho foi selecionar e validar genes de referência para estudos de expressão gênica por RT-qPCR em híbrido de *E. tereticornis* x *E. camaldulensis* em diferentes condições experimentais, bem como a analisar a expressão relativa dos genes *ERF* e *PR*. As análises incluíram amostras de plantas matrizes, mudas limpas (sem inoculação e sem infestação), mudas inoculadas com *B. bassiana* (sem infestação), mudas infestadas com *L. invasa* (sem inoculação), e mudas inoculadas com *B. bassiana* e infestadas com *L. invasa* (inoculadas e infestadas).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a expressão gênica relativa por RT-qPCR dos genes *ERF* e *PR* em resposta ao ataque da vespa-da-galha-do-eucalipto em mudas de híbridos de *Eucalyptus tereticornis* x *Eucalyptus camaldulensis* inoculadas com o fungo *B. bassiana*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Selecionar e validar os genes de referência mais adequados para diferentes tecidos e condições experimentais de eucalipto, visando fornecer resultados que suportem futuros trabalhos de expressão gênica por RT-qPCR.
- b) Avaliar o perfil de expressão gênica relativa por RT-qPCR dos genes *ERF* e *PR* em quatro condições experimentais, sendo: plantas controle; plantas inoculadas com o fungo *B. bassiana*, plantas infestadas por *L. invasa*; plantas inoculadas com *B. bassiana* e infestadas com *L. invasa*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Eucalyptus* L'Hér

O gênero *Eucalyptus* L'Hér pertence à família botânica Myrtaceae Juss. e compreende, aproximadamente, 600 espécies e subespécies (MOURA *et al.*, 2012). Nativo da Oceania, com sua origem preponderante localizada na Austrália, este gênero apresenta notável plasticidade fisiológica, sendo capaz de crescer variadas zonas geográficas, predominantemente em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (MOURA *et al.*, 2012; RITTER, 2014). A disseminação global do eucalipto é atribuída a uma série de atributos inerentes a esta cultura, destacando-se a sua ampla adaptabilidade a diferentes contextos climáticos e tipos de solo (PROBER *et al.*, 2016), baixa exigência nutricional, crescimento rápido, ciclos de cultivo de curta duração e aptidão para plantio em escala comercial (PAINE; STEINBAUER; LAWSON, 2011). Além disso, o eucalipto oferece uma grande diversidade de madeiras e aplicações em produtos correlatos, contribuindo significativamente para sua importância econômica (CUBBAGE *et al.*, 2010).

As plantações de eucalipto são compostas predominantemente por um grupo de espécies que incluem *E. camaldulensis*, *E. grandis*, *E. tereticornis*, *E. globulus*, *E. nitens*, *E. urophylla*, *E. saligna*, *E. dunnii* e *E. pellita*, bem como seus híbridos (STANTURF *et al.*, 2013). Dentre as espécies, a *E. globulus* se destaca como uma das mais amplamente plantadas e economicamente importantes (POTTS *et al.*, 2004). A matéria-prima proveniente do eucalipto é responsável por uma ampla variedade de produtos e subprodutos, derivados do aproveitamento de suas cascas, madeira, galhos, resina, folhas, flores e frutos. A produção dessa árvore é destinada para diversos setores, incluindo: farmacêuticos e cosméticos; produtos de limpeza e alimentos; papel e celulose; energia; produção de produtos sólidos da madeira; apicultura; e ornamentação (IBÁ, 2022; REZENDE; DE RESENDE; DE ASSIS, 2014; SNIF, 2020).

3.2 SETOR FLORESTAL E SUA IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

Em 2020, considerando todos os continentes, a área florestal mundial totalizou 4,06 bilhões de hectares (ha), o que equivale a 31% da superfície terrestre global. Dos 4,06 bilhões de ha, 54% estão concentrados em apenas cinco países: Federação Russa, Brasil, Canadá, Estados Unidos da América e China. A maior extensão de floresta encontra-se na Europa, com a Federação Russa detendo 20% (815 milhões de ha) da área florestal mundial. Na América do Sul, o Brasil é o proprietário de 12% (496 milhões de ha), seguido por Canadá (América do

Norte), Estados Unidos da América (América do Norte) e China (Ásia) com, respectivamente, 9% (346 milhões de ha), 8% (309 milhões de ha) e 5% (219 milhões de ha) da área florestal mundial. Em conjunto, a Federação Russa e o Brasil representam quase um terço da área florestal mundial (FAO, 2020).

A área total de florestas plantadas no mundo é estimada em 294 milhões de ha, o que representa 7% da área florestal mundial. Na última década (2010-2020), o crescimento médio anual das florestas plantadas foi de 3,06 milhões de ha, com aumento total de 31,9 milhões de ha. Do crescimento total, o maior aumento é observado na Ásia com 15,5 milhões de ha durante o período. A América Central e a do Norte tem o segundo maior aumento com 6,3 milhões de ha. Na América do Sul, o incremento foi de, aproximadamente, 5,4 milhões de ha, apoiado pelo Brasil, no qual o incremento foi de 390 mil hectares anuais. Na Europa, África e Oceania o crescimento foi de, respectivamente, 3,5 milhões, 766 mil e 321 mil de ha. Na totalidade, a participação global das florestas plantadas em relação à área total, durante a última década, registrou um aumento de 13,5%, enquanto na América do Sul esse índice cresceu em 40,4% (FAO, 2020).

O crescimento observado no setor florestal está diretamente associado ao uso das árvores como matéria-prima. Os produtos advindos das árvores cultivadas são indispensáveis no cotidiano de milhares de pessoas no Brasil e no mundo, embora seu uso pela população frequentemente passe despercebido. Mundialmente, a matéria-prima derivada do setor florestal é amplamente aplicada na produção de diversos produtos, como em estruturas de construções civis, mobílias, artigos decorativos, papéis gráficos e de higiene, produtos farmacêuticos, cosméticos, ou para a geração de energia (REZENDE; DE RESENDE; DE ASSIS, 2014; SNIF, 2020). Em 2021, a área total de árvores plantadas no Brasil totalizou 9,93 milhões de hectares, sendo a produção destinada a vários segmentos, como a indústria de papel e celulose, siderúrgicas a carvão vegetal, produtos sólidos de madeira e produção de painéis de madeira e pisos laminados (IBÁ, 2022).

No Brasil, o setor de árvores plantadas tem papel importante na economia nacional, tendo alcançado uma receita total de 244,6 bilhões de reais em 2021. O valor adicionado da cadeia produtiva florestal a economia brasileira cresceu 7,5%, sendo superior a evolução do PIB nacional durante o mesmo período. Além do impacto econômico em nível nacional, a abrangência em mais de 1.000 municípios em todo o Brasil gera milhões de empregos anualmente e contribui para o desenvolvimento socioeconômico e rotação da economia local. Em 2021, o setor fechou o ano com mais de 2 milhões de empregos gerados, sendo 553 mil postos de trabalho diretos e 1,59 milhão indiretos. É importante notar que cada emprego direto

no setor de base florestal resulta em 5,3 empregos indiretos ao longo das cadeias de produção que utilizam produtos ou insumos da Indústria Brasileira de Árvores (IBÁ, 2022).

3.3 CULTIVO DO EUCALIPTO NO BRASIL

A área total de árvores plantas no Brasil, em 2021, apresentou um crescimento de 1,9% em relação ao ano anterior, atingido a marca de 9,93 milhões de ha. Do total, os plantios de eucalipto representam a maior parcela da área plantada com árvores. A espécie ocupa 75,8% (7,53 milhões de ha) da área total, seguido por pinus, com 19,4% (1,93 milhões de ha). A área restante (475 mil de ha) é preenchida com outras espécies, entre elas a seringueira, acácia, teca e paricá. A maior parte dos plantios de eucalipto está concentrada nos estados de Minas Gerais (MG), Mato Grosso do Sul (MS) e São Paulo (SP), com respectivamente, 30%, 14% e 13% do total nacional (IBÁ, 2022). O crescimento da cultura do eucalipto é resultado direto dos investimentos em pesquisa visando a produção de clones de materiais genéticos adaptados aos diferentes ambientes onde são cultivados, e com alta produtividade (BNB, 2021).

O Brasil dispõe de um potencial produtivo de eucalipto superior em comparação a outras regiões do mundo. Ao longo dos anos, a produtividade média por hectare tem aumentado significativamente, passando de 10 m³/ha/ano em 1970 para 38,9 m³/ha/ano em 2021. A melhoria da produtividade nas áreas de cultivo é reflexo dos investimentos em tecnologia e capacitação profissional, pois permite avanços no manejo sustentável dos plantios florestais, controle de doenças e pragas, fertilização do solo, aproveitando as condições naturais favoráveis do Brasil (IBÁ, 2022).

3.4 DESAFIOS NO CULTIVO DO EUCALIPTO

O amplo cultivo da cultura, o crescimento constante da área plantada e a aplicação diversificada da matéria-prima na indústria, evidencia a importância do eucalipto para o setor florestal (IBÁ, 2020). Embora os aspectos particulares dessa cultura, como a adaptabilidade, permitiram sua disseminação global (TEULIÈRES *et al.*, 2007), outros fatores podem afetar a sustentabilidade das plantações de eucalipto, incluindo: o custo de produção, visto o aumento dos fertilizantes devido ao alto custo de energia e a escassez de recursos de fósforo e potássio no mundo; o uso de áreas menos favoráveis devido a competição com a agricultura; o aumento de eventos de seca (fator abiótico) devido às mudanças climáticas; a rápida disseminação de pragas e doenças (fator biótico); e a percepção negativa do impacto ambiental das plantações

de eucalipto, especialmente quando são monoespecíficas (LACLAU; GONÇALVES; STAPE, 2013).

As mudanças climáticas, como o aumento dos eventos de seca, devido ao aquecimento global é uma forte preocupação quanto as florestas. As emissões de gases de efeito estufa contribuem para eventos (surtos) de pragas e fogo, uma vez que influencia diretamente para um clima mais seco e quente, sendo responsáveis pela mortalidade mundial de florestas (ALLEN *et al.*, 2010). No Brasil, devido ao incremento na demanda industrial por produtos florestais, a expansão das florestas plantadas em áreas com restrições hídricas relativamente intensas tem reduzido a produtividade e aumentado a taxa de mortalidade por seca (HODECKER *et al.*, 2018). Nesse contexto, a necessidade de utilizar genótipos mais tolerantes à estresses abióticos, como o hídrico, têm impulsionado a busca por plantas com tais características (FERREIRA *et al.*, 2023; NAVARRO *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2021). As espécies *E. camaldulensis*, *E. teretinornis*, assim como seus híbridos estão entre as espécies de eucalipto com maior tolerância à seca (GONÇALVES *et al.*, 2013).

Os fatores bióticos, assim como os abióticos, também constituem uma ameaça para as florestas plantadas com eucalipto (TESHOME; ZHARARE; NAIDOO, 2020). À medida que as áreas de florestas naturais diminuem e as plantações de eucalipto se expandem, a ausência de inimigos naturais, juntamente com condições ambientais favoráveis, tem possibilitado a disseminação de insetos-pragas exóticos que surgem devido a globalização. Esse fato, tem ameaçado a produtividade, qualidade e sustentabilidade do setor de florestas plantadas de eucalipto e causado perdas na produção (PAINE; STEINBAUER; LAWSON, 2011). Dentre os insetos-pragas exóticos ingressado no Brasil, pode-se destacar a microvespa-da-galha do eucalipto *Leptocybe invasa* (Fisher & LaSalle, 2004 Hymenoptera: Eulophidae). A microvespa-da-galha do eucalipto é um fator biótico que afeta a sustentabilidade das plantações de eucalipto, uma vez que causa graves danos ao eucalipto através da indução de galhas em pecíolos de folhas jovens e na casca macia de galhos (MENDEL *et al.*, 2004). Desse modo, os fatores bióticos e abióticos ainda impactam negativamente as florestas de eucalipto e tornam-se desafios a serem superados (BOOTH, 2013; GONCALVES *et al.*, 2013).

3.4.1 *Leptocybe invasa*

A *L. invasa* (Figura 1), originária da Austrália, foi identificada no Oriente Médio e na região do Mediterrâneo no início do século XXI (MENDEL *et al.*, 2004). O inseto rapidamente se disseminou por todo o mundo, sendo detectado em 45 países de cinco continentes. Além disso, é provável que essa praga esteja presente em muitos outros países não reportados

(ZHENG *et al.*, 2014). No Brasil, o primeiro relato da aparição da *L. invasa* foi no estado da Bahia, em 2008 (COSTA *et al.*, 2008). Posteriormente, o surgimento do inseto foi relatado em vários outros estados, incluindo São Paulo (PURETZ *et al.*, 2015), Paraná (RINALDI *et al.*, 2013), Minas Gerais (FERNANDES *et al.*, 2014), Espírito Santo (PURETZ *et al.*, 2015), Goiás (PEREIRA *et al.*, 2014), Maranhão (PURETZ *et al.*, 2015), Mato Grosso (ORTIZ *et al.*, 2017), Mato Grosso do Sul (PURETZ *et al.*, 2015), Pará (LUNZ *et al.*, 2014), Pernambuco (PURETZ *et al.*, 2015), Rio Grande do Sul (GARLET *et al.*, 2013), Sergipe (ALMEIDA *et al.*, 2023), Tocantins (SARMENTO *et al.*, 2022) e Santa Catarina (BARBOSA *et al.*, 2018). A *Leptocybe* spp. compreende duas linhagens geneticamente distintas, sendo a *L. invasa* (A) e *Leptocybe* spp. (B) (DITTRICH-SCHRÖDER *et al.*, 2018; NUGNES *et al.*, 2015). A *L. invasa* está presente em Israel, África do Sul, Uganda, Moçambique, Itália, Brasil e Quênia, enquanto os outros grupos são referidos como *Lecptocybe* spp. (DITTRICH-SCHRÖDER *et al.*, 2018).



Figura 1 – foto de uma microvespa-da-galha do eucalipto (*L. invasa*) fêmea.
Fonte: MENDEL *et al.*, (2004).

A *L. invasa* é uma microvespa galhadora que infesta plantas dos gêneros *Eucalyptus* e *Corymbia* (MENDEL *et al.*, 2004; QUANG THU; DELL; BURGESS, 2009). As fêmeas adultas de *Leptocybe* spp. medem entre 1,1 e 1,4 mm (MENDEL *et al.*, 2004; ZHU *et al.*, 2015), ao passo que os machos adultos possuem dimensões que variam de 0,97 a 1,16 mm (ZHU *et*

al., 2015). O ciclo de vida completo da *Leptocybe* spp. são divididos, basicamente, nos estádios de ovo, larva, pupa e adultos, embora seja possível observar estádios de desenvolvimento intermediários, como larva pequena, larva madura, pré-pupa e pré-adulto. Exceto para a fase adulta, todas os estádios de desenvolvimento da vespa ocorrem dentro da planta hospedeira. O tempo necessário para o desenvolvimento dentro do hospedeiro varia, em função da temperatura, entre 43,3 e 375,7 dias (MENDEL *et al.*, 2004; ZHU *et al.*, 2015). Em relação as características físicas, em fase de larva, a microvespa apresenta coloração branca, não há pernas, além de ter tamanho minúsculo. Na fase adulta, a coloração da cabeça e do corpo é marrom-escuro, tem brilho metálico com tom azulado e esverdeado; a coxa anterior amarela e as coxas média e posterior da mesma cor do corpo; e pernas e tarsos amarelos (MENDEL *et al.*, 2004).

A *L. invasa* é considerada uma praga que causa sérios danos as plantações de eucalipto devido a oviposição e, conseqüentemente, a formação de galhas (Figura 2). As galhas são formadas, principalmente, ao longo de todo o comprimento das veias, pecíolos de folhas jovens, entrenós dos ramos apicais e na casca macia de galhos das mudas (em todas as fases de viveiro) e em plantações recém-estabelecidas. As galhas são capazes de modificar a circulação normal da seiva nos tecidos vasculares, modificando a produção de metabólitos relacionados ao processo fotossintético e afetando o desenvolvimento das plantas atacadas. Como resultado desse dano, ocorre o enfraquecimento das árvores, a desaceleração de seu crescimento e, em genótipos mais suscetíveis, a morte (MENDEL *et al.*, 2004; SARMENTO *et al.*, 2021). O período de oviposição ocorre entre os meses de abril a outubro, no qual a vespa fêmea pode ovipositar entre 80 e 100 ovos. Devido a reprodução ser por partenogênese telítoca, isto é, processo contínuo no qual há a origem de novas fêmeas sem a necessidade da presença e do cruzamento com um macho, o potencial de crescimento populacional é aumentado, havendo a geração de duas a três gerações de indivíduos por ano (MENDEL *et al.*, 2004; ZHU *et al.*, 2015).

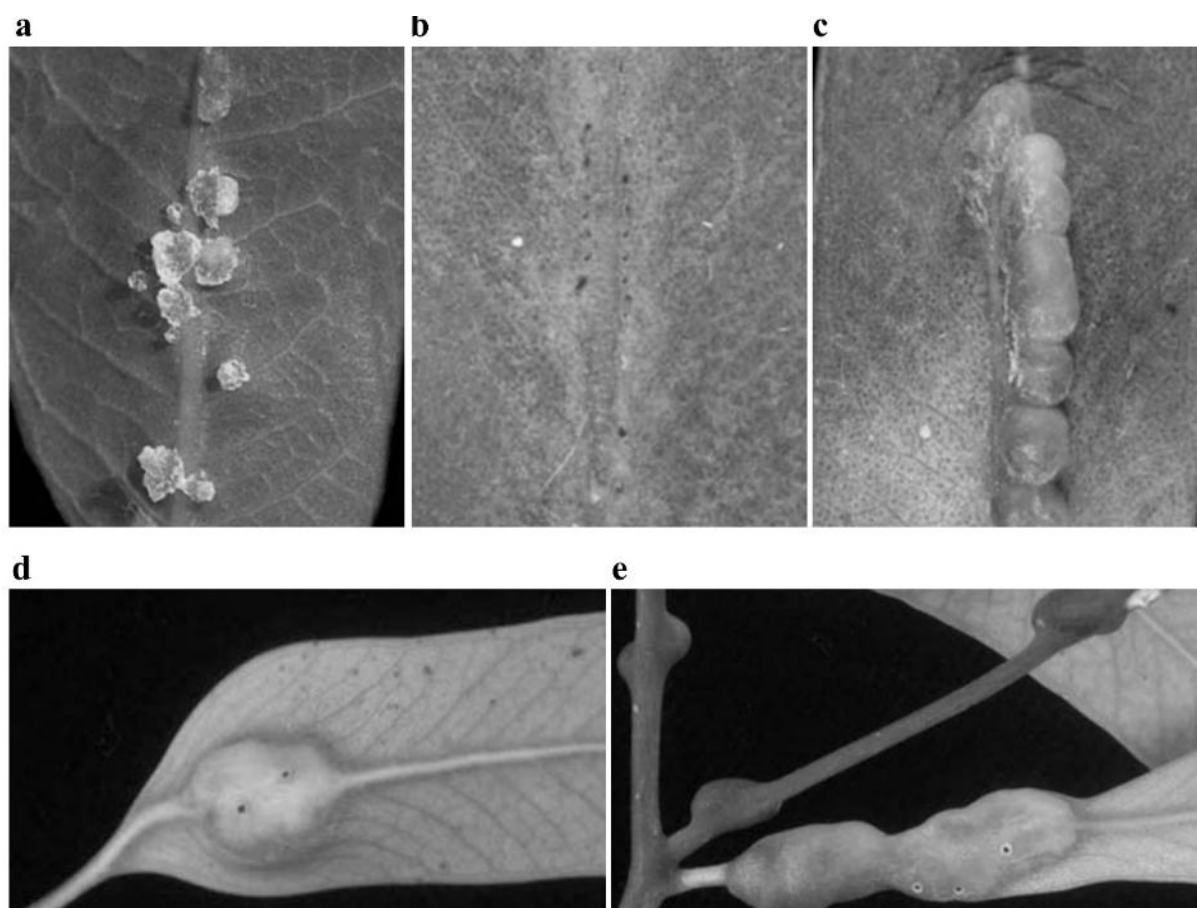


Figura 2 – Formação de galhas em *E. camaldulensis* após a infestação com *L. invasa*: **a)** folha 3 dias após a oviposição, mostrando secreções brancas das feridas de oviposição; **b)** folha após 3 semanas, mostrando estágios iniciais da formação de galhas; **c)** galha após 6–7 semanas; **d)** e **e)** galhas maduras, mostrando orifícios de saída.
Fonte: adaptado de MENDEL *et al.*, (2004).

3.5 CONTROLE BIOLÓGICO

Os insetos-pragas são um importante fator limitante para o cultivo do eucalipto pois, dada a ausência de órgãos de locomoção, as plantas são incapazes de se deslocar e escapar de herbívoros e patógenos, tornando-as dependentes de outros mecanismos de defesa (ROCHA *et al.*, 2023), como as defesas constitutivas e induzidas (MITCHELL *et al.*, 2016; OATES *et al.*, 2016). As defesas constitutivas envolvem a formação de estruturas que estabelecem barreiras físicas contra o forrageamento, alimentação e oviposição de insetos, ou a produção de compostos químicos tóxicos para os herbívoros (MITCHELL *et al.*, 2016). Em relação as defesas induzidas, o mecanismo permanece inativo até a identificação do ataque à planta, evitando assim gastos energéticos desnecessários. Após a identificação do ataque, há a produção de estrutura e metabólitos que desempenham papel de defesa (OATES *et al.*, 2016). Dessa forma, os mecanismos de defesa adquiridos pelas plantas ao longo do processo evolutivo foram e são fundamentais para sua sobrevivência, entretanto, assim como as plantas, os insetos

também se adaptaram a esses mecanismos, permitindo evitá-los ou superá-los (TOOKER; GIRON, 2020).

Os microrganismos endofíticos, mediante a associação simbiótica com as plantas, têm o potencial de induzir uma série de efeitos benéficos, tais como o reforço das defesas vegetais, a redução dos danos provocados por patógenos ou insetos, a aceleração do processo de germinação de sementes, o ajuste do desenvolvimento vegetal em condições adversas, e a promoção do crescimento vegetal (BAILEY *et al.*, 2008; DINESH *et al.*, 2017; RYAN *et al.*, 2008; ZHANG; SONG; TAN, 2006). Nesse contexto, a utilização desses microrganismos emerge como uma alternativa eficaz para o controle de insetos-praga, uma vez que constituem um grupo diversificado de entomopatógenos com capacidade regulatória sobre as populações de insetos-praga (QAYYUM *et al.*, 2021). Assim, o interesse em estudos relacionados à associação planta-microrganismo, especialmente com organismos endofíticos, tem crescido devido às limitações dos sistemas de defesa das plantas e aos danos causados pelo ataque de insetos-praga, como a vespa-da-galha do eucalipto (BARON *et al.*, 2019; ROCHA *et al.*, 2023).

Beauveria bassiana (Bals.) Vuill (Ascomycota: Hypocreales) é um fungo entomopatogênico cosmopolita, com distribuição global e uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo a maioria das ordens de insetos (Coleoptera, Diptera, Hemiptera e Lepidoptera) e os artrópodes da subclasse Acari (FARIA; WRIGHT, 2007; KIRKLAND; WESTWOOD; KEYHANI, 2004). Além da sua capacidade de parasitar insetos, o *B. bassiana* foi identificado colonizando diversas espécies de plantas, demonstrando a habilidade de proteger plantas contra patógenos (KIRKLAND; WESTWOOD; KEYHANI, 2004; OWNLEY *et al.*, 2008) por meio da produção de metabólitos secundários com propriedades toxigênicas, que afetam direta e indiretamente os insetos por meio de antibiose ou antixenose (VIDAL; JABER, 2015). Esse fungo pode atuar tanto como endofítico quanto como entomopatogênico (AMOBONYE *et al.*, 2020), colonizando tecidos do hospedeiro tanto acima quanto abaixo do solo (RAMAN; SURYANARAYANAN, 2017).

A integração de *B. bassiana* com outros organismos de controle biológico, como nematóides e parasitas, juntamente com a implementação de boas práticas agrícolas, demonstrou eficácia na redução do uso de pesticidas químicos, constituindo uma ferramenta relevante dentro de um sistema integrado de manejo de pragas (ERLER; ATES, 2015). O uso do fungo *B. bassiana* como biopesticida fundamenta-se em sua segurança ambiental, ausência de risco à saúde humana e mínimos efeitos adversos em organismos não-alvo (ZIMMERMANN, 2007). Dessa forma, *B. bassiana* é frequentemente adotado como um agente de biocontrole em culturas agrícolas, emergindo como uma alternativa viável aos inseticidas sintéticos. No contexto do eucalipto, a utilização de *B. bassiana* como agente biológico

alternativo para controlar a *L. invasa* tem revelado considerável potencial, conferindo resistência à planta contra os ataques dessa praga (ROCHA *et al.*, 2023).

3.6 ESTUDOS MOLECULARES

Os estudos moleculares têm desempenhado um papel significativo em diversas pesquisas, visto as amplas possibilidades que as técnicas moleculares oferecem para investigações sobre diferentes espécies e condições. No contexto do eucalipto, a seleção e o desenvolvimento de genótipos resistentes, bem como a implementação de estratégias que envolvem a liberação de agentes de controle biológico para enfrentar o ataque da *L. invasa*, destacam-se como as principais abordagens exploradas. Essas iniciativas visam estabelecer métodos de controle eficazes, fundamentais para assegurar a produtividade e a sustentabilidade do setor florestal (HURLEY *et al.*, 2016), uma vez que no Brasil ainda não há um método estabelecido (ZHENG *et al.*, 2014). Nesse sentido, os estudos moleculares e as pesquisas voltadas ao controle biológico têm ganhado progressiva atenção devido ao seu potencial na busca por métodos eficazes para enfrentar o ataque da *L. Invasa* (PINSUPA *et al.*, 2023; ROCHA *et al.*, 2023).

O sequenciamento da espécie *Eucalyptus grandis*, por exemplo, foi importante para o avanço nos estudos moleculares, proporcional informações valiosas sobre genes associados a vias metabólicas de interesse econômico (MYBURG *et al.*, 2014). Nesse contexto, diversos estudos voltados para o eucalipto, com objetivos diferentes, têm empregado uma variedade de técnicas moleculares, incluindo clonagem e expressão molecular (LI *et al.*, 2019), marcadores moleculares (BORTOLOTO *et al.*, 2020), expressão gênica relativa por RT-qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa com Transcrição Reversa) (CORREIA *et al.*, 2018), análise por RNA-Seq (PINSUPA *et al.*, 2023) e transformação genética (SASAKI *et al.*, 2019). Dessa maneira, com o acesso a essas ferramentas e a expansão dessas pesquisas para espécies não-modelo, torna-se possível integrar essas abordagens em programas de melhoramento florestal, complementando as tradicionais análises fisiológicas (BOOTH, 2013).

3.6.1 Reação em Cadeia a Polimerase em tempo real

A técnica de PCR foi desenvolvida por Kary Mullis em 1983 e posteriormente publicada em 1986 (MULLIS *et al.*, 1986). Desde sua introdução no final da década de 1990, a técnica revolucionou todos os aspectos da biologia molecular, tornando-se imprescindível em laboratórios de análise molecular (PRADA-ARISMENDY; CASTELLANOS, 2011). O

conceito simples e prático, aliado à velocidade, sensibilidade e especificidade, fizeram da técnica um padrão para quantificação de ácidos nucleicos, consolidando-a como uma das ferramentas mais utilizadas em pesquisa (BUSTIN *et al.*, 2009). Além disso, a PCR foi a base para o desenvolvimento de técnicas derivadas e aprimoradas, como a RT-qPCR, que consiste na captação da fluorescência emitida por fluoróforos presentes na reação (WITTEWER *et al.*, 1997), diferentemente da PCR convencional, na qual esses fluoróforos não são utilizados diretamente na reação.

A quantificação de sequências-alvo por meio da RT-qPCR ou qPCR consiste na detecção e mensuração dos produtos (*amplicons*) ao longo de cada ciclo da reação de amplificação. A quantificação baseia-se na medição constante do aumento no sinal de fluorescência durante a amplificação, pois o nível de fluorescência é diretamente proporcional à quantidade de material genético (DNA ou cDNA) presente em cada ciclo reacional (ARYA *et al.*, 2005; BUSTIN *et al.*, 2005). Assim, essa técnica é amplamente aplicada em diversas áreas de pesquisa clínica e biológica, abrangendo biotecnologia, microbiologia, diagnóstico, detecção de patógenos vegetais, discriminação de alelos, análise de organismos geneticamente modificados, genotipagem de SNP (polimorfismo de nucleotídeo único), teste de patógenos alimentares, estudos forenses e expressão gênica (SHAKEEL *et al.*, 2018).

A análise de expressão gênica relativa por RT-qPCR é amplamente utilizada e se destaca pela sua rapidez, sensibilidade, reprodutibilidade e precisão quanto à quantificação dos níveis de transcrição gênica (FERNANDES-BRUM *et al.*, 2017; LUCHO *et al.*, 2018). No entanto, sua aplicação exige atenção à parâmetros críticos que devem ser rigorosamente controlados para assegurar a qualidade dos resultados, como a integridade e quantidade de RNA (ácido ribonucleico), qualidade do cDNA (DNA complementar), número de repetições, eficiência da amplificação e escolha adequada dos genes de referência (LUCHO *et al.*, 2018; PFAFFL, 2004). Assim, o estudo minucioso desses parâmetros, especialmente a seleção criteriosa dos genes de referência, representa um desafio, sobretudo em espécies com estudos limitados, dada a importância desses fatores para o sucesso da técnica e a obtenção de resultados confiáveis.

3.6.2 Genes de referência

A análise de expressão gênica relativa por RT-qPCR envolve necessariamente o uso de fórmulas, como as descritas por Livak e Schmittgen (2001) e Pfaffl (2001), para calcular os níveis de expressão gênica. O cálculo requer uma etapa crucial de normalização dos dados (SONG *et al.*, 2022), necessária para corrigir as variações experimentais, como diferenças na coleta das amostras, extração de RNA total, síntese de cDNA e procedimentos inerentes à

própria técnica de RT-qPCR, garantindo a precisão, reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados (BUSTIN *et al.*, 2009; KOZERA; RAPACZ, 2013). Nesse contexto, uma estratégia frequentemente adotada é o uso de genes de referência como padrões internos de normalização. Essa abordagem é amplamente reconhecida como uma das mais eficientes para corrigir variações inespecíficas e alcançar uma normalização precisa dos dados de expressão gênica por RT-qPCR (LIN *et al.*, 2023; MUGHAL *et al.*, 2018).

Os genes constitutivos são amplamente utilizados como genes de referência, fundamentando-se na premissa teórica de manterem níveis de expressão constantes, independentemente dos tecidos, estágios de desenvolvimento ou condições fisiológicas das espécies avaliadas (NGUYEN; EAMENS; GROF, 2018; YANG; ZHANG; ZHOU, 2021). Assim, diferentes genes relacionados à manutenção de funções celulares básicas, como divisão celular, crescimento e desenvolvimento, apoptose, e outros processos fisiológicos, frequentemente são utilizados como genes de referência devido à sua capacidade de expressão em todas as células (JOSEPH; POOLAKKALODY; SHAH, 2018). Em plantas, genes como *ACT*, *TUB*, *RNA ribossomal (18S rRNA, 26S rRNA)*, *GAPDH*, *UBQ*, *EF-1 α* , *UBC* e *PP2A* são historicamente empregados como genes de referência na quantificação da expressão gênica por RT-qPCR (LIN *et al.*, 2023; YANG; ZHANG; ZHOU, 2021). Contudo, estudos têm indicado que a expressão de genes considerados como referência pode variar, resultando em uma normalização incorreta dos dados do gene alvo (LI *et al.*, 2022; REDDY *et al.*, 2016), demonstrando a inexistência de genes de referência universais (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022; DONG; ZHANG; ZHANG, 2022; YU *et al.*, 2019; ZHONG *et al.*, 2022).

A seleção criteriosa dos genes de referência é uma etapa crucial na análise de expressão gênica relativa por RT-qPCR (MOURA *et al.*, 2012). A eficácia da técnica está intrinsecamente ligada à escolha dos genes de referência apropriados, capazes de normalizar os dados de expressão e minimizar a variação entre amostras durante as etapas experimentais iniciais (YANG *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2013). Portanto, é essencial realizar a seleção e validação criteriosa dos genes de referência com base em sua estabilidade de expressão em diferentes tecidos e condições experimentais para garantir a qualidade dos resultados (JOSEPH; POOLAKKALODY; SHAH, 2018), visto que o uso de genes de referência inadequados compromete a precisão e a confiabilidade das análises. Nesse contexto, vários estudos foram realizados em eucalipto com o objetivo de identificar os melhores genes de referência (BOAVA *et al.*, 2010; CASSAN-WANG *et al.*, 2012; DE ALMEIDA *et al.*, 2010; DE OLIVEIRA *et al.*, 2012; FERNÁNDEZ *et al.*, 2010; MARTINS *et al.*, 2018; MOURA *et al.*, 2012; SUNDARI; DASGUPTA, 2012). Contudo, tal análise ainda é necessária quando se utiliza genótipos específicos, altera os tecidos utilizados e induz diferentes estresses na planta (IMAI *et al.*, 2014;

XIAO *et al.*, 2016), sendo é importante destacar que estudos sobre a identificação dos melhores genes de referência em plantas de eucalipto inoculadas com o fungo *B. bassiana* e submetidas à infestação por *L. invasa* ainda são escassos.

3.6.3 Genes *AP2/EREBP*

A superfamília *AP2/EREBP* é um dos maiores grupos de fatores de transcrição de plantas (CHEN *et al.*, 2016) e compartilha uma região altamente conservada (*AP2 DNA binding domain*) com 50 a 70 resíduos de aminoácidos (ALLEN *et al.*, 1998). Os genes pertencentes à superfamília são divididos, baseando no número de domínios AP2 e na similaridade da sequência em três famílias: AP2, RAV (relacionada com ABI3/VP1) e ERF (fator de resposta ao etileno) (CHEN *et al.*, 2016). A família AP2, essencial no desenvolvimento de plantas, possui dois domínios AP2 (SHIGYO; ITO, 2004). A família RAV, com domínios AP2 e B3 *DNA binding domain*, regula negativamente o desenvolvimento, além de ser importante na resposta a estresse biótico e abiótico das plantas (FENG *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2015). A família ERF, com um único domínio AP2, regula vários processos em plantas. Além disso, a família ERF é subdividida em duas subfamílias, ERF e DREB (proteína de ligação a elementos sensíveis à desidratação), com base na sequência de aminoácido (NAKANO *et al.*, 2006). A subfamília ERF possui na 14^o e 19^o posição a alanina (A14) e o ácido aspártico (D19), enquanto a subfamília DREB possui a valina (V14) e ácido glutâmico (E19) nessas mesmas posições (LIU; ZHANG, 2017; SAKUMA *et al.*, 2002).

Os genes pertencentes à família *AP2/EREBP* desempenham um papel crucial no crescimento, desenvolvimento e na resposta aos diversos estresses em plantas, como temperaturas extremas, seca, alta salinidade e infecção por patógenos (LIU; ZHANG, 2017). Além disso, esses genes também participam de diversas vias de transdução de sinal relacionadas a hormônios, incluindo o ácido abscísico (ABA), etileno (ET), citocininas e jasmonatos (CHEN *et al.*, 2016; NAKANO *et al.*, 2006). Desse modo, moléculas sinalizadoras como o ácido jasmônico (JA), ácido salicílico (SA), etileno (ET) e ácido abscísico (ABA) atuam na regulação de várias vias importantes de sinalização de defesa que envolvem esses genes (BOUAZIZ *et al.*, 2015). A sinalização e a interação entre fitormônios desempenham um papel fundamental na orquestração das respostas de defesa das plantas (PIETERSE *et al.*, 2009, 2012), ativando uma rede de fatores de transcrição (TFs) que regulam a expressão de genes relacionados à patogênese (PR) (HUANG; CATINOT; ZIMMERLI, 2016).

O papel dos genes *ERFs* na defesa de plantas parece ser conservado em todo o reino vegetal, sendo seu modo de ação definido por dois fatores principais: capacidade de se ligar ao

DNA e a habilidade de ativar ou reprimir a transcrição (HUANG; CATINOT; ZIMMERLI, 2016). Na literatura, a maioria dos fatores de transcrição *ERF* estão associados a respostas a estresses abióticos, enquanto um pequeno grupo está envolvido com a resposta a estresses biótico (FENG *et al.*, 2005; GUTTERSON; REUBER, 2004; LICAUSI; OHME-TAKAGI; PERATA, 2013). Em *Arabidopsis thaliana*, os genes *ERF1* (*Ethylene Response Factor 1*), *ORA59* (*OCTADECANOIC-RESPONSIVE ARABIDOPSIS AP2/ERF59*), *ERF6* (*Ethylene Response Factor 6*) e *ERF96* (*Ethylene Response Factor 96*) são conhecidos por estarem envolvidos na regulação da imunidade inata (Figura 3) (HUANG; CATINOT; ZIMMERLI, 2016).

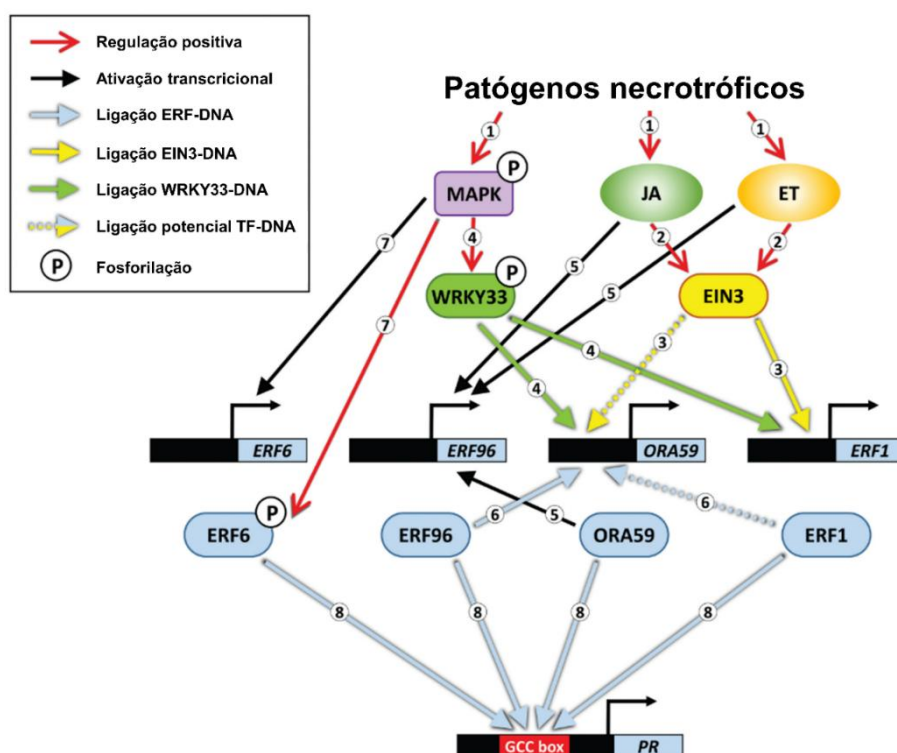


Figura 3 – Modelo simplificado da rede regulatória dos genes *ERF* em resposta a patógenos necrotróficos. (1) A infecção por necrotróficos, como *Botrytis cinerea*, desencadeia sinalizações de defesa nas células vegetais, incluindo as vias hormonais de JA e ET e as cascatas de MAPK (MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES). Essas vias provocam eventos subsequentes (2–8) para reprogramar a célula visando a ativação da defesa. (2) O fator de transcrição *EIN3* (*ETHYLENE INSENSITIVE 3*) integra as vias de sinalização de JA e ET. (3) *EIN3* se liga aos promotores de *ERF1* e, potencialmente, *ORA59*, ativando subsequentemente a expressão de *ERF1* e *ORA59*. (4) O fator de transcrição *WRKY33*, que é fosforilado pela cascata de MAPK, ativa a expressão de *ERF1* e *ORA59* através da ligação direta aos seus promotores. (5) *ERF96* é induzido pelas vias de JA e ET. A indução de *ERF96* por ET depende de um *ORA59* funcional. (6) O promotor de *ORA59* é alvo de *ERF96* e, potencialmente, de *ERF1*, sugerindo um possível ciclo de *feedback* positivo para ativar a sinalização de defesa. (7) A expressão de *ERF6*, assim como a fosforilação e ativação da proteína *ERF6*, dependem das cascatas de MAPK. (8) *ERFs* induzidos pela infecção de *B. cinerea* ativam a transcrição de genes de *PR*, que possuem regiões GCC em seus promotores, incluindo *PDF1.2*, *PR3* e *PR4*. Setas vermelhas indicam a regulação positiva da via. Setas pretas referem-se aos efeitos positivos na transcrição. Setas azuis, amarelas e verdes indicam a ligação aos promotores por fatores de transcrição. Setas com linhas pontilhadas indicam uma ligação potencial de fatores de transcrição aos promotores.

Fonte: traduzido de Huang, Catinot e Zimmerli (2016).

3.6.4 Genes *PR*

Os genes *PR* são definidos por suas proteínas apresentarem níveis basais ou não detectáveis em tecidos saudáveis, porém aumentadas e acumuladas em duas situações: (1) em condições patológicas, isto é, sob ataques diretos de patógenos de diferentes origens, incluindo fungos, bactérias, vírus, insetos e herbívoros; (2) em situações relacionadas a pelo menos duas ou mais combinações planta-patógeno, incluindo a aplicação de produtos químicos que mimetizam o efeito do ataque de patógenos (por exemplo, os fitormônios ET, JA e AS), bem como em respostas a ferimentos que resultam em proteínas que também se acumulam durante infecções (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006; VAN LOON; VAN STRIEN, 1999). Assim, os genes *PR* desempenham um papel crucial na defesa natural de plantas e formam um ponto de interseção para várias redes de resposta ao reagirem com diferentes indutores, como os fitormônios AS, AJ e ET, além do peptídeo sinalizador *systemin* (HERNÁNDEZ *et al.*, 2005).

Os genes *PR* compreendem cerca de 19 famílias (*PR*-1 a *PR*-19) e codificam proteínas como β -1,3-glucanases, quitinases, peroxidases, proteínas inativadoras de ribossomos, defensinas e oxalato oxidase, entre outras (STINTZI *et al.*, 1993; ZRIBI; GHORBEL; BRINI, 2021). As proteínas *PR* podem exercer efeitos diretos ou indiretos na resistência da planta contra microrganismos, demonstrando capacidade de inibir o crescimento do patógeno e/ou a germinação de esporos, além de atuarem como agentes antimicrobianos, hidrolases, inibidores de proteinase e desempenharem outras atividades (JAIN; KHURANA, 2018; ZRIBI; GHORBEL; BRINI, 2021). Essas proteínas apresentam diferentes pesos moleculares, variando de 6 a 43 kDa, são termoestáveis, solúveis em pH < 3 e resistentes a proteases, contribuindo assim, para alterações quantitativas nos níveis de proteína durante as respostas de defesa (ALI *et al.*, 2018; ANISIMOVA *et al.*, 2021; KAUR *et al.*, 2022).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, S. *et al.* Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. **Microbiological Research**, v. 212–213, p. 29–37, 2018.

ALLEN, C. D. *et al.* A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. **Forest Ecology and Management**, v. 259, n. 4, p. 660–684, 2010.

ALLEN, M. D. *et al.* A novel mode of DNA recognition by a β -sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 18, p. 5484–5496, 1998.

ALMEIDA, T. S. *et al.* First record of the *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae) in Sergipe, Brazil. **Ciencia Florestal**, v. 33, n. 4, 2023.

AMOBONYE, A. *et al.* Biotechnological potential of *Beauveria bassiana* as a source of novel biocatalysts and metabolites. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 40, n. 7, p. 1019–1034, 2020.

ANISIMOVA, O. K. *et al.* Pathogenesis-related genes of *pr1*, *pr2*, *pr4* and *pr5* families are involved in the response to fusarium infection in garlic (*Allium sativum* L.). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, 2021.

ARYA, M. *et al.* Basic principles of real-time quantitative PCR. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 5, n. 2, p. 209–219, 2005.

BAILEY, B. A. *et al.* Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. **Biological Control**, v. 46, n. 1, p. 24–35, 2008.

BARBOSA, L. R. *et al.* *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) em mudas de eucalipto no estado de Santa Catarina, brasil. **Ciencia Florestal**, v. 28, n. 4, p. 1770–1775, 2018.

BARON, N. C. *et al.* Filamentous fungi in biological control: current status and future perspectives. **Chilean journal of agricultural research**, v. 79, n. 2, p. 307–315, 1 jun. 2019.

BARRETO, H. G. *et al.* Transcriptional profiling of the AFL subfamily of B3-type transcription factors during the in vitro induction of somatic embryogenesis in the model legume *Medicago truncatula*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 139, n. 2, p. 327–337, 2019.

BNB – Banco do Nordeste. **Silvicultura**. Disponível em: https://bnb.gov.br/s482-dspace/bitstream/123456789/677/1/2021_CDS_154.pdf. Acesso em: 21 maio. 2021.

BOAVA, L. P. *et al.* Selection of endogenous genes for gene expression studies in *Eucalyptus* under biotic (*Puccinia psidii*) and abiotic (acibenzolar-S-methyl) stresses using RT-qPCR. **BMC Research Notes**, v. 3, 2010.

BOOTH, T. H. Eucalypt plantations and climate change. **Forest ecology and management**, v. 301, p. 28–34, 2013.

BORTOLOTO, T. M. *et al.* Identification of a molecular marker associated with lignotuber in *Eucalyptus* ssp. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020.

BOUAZIZ, D. *et al.* Identification and functional characterization of ten *AP2/ERF* genes in potato. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 123, n. 1, p. 155–172, 2015.

BRAZMA, A.; VILO, J. Gene expression data analysis. **FEBS letters**, v. 480, n. 1, p. 17–24, 2000.

BROEKGAARDEN, C. *et al.* Ethylene: Traffic controller on hormonal crossroads to defense. **Plant Physiology**, v. 169, n. 4, p. 2371–2379, 2015.

BUSTIN, S. A. *et al.* Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 34, n. 3, p. 597–601, 2005.

BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CASSAN-WANG, H. *et al.* Reference genes for high-throughput quantitative reverse transcription-PCR analysis of gene expression in organs and tissues of eucalyptus grown in various environmental conditions. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, n. 12, p. 2101–2116, 2012.

CHEN, L. *et al.* Expansion and stress responses of *AP2/EREBP* superfamily in *Brachypodium Distachyon*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1–14, 2016.

CORREIA, B. *et al.* Gene expression analysis in *Eucalyptus globulus* exposed to drought stress in a controlled and a field environment indicates different strategies for short- and longer-term acclimation. **Tree physiology**, v. 38, n. 11, p. 1623–1639, 2018.

COSTA, V. A. *et al.* *Eucalyptus* gall wasp, *Leptocybe invasa* Fisher & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) in Brazil: new forest pest reaches the new world. **Brazilian Journal of Agriculture - Revista de Agricultura**, v. 83, n. 2, p. 136–139, 2008.

CUBBAGE, F. *et al.* Global timber investments, wood costs, regulation, and risk. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 12, p. 1667–1678, 2010.

DAUDE, M. M. *et al.* Molecular analysis of *ERF* subfamily genes during coffee somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 57, p. 128-142, 2021.

DAUDE, M. M. *et al.* Reference genes for *Eucalyptus* spp. under *Beauveria bassiana* inoculation and subsequently infestation by the galling wasp *Leptocybe invasa*. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, 2024.

DE ALMEIDA, M. R. *et al.* Reference gene selection for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction normalization during in vitro adventitious rooting in *Eucalyptus globulus* Labill. **BMC Molecular Biology**, v. 11, p. 1–12, 2010.

DE OLIVEIRA, L. A. *et al.* Reference genes for the normalization of gene expression in eucalyptus species. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, n. 2, p. 405–422, 2012.

DE OLIVEIRA, L. F. *et al.* Selection and validation of reference genes for measuring gene expression in Piper species at different life stages using RT-qPCR analysis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 171, p. 201–212, 2022.

DINESH, R. *et al.* Endophytic actinobacteria: Diversity, secondary metabolism and mechanisms to unsilence biosynthetic gene clusters. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 546–566, 3 set. 2017.

DITTRICH-SCHRÖDER, G. *et al.* Population genetic analyses of complex global insect invasions in managed landscapes: a *Leptocybe invasa* (Hymenoptera) case study. **Biological Invasions**, v. 20, n. 9, p. 2395–2420, 2018.

DONG, X. M.; ZHANG, W.; ZHANG, S. B. Selection and validation of reference genes for quantitative Real-Time PCR analysis of development and tissue-dependent flower color formation in *Cymbidium lowianum*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 2, p. 738, 2022.

ERLER, F.; ATES, A. O. Potential of two entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Coleoptera: Scarabaeidae), as biological control agents against the june beetle. **Journal of Insect Science**, v. 15, n. 1, 2015.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Global Forest Resources Assessment 2020: Main report**. Disponível em: <https://doi.org/10.4060/ca9825en>. Acesso em: 21 maio. 2020.

FARIA, M. R.; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v. 43, n. 3, p. 237–256, 2007.

FENG, C. Z. *et al.* Arabidopsis *RAV1* transcription factor, phosphorylated by SnRK2 kinases, regulates the expression of *ABI3*, *ABI4*, and *ABI5* during seed germination and early seedling development. **Plant Journal**, v. 80, n. 4, p. 654–668, 2014.

FENG, J. X. *et al.* An annotation update via cDNA sequence analysis and comprehensive profiling of developmental, hormonal or environmental responsiveness of the *Arabidopsis* *AP2/EREBP* transcription factor gene family. **Plant Molecular Biology**, v. 59, n. 6, p. 853–868, 2005.

FERNANDES, B. V. *et al.* *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae), an exotic pest of *Eucalyptus*, in Minas Gerais State, Brazil. **Florida Entomologist**, v. 97, n. 2, p. 824–826, 2014.

FERNANDES-BRUM, C. N. *et al.* A panel of the most suitable reference genes for RT-qPCR expression studies of coffee: screening their stability under different conditions. **Tree Genetics & Genomes**, v. 13, n. 6, p. 131, 2017.

FERNÁNDEZ, M. *et al.* Validation of reference genes for real-time qRT-PCR normalization during cold acclimation in *Eucalyptus globulus*. **Trees - Structure and Function**, v. 24, n. 6, p. 1109–1116, 2010.

FERREIRA, V. M. *et al.* Physiological plasticity in eucalyptus clones in the vegetative stage contributes to drought tolerance. **Journal of Forestry Research**, v. 34, n. 5, p. 1549–1561, 2023.

FLORÊNCIO, G. W. L.; MARTINS, F. B.; FAGUNDES, F. F. A. Climate change on Eucalyptus plantations and adaptive measures for sustainable forestry development across Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 188, 2022.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 402, p. 1445–1454, 2004.

GARLET, J. *et al.* *Leptocybe invasa* em *Eucalyptus* sp. no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciencia Rural**, v. 43, n. 12, p. 2175–2177, 2013.

GONÇALVES, J. L. DE M. *et al.* Integrating genetic and silvicultural strategies to minimize abiotic and biotic constraints in Brazilian eucalypt plantations. **Forest Ecology and Management**, v. 301, p. 6–27, 2013.

GUTTERSON, N.; REUBER, T. L. Regulation of disease resistance pathways by *AP2/ERF* transcription factors. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, n. 4, p. 465–471, 2004.

HERNÁNDEZ, I. *et al.* Proteins and peptides for the control of phytopathogenic fungi. **Biotecnología Aplicada**, v. 22, p. 256–260, 2005.

HODECKER, B. E. R. *et al.* Water availability preceding long-term drought defines the tolerance of Eucalyptus to water restriction. **New Forests**, v. 49, n. 2, p. 173–195, 2018.

HUANG, F. *et al.* Investigation of heat stress responses and adaptation mechanisms by integrative metabolome and transcriptome analysis in tea plants (*Camellia sinensis*). **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 10023, 2024.

HUANG, P. Y.; CATINOT, J.; ZIMMERLI, L. Ethylene response factors in *Arabidopsis* immunity. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 5, p. 1231–1241, 2016.

HURLEY, B. P. *et al.* Increasing numbers and intercontinental spread of invasive insects on eucalypts. **Biological Invasions**, v. 18, n. 4, p. 921–933, 2016.

IBÁ – Indústria Brasileira de Árvores. **Relatório Anual 2022**. Disponível em: < <https://www.iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-anual-iba2022-compactado.pdf> >. Acesso em: 21 maio. 2022.

IBÁ – Indústria Brasileira de Árvores. **Relatório Anual 2020**. Disponível em: < <https://iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-iba-2020.pdf> >. Acesso em: 21 maio. 2022.

IMAI, T. *et al.* Evaluation of reference genes for accurate normalization of gene expression for real time-quantitative PCR in *Pyrus pyrifolia* using different tissue samples and seasonal conditions. **PLoS One**, v. 9, n. 1, 2014.

JAIN, D.; KHURANA, J. P. Role of *pathogenesis-related (PR)* proteins in plant defense mechanism. **Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction**, p. 265–28, 2018.

JOSEPH, J. T.; POOLAKKALODY, N. J.; SHAH, J. M. Plant reference genes for development and stress response studies. **Journal of biosciences**, v. 43, n. 1, p. 173–187, 2018.

KALOSHIAN, I.; WALLING, L. L. Hemipterans as plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 491–521, 2005.

KAUR, A. *et al.* Pathogenesis-Related proteins and their transgenic expression for developing disease-resistant crops: strategies progress and challenges. **Plant Breeding-New Perspectives**, 2022.

KIRKLAND, B. H.; WESTWOOD, G. S.; KEYHANI, N. O. Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to ixodidae tick species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. **J. Med. Entomol**, v. 41, n. 4, p. 705–711, 2004.

KOZERA, B.; RAPACZ, M. Reference genes in real-time PCR. **Journal of Applied Genetics**, v. 54, n. 4, p. 391–406, 2013.

- KUMARI, N. K. *et al.* Biology of eucalyptus gall wasp, *Leptocybe invasa* Fisher and La Salle (Hymenoptera: Eulophidae). **Karnataka Journal of Agricultural Sciences**, v. 23, n. 1, p. 211–212, 2010.
- LACLAU, J. P.; GONÇALVES, J. L. DE M.; STAPE, J. L. Perspectives for the management of eucalypt plantations under biotic and abiotic stresses. **Forest Ecology and Management**, v. 301, p. 1–5, 2013.
- LI, G. *et al.* Identification of reference genes for reverse transcription-quantitative PCR analysis of ginger under abiotic stress and for postharvest biology studies. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 2022.
- LI, X. *et al.* Gene cloning and expression analysis of *BRI1* in *Eucalyptus grandis*. **Journal of Tropical and Subtropical Botany**, v. 27, n. 6, p. 684–692, 2019.
- LI, X. J. *et al.* Overexpression of cotton *RAV1* gene in *Arabidopsis* confers transgenic plants high salinity and drought sensitivity. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, 2015.
- LICAUSI, F.; OHME-TAKAGI, M.; PERATA, P. APETALA2/Ethylene Responsive Factor (*AP2/ERF*) transcription factors: mediators of stress responses and developmental programs. **The New phytologist**, v. 199, n. 3, p. 639–649, 2013.
- LIN, Y. *et al.* Identification and validation of reference genes for qRT-PCR analyses under different experimental conditions in *Allium wallichii*. **Journal of Plant Physiology**, v. 281, 2023.
- LIU, C.; ZHANG, T. Expansion and stress responses of the AP2/EREBP superfamily in cotton. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 1–16, 2017.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- LUCHO, S. R. *et al.* Validation of reference genes for RT-qPCR studies in *Stevia rebaudiana* in response to elicitor agents. **Physiology and molecular biology of plants**, v. 24, n. 5, p. 767–779, 2018.

LUNZ, A. M. *et al.* Registro da vespa-da-galha--do-eucalipto, *Leptocybe invasa* Fisher & La Salle (Hymenoptera: Eulophidae), no Pará: descrição e recomendações. **Comunicado Técnico**, 2014.

MARTINS, G. S. *et al.* Gene expression in two contrasting hybrid clones of *Eucalyptus camaldulensis* x *Eucalyptus urophylla* grown under water deficit conditions. **Journal of Plant Physiology**, v. 229, n. July, p. 122–131, 2018.

MENDEL, Z. *et al.* Taxonomy and biology of *Leptocybe invasa* gen. & sp. n. (Hymenoptera: Eulophidae), an invasive gall inducer on *Eucalyptus*. **Australian Journal of Entomology**, v. 43, n. 2, p. 101–113, 2004.

MITCHELL, C. *et al.* Plant defense against herbivorous pests: Exploiting resistance and tolerance traits for sustainable crop protection. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016.

MOURA, J. C. M. S. *et al.* Validation of reference genes from *Eucalyptus* spp. under different stress conditions. **BMC Research Notes**, v. 5, 2012.

MOTA, J. S.; BARBOSA, L. R.; MARCHIORO, C. A. Suitable areas for invasive insect pests in Brazil and the potential impacts for eucalyptus forestry. **Pest Management Science**, v. 78, n. 6, p. 2596-2606, 2022.

MUGHAL, B. B. *et al.* Reference gene identification and validation for quantitative real-time PCR studies in developing *Xenopus laevis*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018.

MULLIS, K. *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**, p. 263–273, 1986.

MYBURG, A. A. *et al.* The genome of *Eucalyptus grandis*. **Nature**, v. 510, n. 7505, p. 356–362, 2014.

NAKANO, T. *et al.* Genome-wide analysis of the *ERF* gene family in *Arabidopsis* and rice. **Plant Physiology**, v. 140, n. 2, p. 411–432, 2006.

NAVARRO, M. *et al.* Two *EguCBF1* genes overexpressed in *Eucalyptus* display a different impact on stress tolerance and plant development. **Plant Biotechnology Journal**, v. 9, n. 1, p. 50–63, 2011.

- NGUYEN, D. Q.; EAMENS, A. L.; GROF, C. P. L. Reference gene identification for reliable normalisation of quantitative RT-PCR data in *Setaria viridis*. **Plant Methods**, v. 14, n. 1, 2018.
- NOLAN, T.; HANDS, R. E.; BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1559–1582, 2006.
- NUGNES, F. *et al.* Genetic diversity of the invasive gall wasp *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) and of its Rickettsia endosymbiont, and associated sex-ratio differences. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, 2015.
- NUNES, T. V. *et al.* Endophytic development of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* reduced the development of galls and adult emergence of *Leptocybe invasa* in susceptible *Eucalyptus*. **Sustainability**, v. 15, n. 23, p. 16411, 2023.
- OATES, C. N. *et al.* Insect galls and their plant hosts: From omics data to systems biology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 11, 2016.
- ORTIZ, A. G. *et al.* Registro de *Leptocybe invasa* fisher & la salle (Hymenoptera: Eulophidae) em eucalipto no estado de Mato Grosso, Brasil. **Revista Espacios**, v. 38, 2017.
- OWNLEY, B. H. *et al.* *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, n. 3, p. 267–270, 2008.
- PAINE, T. D.; STEINBAUER, M. J.; LAWSON, S. A. Native and exotic pests of eucalyptus: A worldwide perspective. **Annual Review of Entomology**, v. 56, p. 181–201, 2011.
- PEREIRA, J. M. *et al.* Registro de *Leptocybe invasa* no estado de Goiás. **Ciencia Rural**, v. 44, n. 10, p. 1721–1724, 2014.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. e45–e45, 2001.
- PFAFFL, M. W. Quantification strategies in real-time PCR. **AZ of quantitative PCR**, v. 1, p. 89–113, 2004.
- PIETERSE, C. M. J. *et al.* Networking by small-molecule hormones in plant immunity. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 5, p. 308–316, 2009.

- PIETERSE, C. M. J. *et al.* Hormonal modulation of plant immunity. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 28, p. 489–521, 2012.
- PINSUPA, S. *et al.* Transcriptome analysis reveals genes involved in responses of *Eucalyptus* to gall wasp infestation. **Horticulturae**, v. 9, n. 2, 2023.
- POTTS, B. M. *et al.* **Exploration of the Eucalyptus globulus gene pool**. University of Canterbury. School of Forestry., 2004.
- PRADA-ARISMENDY, J.; CASTELLANOS, J. E. Real time PCR. Application in dengue studies. **Colomb Med**, v. 42, p. 243–58, 2011.
- PROBER, S. M. *et al.* Climate adaptation and ecological restoration in eucalypts. **Proceedings of the Royal Society of Victoria**, v. 128, n. 1, p. 40–53, 2016.
- PURETZ, B. O. *et al.* Distribuição da vespa da galha do eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 35, n. 83, p. 329, 2015.
- QAYYUM, M. A. *et al.* Diversity and correlation of entomopathogenic and associated fungi with soil factors. **Journal of King Saud University - Science**, v. 33, n. 6, 2021.
- QUANG THU, P.; DELL, B.; BURGESS, T. I. Susceptibility of 18 eucalypt species to the gall wasp *Leptocybe invasa* in the nursery and young plantations in Vietnam. **ScienceAsia**, v. 35, n. 2, p. 113–117, 2009.
- RAMAN, A.; SURYANARAYANAN, T. S. Fungus–plant interaction influences plant-feeding insects. **Fungal Ecology**, v. 29, p. 123–132, 2017.
- REDDY, D. S. *et al.* Identification and validation of reference genes and their impact on normalized gene expression studies across cultivated and wild Cicer species. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, 2016.
- REZENDE, G. D. S. P.; DE RESENDE, M. D. V; DE ASSIS, T. F. Eucalyptus breeding for clonal forestry. In: **Challenges and Opportunities for the World's Forests in the 21st Century**. Springer, p. 393–424, 2014.

RINALDI, D. A. M. DA F. *et al.* Ocorrência de *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) em mudas de eucalipto no estado do Paraná. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 75, p. 327–330, 2013.

RITTER, M. Field guide to the cultivated eucalypts (Myrtaceae) and how to identify Them. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 99, n. 4, p. 642–687, 2014.

ROCHA, J. P. L. *et al.* Morphophysiological responses in *Eucalyptus* demonstrate the potential of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to promote resistance against the galling wasp *Leptocybe invasa*. **Forests**, v. 14, n. 7, p. 1349, 2023.

ROCHA, S. M. G. *et al.* Influence of climatic variations on production, biomass and density of wood in eucalyptus clones of different species. **Forest Ecology and Management**, v. 473, p. 118290, 2020.

RYAN, R. P. *et al.* Bacterial endophytes: Recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, n. 1, p. 1–9, 2008.

SAKUMA, Y. *et al.* DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis *DREBs*, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 290, n. 3, p. 998–1009, 2002.

SANTOS, E. F. *et al.* Enhancing potassium content in leaves and stems improves drought tolerance of eucalyptus clones. **Physiologia Plantarum**, v. 172, n. 2, p. 552–563, 2021.

SARMENTO, M. I. **Respostas fisiológicas e metabolômicas para a seleção precoce de *Eucalyptus* spp. tolerantes à seca e pragas.** 2019. 118 f. Tese (Doutorado em Biologia e Ecologia das Alterações Globais) - Universidade de Aveiro, Aveiro, 2019.

SARMENTO, M. I. *et al.* Differential development times of galls induced by *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) reveal differences in susceptibility between two *Eucalyptus* clones. **Pest Management Science**, v. 77, n. 2, p. 1042–1051, 2021.

SARMENTO, R. A. *et al.* First report of *Leptocybe invasa* Fischer & Lasalle (Hymenoptera: Eulophidae) in the southern Tocantins, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, 2022.

SASAKI, K. *et al.* Overexpressing the HD-Zip class II transcription factor *EcHBI1* from *Eucalyptus camaldulensis* increased the leaf photosynthesis and drought tolerance of *Eucalyptus*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 5–9, 2019.

SHAKEEL, M. *et al.* Gene expression studies of reference genes for quantitative real-time PCR: an overview in insects. **Biotechnology Letters**, v. 40, n. 2, p. 227–236, 2018.

SHIGYO, M.; ITO, M. Analysis of gymnosperm two-AP2-domain-containing genes. **Development Genes and Evolution**, v. 214, n. 3, p. 105–114, 2004.

SILVA, P. H. M. *et al.* Susceptibility of eucalypt taxa to a natural infestation by *Leptocybe invasa*. **New Forests**, v. 51, p. 753–763, 2020.

SNIF: SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES FLORESTAIS. Cadeia Produtiva. Disponível em: <http://snif.florestal.gov.br/pt-br/cadeia-produtiva>. Acesso em: 21 maio. 2020.

SONG, J. *et al.* Identification and validation of stable reference genes for quantitative real time PCR in different minipig tissues at developmental stages. **BMC Genomics**, v. 23, n. 1, 2022.

STANTURF, J. A. *et al.* Eucalyptus beyond its native range: Environmental issues in exotic bioenergy plantations. **International Journal of Forestry Research**, v. 2013, p. 1–5, 2013.

STINTZI, A. *et al.* Plant “pathogenesis-related” proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, p. 687–706, 1993.

STONE, G. N.; SCHÖNROGGE, K. The adaptive significance of insect gall morphology. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 18, n. 10, p. 512–522, 2003.

SUNDARI, B. K. R.; DASGUPTA, M. G. Selection and validation of reference genes for real-time qRT-PCR normalization in different tissues of *Eucalyptus tereticornis*. **Silvae Genetica**, v. 61, n. 1–6, p. 280–286, 2012.

TAMAYO-PENÑA, J. A. *et al.* *Eucalyptus grandis* Forestry Residue Valorization: Distinct and Integrated Pretreatment Methods for Enhanced Xylooligosaccharide Production. **BioEnergy Research**, p. 1–19, 2024.

TESHOME, D. T.; ZHARARE, G. E.; NAIDOO, S. The threat of the combined effect of biotic and abiotic stress factors in forestry under a changing climate. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 2020.

TEULIÈRES, C. *et al.* Stress Studies in *Eucalyptus*. **Plant Stress**, 2007.

TOOKER, J. F.; GIRON, D. The evolution of endophagy in herbivorous insects. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 2020.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 135–162, 2006.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of *PR-1* type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 85–97, 1999.

VIDAL, S.; JABER, L. R. Entomopathogenic fungi as endophytes: plant–endophyte–herbivore interactions and prospects for use in biological control. **Current science**, p. 46–54, 2015.

WITTEWER, C. T. *et al.* Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. **BioTechniques**, v. 22, n. 1, p. 130–138, 1997.

XIAO, Z. *et al.* Selection of reliable reference genes for gene expression studies on *Rhododendron molle* G. Don. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 1547, 2016.

YANG, Q. *et al.* Reference gene selection for qRT-PCR in *Caragana korshinskii* Kom. under different stress conditions. **Molecular biology reports**, v. 41, n. 4, p. 2325–2334, 2014.

YANG, Z.; ZHANG, R.; ZHOU, Z. Identification and validation of reference genes for gene expression analysis in *Schima superba*. **Genes**, v. 12, n. 5, p. 732, 2021.

YU, Y. *et al.* Selection of reference genes for qPCR analyses of gene expression in ramie leaves and roots across eleven abiotic/biotic treatments. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, v. 23, n. 5, p. 753–771, 2006.

ZHENG, X. L. *et al.* A review of invasive biology, prevalence and management of *Leptocybe invasa* fisher & la salle (Hymenoptera: Eulophidae: Tetrastichinae). **African Entomology**, v. 22, n. 1, p. 68–79, 2014.

ZHONG, Y. *et al.* Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR normalization in *Psoralea corylifolia* (Babchi) under various abiotic stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 274, p. 153722, 2022.

ZHU, F. *et al.* Effect of temperature on life table parameters of *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae). **Austral Entomology**, v. 54, n. 1, p. 71–78, 2015.

ZHU, J. *et al.* Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in *Caragana intermedia* under different abiotic stress conditions. **PloS one**, v. 8, n. 1, 2013.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 6, p. 553–596, 2007.

ZRIBI, I.; GHORBEL, M.; BRINI, F. Pathogenesis related proteins (PRs): From cellular mechanisms to plant defense. **Current Protein and Peptide Science**, v. 22, n. 5, p. 396–412, 2021.

CAPÍTULO I

GENES DE REFERÊNCIA PARA *EUCALYPTUS* SPP. SOB INOCULAÇÃO DE *BEAUVERIA BASSIANA* E SUBSEQUENTEMENTE INFESTAÇÃO PELA VESPA GALHADORA *LEPTOCYBE INVASA*

Artigo publicado em *Scientific Reports* 2024, 24, 2556. DOI (<https://doi.org/10.1038/s41598-024-52948-x>)

Reference genes for *Eucalyptus* under *Beauveria bassiana* inoculation and subsequently infestation by the galling wasp *Leptocybe invasa*

Matheus Martins Daude^{1,2}; Solange Aparecida Ságio^{1,3}; Jovielly Neves Rodrigues⁴, Nívea Maria Pereira Lima⁵, André Almeida Lima¹; Maíra Ignacio Sarmento⁴; Renato Almeida Sarmento^{2,4}; Horllys Gomes Barreto^{*1,2,3}.

¹Laboratory of Molecular Analysis (LAM), Life Sciences Department, Medical School, Federal University of Tocantins, Palmas, TO, Brazil.

² Graduate Program in Biotechnology and Biodiversity, Rede Bionorte, Federal University of Tocantins, Palmas, TO, Brazil.

³ Graduate Program in Digital Agroenergy, Federal University of Tocantins, Palmas, TO, Brazil.

⁴Graduate Program in Forest and Environmental Sciences, Federal University of Tocantins, Palmas, TO, Brazil.

⁵Agronomy Undergraduate course, Federal University of Tocantins, Palmas, TO, Brazil

*Correspondence:

E-mail: horllys@uft.edu.br

ABSTRACT

Relative gene expression analysis through RT-qPCR is an important molecular technique that helps understanding different molecular mechanisms, such as the plant defense response to insect pests. However, the use of RT-qPCR for gene expression analysis can be affected by factors that directly affect the reliability of the results. Among these factors, the appropriate choice of reference genes is crucial and can strongly impact RT-qPCR relative gene expression analyzes, highlighting the importance in correctly choosing the most suitable genes for the success of the analyses. Thus, this study aimed to select and validate reference genes for relative gene expression studies through RT-qPCR in hybrids of *Eucalyptus tereticornis* x *Eucalyptus camaldulensis* (drought tolerant and susceptible to *Leptocybe invasa*) under conditions of inoculation by the *Beauveria bassiana* fungus and subsequently infestation by *L. invasa*. The expression level and stability of eleven candidate genes were evaluated. Stability was analyzed using the RefFinder tool, which integrates the geNorm, NormFinder, BestKeeper and Delta-Ct algorithms. The selected reference genes were validated through the expression analysis of the transcriptional factor *EcDREB2* (dehydration-responsive element-binding protein 2). For all

treatments evaluated, the *EcPTB*, *EcPP2A-1* and *EcEUC12* genes were the best reference genes. The triplets *EcPTB/EcEUC12/EcUBP6*, *EcPP2A-1/EcEUC12/EcPTB*, *EcIDH/EcSAND/Ecα-TUB*, *EcPP2A-1/Ecα-TUB/EcPTB* and *EcPP2A-1/EcUPL7/EcSAND* were the best reference genes for the control plants, mother plants, plants inoculated with *B. bassiana*, plants infested with *L. invasa*, and plants inoculated with *B. bassiana* and subsequently infested with *L. invasa*, respectively. In this study, for the first time, the determined best reference genes were to normalize relative RT-qPCR gene expression data for each experimental condition evaluated. The results emphasize the importance of this type of study to ensure the reliability of relative gene expression analyses. Furthermore, the findings of this study can be used as a basis for future research comprising gene expression analysis of different eucalyptus's metabolic pathways.

INTRODUCTION

The Eucalyptus genus belongs to the *Myrtaceae* family and is composed by approximately 600 species and subspecies, being one of the main global sources of wood and widely cultivated for industrial use^{1,2}. Worldwide, raw materials derived from the forestry sector are used in the production of various products, such as civil construction structures, furniture, paper, pharmaceutical and cosmetic products, being also used for energy generation³. Globally, *Eucalyptus* sp. is the most extensively cultivated forest genus, with a planted area of around 25 million hectares⁴. Brazil stands out as the world's largest Eucalyptus producer, with a cultivation area of more than 7 million hectares, which corresponds to 75.8% of the total area planted with trees, playing an important role in its economy and generating a total revenue of more than 47 billion of dollars and 2 million jobs⁵. Thus, the economic and socioeconomic importance of forest resources has driven the growth of the sector, although the incidence of biotic factors, such as pests, still represents a challenge to be overcome^{6,7}.

The eucalyptus gall wasp (*Leptocybe invasa*) is a biotic factor that affects the sustainability of eucalyptus plantations, as it causes serious damage through the induction of galls along the entire length of veins and on petioles of young leaves, and also in internodes of branch apices. Infestation by this pest can lead to devastating outcomes, such as rough appearance of plants, stunted growth and, in extreme cases, plant death⁸⁻¹⁰. To meet this challenge, it is essential to implement the best combination of integrated tools and techniques. Thus, studies related to plant-microorganism association, especially with endophytic organisms, are essential considering the great damage caused by the attack of insect pests, such as the eucalyptus gall wasp^{11,12}. Endophytic fungi act symbiotically, triggering, for instance,

local and/or systemic defenses¹³. The species *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill is an entomopathogenic fungus often used as a biopesticide in agricultural crops due to its environmental safety, not causing any risk to human health and displaying only minimal adverse effects on non-target organisms^{12,14}. In eucalyptus, the use of *B. bassiana* as an alternative biological agent to control the galling insect *L. invasa* has shown great potential for plant resistance to attack by this pest¹².

The use of molecular techniques to study the eucalyptus species, as well as studies aimed at biological control, has gained progressive attention due to the diverse possibilities they offer for a better comprehension of plant metabolism. The sequencing of the *Eucalyptus grandis* genome have enabled significant advances in molecular studies by providing information on genes related to metabolic pathways of great economic interest¹⁵. In this context, gene expression analysis is an important tool to better understand the molecular mechanisms behind different biological processes¹⁶ such as the defense response to *L. invasa* infestation under the presence of *B. bassiana*. Currently, several methods of gene expression analysis in plants are used¹⁷, with the quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction with reverse transcription (RT-qPCR) being one of the most common and widely used method due to its speed, high sensitivity, reproducibility and precision in determining gene expression levels^{18–20}. However, it is important to consider that the use of RT-qPCR for RNA quantification is prone to several factors that can directly affect the reliability of the results obtained²¹.

RNA (ribonucleic acid) integrity and quality, cDNA (complementary DNA) synthesis and amplification efficiencies, and the choice of reference genes are crucial factors that can strongly impact the results of RT-qPCR studies^{20,22}. Therefore, to ensure reproducibility and minimize the variability of RT-qPCR assays, it is crucial to evaluate these parameters²¹. In particular, among the factors previously mentioned, the determination of reference genes is one of the most important aspects when using gene expression analysis by RT-qPCR¹, since the efficiency of the technique depends on the validation of appropriate reference genes for accurate assay normalization and correction of nonspecific variations^{23–25}. For this reason, the use of validated reference genes, based on their expression stability in different tissues and experimental conditions, is essential to guarantee the quality and reliability of the results²⁶.

The use of reference genes for the normalization of RT-qPCR gene expression data is based on the fact that, in theory, their expression levels are constant, regardless of the tissues, developmental stages or physiological conditions of the evaluated species^{17,27}. Thus, different genes involved in the maintenance of basic cellular functions such as cell division, growth and development, apoptosis and other physiological processes are often used as reference genes due to their ability to be expressed in basically every cell of the organism²⁶. Plants genes such as

ACT, *TUB*, ribosomal RNA genes (*18S*, *rRNA*, *26S rRNA*), *GAPDH*, *UBQ*, *EF-1 α* , *UBC* and *PP2A* are commonly employed as reference genes^{17,25} However, different studies have shown that the expression of these genes may vary, leading to incorrect normalization of target genes^{28,29} and confirming that there are no universal reference gene^{30–33}.

Different studies aiming to determine the best *Eucalyptus* reference genes have been performed^{1,2,34–39}. However, such studies are still necessary when specific genotypes, tissues or stress conditions are under study^{40,41}. In this context, studies aimed to determine the best reference genes in *Eucalyptus* under *L. invasa* infestation and inoculation of the *B. bassiana* fungus have not been carried out yet. Therefore, considering the importance of the RT-qPCR technique for gene expression studies and the need to validate suitable reference genes for specific conditions, the objective of this study was to select and validate reference genes for RT-qPCR studies in the *Eucalyptus tereticornis* x *Eucalyptus camaldulensis* hybrid (drought tolerant and susceptible to *L. invasa*) under the inoculation of *B. bassiana* and subsequently infestation by *L. invasa*.

RESULTS

4.1 EXPRESSION LEVELS OF THE CANDIDATE REFERENCE GENES

The expression analyzes of the candidate reference genes in all treatments (Figure 1A) indicated a wide variation in the Cqs average values, with the minimum and maximum values of 19.33 and 25.87, respectively. When each treatment is separately analyzed, it is possible to observe a similar expression pattern to the one observed when all treatments are analyzed together (Figure 1A). The Cq average values in the control treatment (Figure 1B), in mother plants (Figure 1C), in plants inoculated with *B. bassiana* (Figure 1D), in plants infested with *L. invasa* (Figure 1E), and in plants inoculated with *B. bassiana* and infested with *L. invasa* (Figure 1F) ranged from 18.77, 18.79, 18.64, 20.10 and 20.55 (lowest value) to 25.58, 25.88, 24.99, 26.06 and 26.94 (highest value), respectively.

The Cq average values for all genes revealed that, regardless of the evaluated condition, the three genes with the highest and lowest expression levels were the same. When comparing the average Cq values of each treatment (Figure 1), *EcACT*, *EcH2B* and *EcIDH* showed the highest expression levels, with values varying from 18.64 to 21.27. In contrast, *EcUPL7*, *EcEF1- α* and *EcPTB* displayed the lowest expression levels, with Cq average values ranking from 23.91 to 26.94.

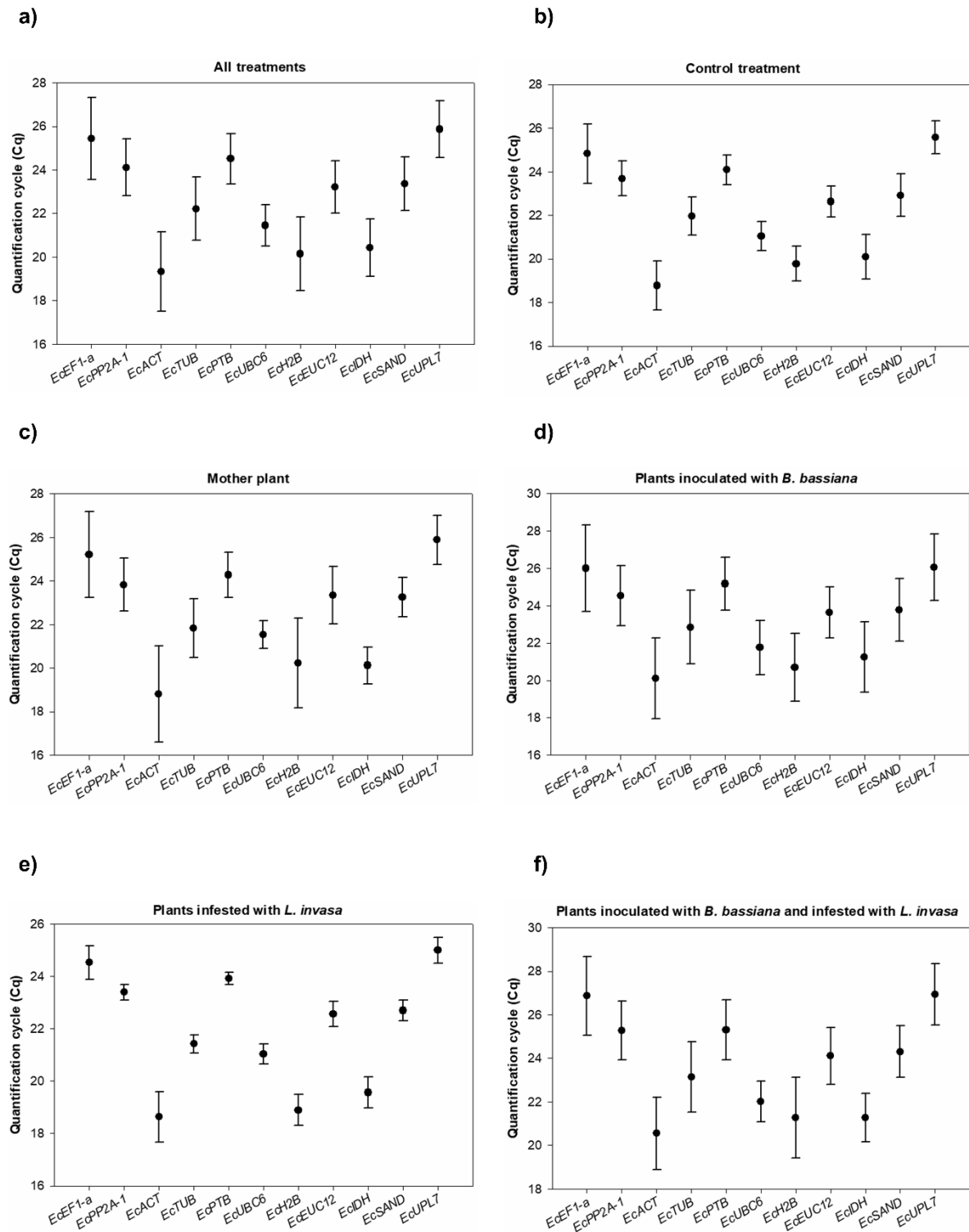


Figure 1. Candidate reference gene expression levels based on the Cq (Cycle of Quantification) data obtained from stem, leaves and leaf apex of Eucalyptus plants under different treatments conditions (A), Eucalyptus control plants (B), Eucalyptus mother plants, Eucalyptus plants inoculated with *B. bassiana* (D), Eucalyptus plants infested with *L. invasa* (E), and Eucalyptus plants inoculated with *B. bassiana* and infested with *L. invasa* (F). Vertical bars represent the standard deviation, and the black dots represent the mean Cq values.

4.2 EXPRESSION STABILITY OF THE CANDIDATE REFERENCE GENES

Tables 1, 2, 3, 4 and 5, along with Figure 2 describe the expression stability analysis of the candidate reference genes using the geNorm, NormFinder, BestKeeper, Delta-Ct and RefFinder algorithms. The data presented in the tables comprise the analysis of gene stability in 5 sample sets, and the Cqs of all genes and conditions evaluated can be found in Tables (Supplementary S1), making it possible to combine several other sample sets.

Control plants

In control plants (Table 1), the geNorm, NormFinder and Delta-Ct algorithms indicated that *EcPTB*, *EcEUC12* and *EcPP2A-1* were the most stable genes. The BestKeeper algorithm, on the other hand, found that *EcUBP6*, *EcPTB* and *EcEUC12* were most stable in this treatment. In terms of the general classification provided by the RefFinder algorithm, *EcPTB*, *EcEUC12* and *EcUBP6* were the best reference genes. In relation to the least stable genes, *EcH2B*, *EcEF1- α* and *EcIDH* were identified by the geNorm, NormFinder and Delta-Ct algorithms as the least stable genes. BestKeeper classified *EcEF1- α* , *EcACT* and *EcIDH* as the most variable genes and RefFinder considered *EcEF1- α* , *EcH2B* and *EcIDH* as the genes with the lower stability values.

Gene	geNorm		NormFinder		BestKeeper		Delta-Ct		RefFinder	
	M Stability Value	Ranking	SV Stability Value	Ranking	SD Stability Value	Ranking	Δ Ct Stability Value	Ranking	Overall Stability Value	Overall Ranking
<i>EcPTB</i>	0.172	1	0.057	1	0.549	2	0.490	1	1.189	1
<i>EcEUC12</i>	0.172	1	0.113	2	0.566	3	0.496	2	1.861	2
<i>EcUBP6</i>	0.331	4	0.466	5	0.535	1	0.627	5	3.344	3
<i>EcPP2A-1</i>	0.233	2	0.149	3	0.617	5	0.504	3	3.409	4
<i>Eca-TUB</i>	0.265	3	0.237	4	0.656	6	0.537	4	4.427	5
<i>EcUPL7</i>	0.349	5	0.467	6	0.58	4	0.628	6	5.422	6
<i>EcSAND</i>	0.41	6	0.475	7	0.85	8	0.669	7	7.238	7
<i>EcACT</i>	0.493	7	0.593	8	0.937	10	0.75	8	8.459	8
<i>EcIDH</i>	0.554	8	0.658	9	0.913	9	0.803	9	9.000	9
<i>EcH2B</i>	0.661	10	0.827	11	0.672	7	0.926	11	9.825	10

<i>EcEF1-α</i>	0.602	9	0.722	10	1.239	11	0.844	10	10.241	11
----------------	-------	---	-------	----	-------	----	-------	----	--------	----

Table 1. Ranking of the reference gene candidates generated according to their stability values calculated by the geNorm, NormFinder, BestKeeper, Delta-Ct and Refiner algorithms using the Cq (Cycle of Quantification) data obtained from stem, leaves and leaf apex of Eucalyptus control plants.

Mother plants

The stability values of the candidate reference genes for the matrix plants (Table 2) presented different results among the algorithms analyzed. *EcPP2-A*, *EcEUC12*, and *EcPTB* were indicated as the most stable genes by geNorm and Delta-Ct algorithms, while the *EcEUC12*, *EcPP2-A* and *Eca-TUB* were classified as the most stable by NormFinder. On the other hand, according to BestKeeper, *EcUBP6*, *EcIDH* and *EcSAND* are most stable genes for mother plants and for RefFinder *EcPP2-A*, *EcEUC12* and *EcPTB* display the higher expression stability. About the least stable genes, all algorithms identified *EcH2B*, *EcACT*, and *EcEF1-α* as the worst (least stable) genes, except for NormFinder that, instead of *EcEF1-α*, classified *EcUBP6* among the three most stable genes.

Gene	geNorm		NormFinder		BestKeeper		Delta-Ct		RefFinder	
	M Stability Value	Ranking	SV Stability Value	Ranking	SD Stability Value	Ranking	M Stability Value	Ranking	SV Stability Value	Ranking
<i>EcPP2A-1</i>	0.292	1	0.146	2	1.011	6	0.626	1	1.861	1
<i>EcEUC12</i>	0.292	1	0.12	1	1.089	7	0.639	3	2.141	2
<i>EcPTB</i>	0.31	2	0.225	4	0.888	4	0.628	2	3.130	3
<i>Eca-TUB</i>	0.345	3	0.175	3	1.198	8	0.68	4	4.427	4
<i>EcUBP6</i>	0.5	7	0.826	9	0.458	1	0.932	8	4.899	5
<i>EcUPL7</i>	0.383	4	0.428	5	0.936	5	0.71	5	5.000	6
<i>EcSAND</i>	0.426	5	0.493	6	0.754	3	0.751	6	5.045	7
<i>EcIDH</i>	0.457	6	0.649	7	0.682	2	0.805	7	5.118	8
<i>EcEF1-α</i>	0.616	8	0.758	8	1.735	9	0.97	9	8.739	9
<i>EcACT</i>	0.73	9	1.071	10	1.839	11	1.202	10	10.241	10

<i>EcH2B</i>	0.847	10	1.269	11	1.764	10	1.372	11	10.741	11
--------------	-------	----	-------	----	-------	----	-------	----	--------	----

Table 2. Ranking of the reference gene candidates generated according to their stability values calculated by the geNorm, NormFinder, BestKeeper, Delta-Ct and RefFinder algorithms using the Cq (Cycle of Quantification) data obtained from stem, leaves and leaf apex of Eucalyptus mother plants.

Plants inoculated with *B. bassiana*

For the plants inoculated with the *B. bassiana* fungus, the expression stability analysis revealed significant differences among the five algorithms used (Table 3). The geNorm listed *EcIDH*, *Eca-TUB* and *EcUPL7* as the most stable genes, while NormFinder considered *EcIDH*, *EcSAND* and *EcUPL7*. BestKeeper classified *EcEUC12*, *EcPTB* and *EcUBP6* as the most stable genes and for Delta-Ct, on the other hand, *EcSAND*, *EcIDH* and *EcUPL7* showed the best stability levels. Finally, RefFinder, which takes into account the results of all algorithms, classified *EcIDH*, *EcSAND* and *Eca-TUB* as the most stable genes. In relation to the genes with relatively lower stability, geNorm, NormFinder, and Delta-Ct classified *EcEF1- α* , *EcACT* and *EcEUC12* as the least stable genes. Similarly, the BestKeeper algorithm also identified the *EcEF1- α* and *EcACT* as genes with low stability levels and differed only in the inclusion of the *Eca-TUB*, instead of the *EcEUC12*, when compared to the previously mentioned algorithms. For the overall ranking defined by RefFinder, in the *EcEF1- α* , *EcACT* and *EcUBP6* were found to be the least stable genes.

Gene	geNorm		NormFinder		BestKeeper		Delta-Ct		RefFinder	
	M Stability Value	Ranking	SV Stability Value	Ranking	SD Stability Value	M Stability Value	Ranking	SV Stability Value	Ranking	SD Stability Value
<i>EcIDH</i>	0.197	1	0.152	1	1.634	8	0.417	2	2.000	1
<i>EcSAND</i>	0.276	3	0.161	2	1.42	5	0.405	1	2.515	2
<i>Eca-TUB</i>	0.197	1	0.229	4	1.659	9	0.441	4	3.464	3
<i>EcUPL7</i>	0.258	2	0.185	3	1.533	7	0.423	3	3.708	4
<i>EcPTB</i>	0.366	6	0.405	7	1.219	2	0.505	7	5.118	5
<i>EcPP2A-1</i>	0.33	5	0.261	6	1.393	4	0.457	5	5.18	6

<i>EcEUC12</i>	0.403	8	0.499	9	1.114	1	0.574	9	5.196	7
<i>EcH2B</i>	0.305	4	0.244	5	1.529	6	0.46	6	5.477	8
<i>EcUBP6</i>	0.385	7	0.454	8	1.264	3	0.537	8	6.26	9
<i>EcACT</i>	0.466	9	0.619	10	1.806	10	0.689	10	10	10
<i>EcEF1-α</i>	0.511	10	0.658	11	1.97	11	0.716	11	11	11

Table 3. Ranking of the reference gene candidates generated according to their stability values calculated by the geNorm, NormFinder, BestKeeper, Delta-Ct and RefFinder algorithms using the Cq (Cycle of Quantification) data obtained from stem, leaves and leaf apex of eucalyptus plants inoculated with *B. bassiana*.

Plants infested with *L. invasa*

When Eucalyptus plants were under *L. Invasa* infestation, the four algorithms used consistently indicated the same set of genes as the most stable ones: *EcPP2A-1*, *Ec α -TUB* and *EcPTB* (Table 4). Similarly, these algorithms also identified the same genes as the least stable ones: *EcACT*, *EcH2B* and *EcIDH*, except for BestKeeper, which indicated the *EcEF1- α* instead of *EcIDH*. The only difference, in both cases, was the position in which the genes were classified (Table 4).

Gene	geNorm		NormFinder		BestKeeper		Delta-Ct		RefFinder	
	M Stability Value	Ranking	SV Stability Value	Ranking	SD Stability Value	Ranking	M Stability Value	Ranking	SV Stability Value	Ranking
<i>EcPP2A-1</i>	0.189	1	0.072	1	0.224	2	0.431	2	1.414	1
<i>Ecα-TUB</i>	0.189	1	0.094	2	0.276	3	0.415	1	1.565	2
<i>EcPTB</i>	0.221	2	0.179	3	0.182	1	0.455	3	2.28	3
<i>EcEUC12</i>	0.272	3	0.246	4	0.375	6	0.493	4	4.427	4
<i>EcSAND</i>	0.317	4	0.326	5	0.288	4	0.516	5	4.729	5
<i>EcUPL7</i>	0.345	5	0.359	6	0.414	8	0.545	6	6.447	6
<i>EcUBP6</i>	0.421	7	0.493	8	0.328	5	0.618	8	7.113	7
<i>EcEF1-α</i>	0.382	6	0.374	7	0.523	10	0.553	7	7.653	8
<i>EcIDH</i>	0.472	8	0.675	10	0.399	7	0.752	10	8.909	9

<i>EcH2B</i>	0.521	9	0.618	9	0.503	9	0.724	9	9.24	10
<i>EcACT</i>	0.575	10	0.749	11	0.767	11	0.817	11	11	11

Table 4. Ranking of the reference gene candidates generated according to their stability values calculated by the geNorm, NormFinder, BestKeeper, Delta-Ct and RefFinder algorithms using the Cq (Cycle of Quantification) data obtained from stem, leaves and leaf apex of Eucalyptus plants infested with *L. invasa*.

Plants inoculated with *B. bassiana* and infested with *L. invasa*

Similarities and divergences could be found for eucalyptus plants under *B. bassiana* inoculation and *L. invasa* infestation (Table 5). For the most stable genes, geNorm pointed out the genes *EcPP2A-1*, *EcSAND* and *EcEUC12* as the best ones. NormFinder identified *EcUPL7*, *EcPP2A-1* and *EcEUC12* as the most stable genes, while BestKeeper presented a slightly different classification, classifying *EcUBP6*, *EcIDH* and *EcSAND* as the genes with higher expression stability. The Delta-Ct and the RefFinder considered the same set of genes, *EcPP2A-1*, *EcUPL7* and *EcSAND*, as the most stable in terms of expression, although in different positions (Table 5). For the least stable genes, the geNorm, NormFinder and DeltaCT algorithms indicated *EcUBP6*, *EcH2B* and *ECEF1- α* as the genes displaying higher expression variability. On the other hand, BestKeeper ranked *EcH2B*, *ECEF1- α* , and *EcACT* as the least stable genes, just like RefFinder (Table 5).

Gene	geNorm		NormFinder		BestKeeper		Delta-Ct		RefFinder	
	M Stability Value	Ranking	SV Stability Value	Ranking	SD Stability Value	M Stability Value	Ranking	SV Stability Value	Ranking	SD Stability Value
<i>EcPP2A-1</i>	0.264	1	0.151	2	1.245	5	0.477	2	2.115	1
<i>EcUPL7</i>	0.291	3	0.124	1	1.262	6	0.476	1	2.213	2
<i>EcSAND</i>	0.264	1	0.212	4	1.091	3	0.49	3	2.449	3
<i>EcEUC12</i>	0.274	2	0.210	3	1.22	4	0.493	4	3.464	4
<i>EcIDH</i>	0.349	4	0.438	7	0.994	2	0.604	7	4.705	5
<i>EcUBP6</i>	0.609	10	0.870	11	0.782	1	0.931	11	6.04	6
<i>Eca-TUB</i>	0.424	6	0.395	5	1.503	8	0.589	5	6.117	7

<i>EcPTB</i>	0.387	5	0.405	6	1.274	7	0.59	6	6.236	8
<i>EcACT</i>	0.451	7	0.447	8	1.561	9	0.612	8	8.239	9
<i>EcEF1-α</i>	0.499	8	0.561	9	1.571	10	0.683	9	9.24	10
<i>EcH2B</i>	0.537	9	0.666	10	1.605	11	0.753	10	10.241	11

Table 5. Ranking of the reference gene candidates generated according to their stability values calculated by the geNorm, NormFinder, BestKeeper, Delta-Ct and RefFinder algorithms using the Cq (Cycle of Quantification) data obtained from stem, leaves and leaf apex of eucalyptus plants infested with *L. invasa* and inoculated with *B. bassiana*.

Overall treatment analysis

Cq values from the five evaluated treatments were combined to analyze the overall expression stability of the candidate reference genes (Figure 2). *EcPP2A-1*, *EcPTB*, and *Ec α -TUB* were defined by NormFinder and DeltaCt algorithms as the most stable genes. geNorm indicated the *EcPTB*, *EcEUC12* and *EcPP2A-1* as the genes with higher expression stability, while BestKeeper listed the *EcUBP6*, *EcPTB* and *EcEUC12*. RefFinder classified *EcPTB*, *EcPP2A-1* and *EcEUC12* as the most stable reference genes when every treatment is analyzed at the same time. Regarding the least stable genes, the geNorm, BestKeeper, DeltaCt and RefFinder algorithms indicated the same set of genes, *EcH2B*, *EcACT* and *EcEF1- α* , as those with higher expression variability, while for NormFinder, *EcH2B*, *EcACT* and *EcUBP6*, were classified as least stable genes.

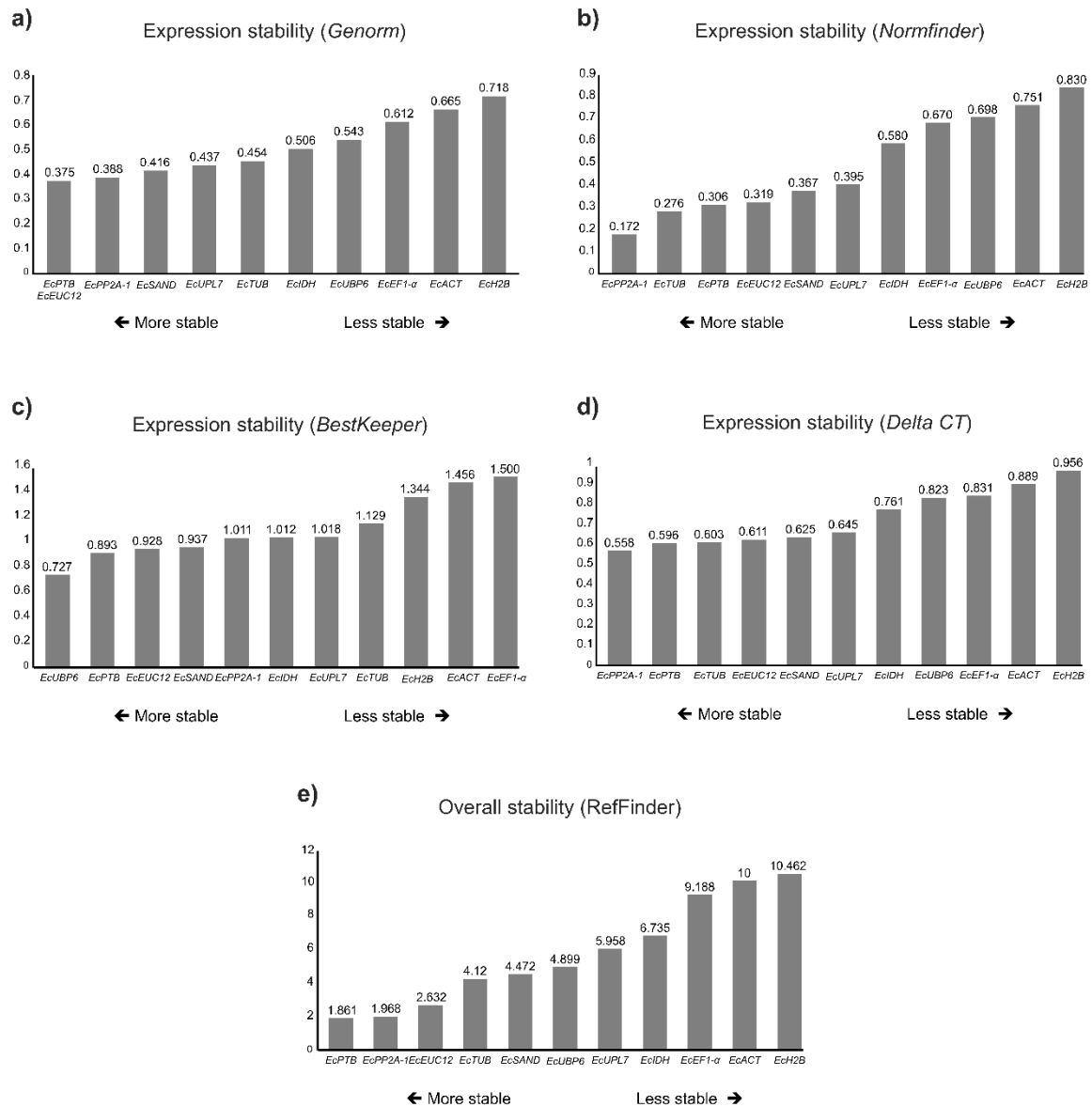


Figure 2. Ranking of the candidate reference genes according to their stability value calculated by the geNorm (a), NormFinder (b), BestKeeper (c), Delta-Ct (d), and RefFinder (e) algorithms using the Cq data (Cycle of Quantification) obtained from all five treatments (Control plants; Mother plants; Plants infested with *L. invasa*; Plants inoculated with *B. bassiana*; Plants infested with *L. invasa* and inoculated with *B. bassiana*).

4.3 REFERENCE GENE VALIDATION

The impact of choosing different reference genes was observed by analyzing the relative expression of the *EcDREB2* gene (Figure 3). The expression profile of the *EcDREB2* obtained from plants inoculated with the fungus *B. bassiana* and infested with the wasp *L. invasa* showed

that significant difference can occur depending of the reference genes chosen for the normalization process.

When *EcDREB2* was normalized by using the most stable reference genes according to RefFinder, *EcPP2A-1*, *EcULP7* and *EcSAND*, its expression was more than two times higher in the leaf apex than in the stem (Figure 3). However, when normalized by the least stable reference genes, *EcH2B*, *EcEF1- α* and *EcACT*, there was no difference in the *EcDREB2* expression in these tissues.

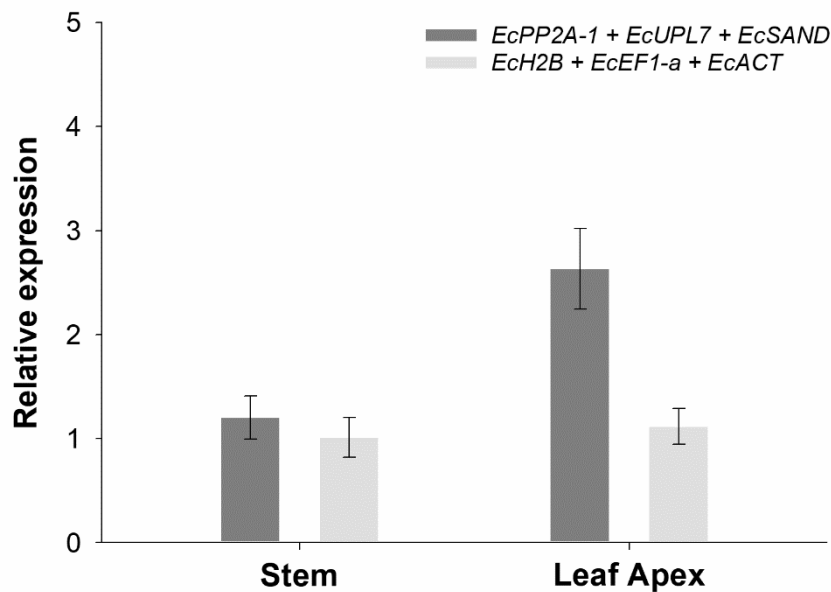


Figure 3. *EcDREB2* expression pattern, normalized with the most (*EcPP2A-1*, *EcULP7* and *EcSAND*) and least (*EcH2B*, *EcEF1- α* e *EcACT*) stable reference genes, according to the RefFinder algorithm, in stem and leaf Apex from Eucalyptus plants submitted to *L. invasa* infestation and *B. Bassiana* inoculation. Columns represent the fold different in gene expression in relation to a calibrator sample (stem). Expression levels were obtained from three biological replicates and the error bars represent the standard error among these replicates.

DISCUSSION

RT-qPCR analysis is universally accepted as a robust tool for quantifying gene expression levels^{33,42}. However, it is important to highlight that the calculation used to measure the gene expression levels requires an essential step that is data normalization⁴³. Normalization is necessary to correct experimental variations, such as differences in sample collection, total RNA extraction, cDNA synthesis and procedures inherent to the RT-qPCR technique itself,

guaranteeing the precision, reproducibility, and reliability of the results^{44,45}. In this context, a common strategy employed is the use of reference genes as internal normalization standards. This approach is widely recognized as one of the most efficient for correcting nonspecific variations and achieving accurate normalization of gene expression data by RT-qPCR^{25,46}.

The formulas used to calculate the gene expression levels by RT-qPCR, such as those described by Livak & Schmittgen⁴⁷ and Pfaffl⁴⁸, necessarily require the use of reference genes. Therefore, their appropriate selection, as performed in this research, is a fundamental preliminary step in gene expression studies, since the use of inappropriate reference genes can significantly compromise the accuracy and interpretation of the results^{33,49}. In this sense, several studies have been carried out, in different organisms and experimental conditions, with the aim of selecting and validating the best reference genes for RT-qPCR gene expression analyzes^{50–53}.

The results obtained in the present study provides the most suitable reference genes for the normalization of RT-qPCR data in *Eucalyptus* plants under the inoculation by *B. bassiana* and *L. invasa* infestation. Although several studies related to the selection of reference genes in *Eucalyptus* have been performed so far^{1,2,34–37}, this is the first time that such analysis is conducted in *Eucalyptus* (*Eucalyptus tereticornis* x *Eucalyptus camaldulensis* hybrid) plants under *B. bassiana* inoculation and *L. invasa* infestation.

4.4 EXPRESSION LEVELS OF ALL CANDIDATE REFERENCE GENES

Selection of suitable reference gene requires meeting several criteria, including: (1) to be expressed at different developmental stages, physiological conditions, and tissues; (2) display stable expression levels among different tissues and developmental, physiological and environmental conditions; (3) display moderate to high expression levels (Cq value between 15 and 30); (4) ability to reflect variations in the quantity and quality of RNA^{46,54}. These criteria are essential to ensure accurate and reliable choice of a reference gene.

The results found here demonstrated that the maximum and minimum Cq values from all tissues and experimental conditions were within the range recommended in the literature (minimum of 19.33 and maximum of 25.87)⁵⁴. Furthermore, when comparing the data obtained in this study with other studies carried out in *Eucalyptus* that used the same analysis approach, a similar Cq variation was observed among the candidate reference genes. In the study conducted by Boava et al.³⁵, the maximum and minimum Cq values of the 13 reference genes varied from 16 and 27. De Almeida et al.³⁶ analyzed the expression of 11 candidate reference genes and obtained minimum and maximum Cq values of 12 and 25, a difference of 13 cycles.

In the study conducted by Fernández et al.³⁷, 10 genes were evaluated and the Cq variation among them was of approximately 7 cycles (Cqs from 21 to 25). In our data, the minimum and maximum Cq values among all genes evaluated varied from 18 to 27.

These results are in accordance with the variations observed in the literature and also with two of the essential criteria highlighted by Ling et al.⁵⁴ and Mughal et al.⁴⁶ for the selection of adequate reference genes: (1) to be expressed at different developmental stages, physiological conditions, and tissues; (2) display moderate to high expression levels (Cq value between 15 and 30). This contributes to the reliability of the analyzes performed in this study and reinforces the importance of carefully evaluating gene expression levels when aiming to select the most appropriate reference genes for normalizing RT-qPCR gene expression data. Furthermore, this analysis has been widely explored in several studies with similar objectives^{50,53,55–57}.

4.5 REFERENCE GENE EXPRESSION STABILITY

Reference genes have been extensively used for the normalization of RT-qPCR gene expression data, as they are assumed to be expressed at constant levels, regardless of the tissues under analysis, experimental treatment, developmental stages or physiological conditions of the species evaluated^{28,55}. Thus, the use of genes involved in basal metabolism and structural integrity of the cell as reference genes is based on the general assumption that their expression levels are stable, independent of environmental/experimental conditions and cell type⁵⁸. Therefore, genes that play essential roles in maintaining basic cellular functions, such as growth and development processes, apoptosis, cell division and other physiological processes, are commonly used as reference genes, due to their ability to be expressed in all cells of an organism²⁶.

ACT, *GAPDH*, *EF1- α* , *TUB*, *UBC* and *PP2A* are often used as reference genes for the normalization of RT-qPCR studies²⁵. However, several studies have demonstrated that the expression of many commonly used reference genes can significantly vary their expression pattern, and this may lead to inadequate normalization of target genes^{19,28,29,43,59}. This reinforces that, up until now, no universal reference gene has been identified, since different studies have shown that none of the reference genes testes so far can be used across different species, environmental conditions, developmental stages, or different tissues^{30–32,60}. Therefore, evaluating reference gene stability in different tissues, developmental, physiological and environmental conditions is one of the fundamental criteria during the process of selecting the most suitable reference genes^{46,54}.

Genes commonly used and described in literature, such as *ACT*, *TUB*, *PP2A*, *UBC* and *EF1- α* were evaluated and the results confirmed that the selection of more stable reference genes may vary depending on the experimental conditions. This pattern has also been observed in eucalyptus's reference genes studies^{1,2,35}. Thus, since the ideal reference gene must present relatively stable expression levels in different cultivars, tissues and conditions^{46,54}, the results described in the literature highlight the challenge of identifying suitable genes for different conditions and the importance of validating reference genes.

The algorithms used in this study, geNorm⁵⁸, NormFinder⁶¹, BestKeeper⁶² e Delta-Ct⁶³ and RefFinder^{64,65} have been commonly used to evaluate the stability of reference genes in plants^{19,25,53}, animals^{66–68} and microorganisms^{69–71}. They are used to calculate the stability of gene expression using different mathematical models. Consequently, when analyzing the results among these algorithms, divergences can be observed in the establishment of the most stable genes⁵⁹. In order to increase the reliability of the reference gene selection process, at least two different algorithms should be used to select the most stable reference genes⁷², since there may be some variation in the selected genes among them^{1,28,43,59,73}. For this reason, RefFinder stands as an interesting alternative, instead of using these algorithms individually, considering that it uses the individual results obtained by each algorithm to perform a reanalysis and generate an overall classification of the most stable genes⁶⁵. The RefFinder tool has been widely used in studies aimed at determining the best reference genes^{50,53,55,73}.

In the present study, the Cq data of all candidate reference genes were submitted to a stability analysis using RefFinder, which allowed the identification of the genes that showed the greater stability in each treatment and enabled the observation of some similarities with other studies conducted Eucalyptus plants. In our results, *SAND* gene was one of the most stable genes in plants inoculated with *B. bassiana* (Table 3) and plants inoculated with *B. bassiana* and infested with *L. invasa* (Table 5). Moura et al.¹, for example, showed that *SAND* was one of the most stable genes under different conditions and different Eucalyptus species. Similarly, De Almeida et al.³⁶ defined the *SAND* gene as the most stable genes according to the geNorm algorithm during *in vitro* adventitious rooting of *Eucalyptus globulus* Labill. *TUB* gene in plants inoculated with *B. bassiana* (Table 3), and plants infested with *L. invasa* (Table 4) was one of the most stable genes in our analysis, similar to the study conducted by Fernández et al.³⁷, where *TUB* was also one of the best reference genes across different acclimation and de-acclimation treatments of *E. globulus*. Considering all treatments evaluated (Figure 2), control plants (Table 1) and mother plants (Table 2), one of the best reference genes analyzed was *EUC12*. De Almeida et al.³⁶ analyzed *in vitro* adventitious rooting in *E. globulus* and also found that *EUC12* displayed one of the most stable expression patterns among the genes analyzed according to the

geNorm algorithm. It is important to highlight that the comparison between the best genes defined in other studies must consider the species, tissues and treatments analyzed. However, the fact that, in some cases, the same genes from different studies are defined as most stable ones suggests a high expression stability of them in different *Eucalyptus* species, conditions and tissues.

4.6 REFERENCE GENE VALIDATION

Plants are organisms capable of sensing environmental changes and adjusting their physiological state to adapt to new conditions. Successful plant defense responses depend on the timely accumulation of defense compounds, which are activated according to the nature of the pathogen. In this context, pathogen attack can lead to changes in gene expression and metabolic modifications that allow the establishment of an efficient defense response. Transcription factors play a crucial role in the plant innate immunity. Specifically, ethylene response factors (*ERF*) are important integrators of hormonal pathways and play a direct role in the transcriptional regulation of several defense genes activated by jasmonate/ethylene⁷⁴.

The *AP2/EREBP* superfamily (*APETALA2/ Ethylene Responsive Element Binding Protein*) is one of the largest groups of plant-specific transcription factors⁷⁵. Genes belonging to this superfamily play a crucial role in plant development, as well as in their ability to tolerate biotic and abiotic stresses⁷⁶. These genes are essential for plant growth and the development and response to various stresses, such as extreme temperatures, drought, high salinity, and pathogen infection. Furthermore, they are involved in several hormonal signaling pathways, including abscisic acid, ethylene, cytokinins and jasmonates^{75,77}.

The *DREB* (drought-responsive binding elements) genes belong to the *AP2/EREBP* superfamily and are important regulators of the response to abiotic stress⁷⁸. Particularly, *DREB2* is mainly involved in dehydration/heat tolerance⁷⁹. Although its main function is associated with the response to these stresses, *DREB2* also displays high expression levels in tissues under insect attack⁸⁰. However, studies investigating the transcriptional expression of these genes in response to galling insect attacks are still scarce. Therefore, in the present work, the relative expression of *EcDREB2* was analyzed, allowing us to observe its expression in tissues subjected to *B. bassiana* inoculation and gall wasp attack. In comparison with the data available in the tool developed by Sundell et al.⁸⁰, it could be observed that the *EcDREB2* expression pattern, when the RT-qPCR data were normalized with the best reference genes (Figure 3), is similar, showing high expression levels in plants infested with *L. invasa*. Relatively higher expression levels of *EcDREB2* in leaf apex was expected, considering that *L. invasa* infestation primarily

occurs in leaf tissues^{12,81}. However, when the data was normalized with the least stable reference genes (Figure 3), the expression pattern was modified and *EcDREB2* expression in leaf apex and stem showed no difference, thus confirming the influence of the reference gene used in the final result of the RT-qPCR gene expression analysis.

The results obtained in the study shows that the expression pattern of a target gene is closely associated with the reference genes used for data normalization. When employing reference genes with lower stability to calculate the expression of *EcDREB2* a reduction in the relative expression level was observed, which can lead to erroneous interpretations and conclusions. These data highlight the relevance of carefully validating reference genes before applying them in gene expression studies.

CONCLUSION

In the present study, for the first time, the analysis and selection of the best reference genes for gene expression normalization in Eucalyptus (*Eucalyptus tereticornis* x *Eucalyptus camaldulensis* hybrid) plants subjected to *B. bassiana* inoculation and *L. invasa* infestation has been conducted. *EcPTB*, *EcPP2A-1* and *EcEUC12* were the best reference genes when all treatments were evaluated. The triplets *EcPTB/EcEUC12/EcUBP6*, *EcPP2A-1/EcEUC12/EcPTB*, *EcPP2A-1/Ecα-TUB/EcPTB*, *EcIDH/EcSAND/Ecα-TUB* and *EcPP2A-1/EcUPL7/EcSAND* were the best reference genes for control plants, mother plants, plants infested with *L. invasa*, plants inoculated with *B. bassiana*, and plants inoculated with *B. bassiana* and infested with *L. invasa*, respectively. In relation to the worst reference genes, *EcH2B*, *EcACT*, and *EcEF1-α* were defined as the least suitable genes when all treatments are evaluated. The data obtained highlight the importance of developing this type of study to increase the reliability of relative expression analyses. Furthermore, the reported findings can serve as a basis for the development of studies aimed at analyzing the relative expression of genes related to different metabolic pathways of interest, such as the defensive responses of Eucalyptus plants inoculated with the entomopathogenic fungus *B. bassiana* and infested with the gall wasp *L. invasa*.

METHODS

4.7 EXPERIMENT DESIGN

Study area

The experiment was carried out under greenhouse conditions at the Experimental Research Station of the Federal University of Tocantins – UFT, Gurupi-TO (11°43' S and 49°04' W, 284 m altitude). The region's climate is Aw type (tropical climate, with dry winter), with an average annual temperature and rainfall of 26.1°C and 1776.4 mm, respectively.

Eucalyptus seedling production

Rooted cuttings of the hybrid clone of *Eucalyptus tereticornis* x *Eucalyptus camaldulensis* were produced under greenhouse conditions. After 120 days, the cuttings were transplanted from tubes into 3.8-liter pots containing Bioplant® commercial substrate based on pine bark, carbonized rice husk, vermiculite, macronutrients and micronutrients. After transplantation of the seedlings, plants were acclimatized in the greenhouse for 30 days and then taken to an area in full sun.

Beauveria bassiana inoculation

The fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill (strain PL 63) was obtained from the mycological collection of the Insect-Microorganism Symbioses Laboratory of UFT (Gurupi Campus). Plates from the collection were re-plated into new plates containing P.D.A. medium. (Potato, Dextrose, Agar), supplemented with amoxicillin (500 µg. mL⁻¹) and maintained at B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) for a period of 12 days at 25 °C ± 2°C and a 12-hours photoperiod.

After this period, plates were opened in a laminar flow chamber and, under aseptic conditions, spores were removed from the colonies. This step was performed by adding 10 ml of distilled water and Tween 80® 0.02% (v/v), previously autoclaved, with the spores being gently scraped with a sterilized spatula. These spores were transferred to a sterile beaker containing 100 ml of sterilized distilled water. This solution was stirred in an incubator with orbital shaking at 150 rpm for 10 minutes at room temperature. After this process, the suspension was filtered into an autoclaved beaker through a double layer of sterilized gauze to retain the mycelium fragments and remains of the culture medium. An aliquot of this solution was placed in a Neubauer chamber to count spores using an optical microscope. Then, the concentration of the solution was adjusted to 10⁸ spores/ml with distilled water containing 0.02% (v/v) Tween 80®. The inoculation with this solution was performed immediately after

its preparation. For control plants, an autoclaved solution of distilled water solution containing 0.02% (v/v) Tween 80® was used. From the same solution, a 15 ml aliquot was used to perform the viability test with the aid of the Neubauer camera. After a period of 48 hours, the viability test was carried out, where the conidia evaluated displayed a viability of 80%. The adaxial epidermis of the fourth, fifth and sixth fully expanded leaves from each plant were slightly injured with a soft sponge. Spraying was carried out, especially on injured leaves. After spraying, six branches from the upper third of each plant were covered with transparent plastic bags for 36 hours⁸².

***Leptocybe invasa* breeding and infestation**

The *Leptocybe invasa* individuals used in this work were obtained from a breeding cage (2.8m x 5.2m x 3.0m - height x length x width, and branches with galls close to emergence were cut from Eucalyptus plants (hybrid *Eucalyptus tereticornis* x *Eucalyptus camaldulensis*) in the breeding cage. After cutting the branches, they were immediately taken to the Laboratory and placed in a beaker with distilled water inside a bench cage covered with organza. A container with a solution of water and honey was also placed inside the cage to feed the wasp individuals that emerged from the galls. The cage was kept in the Laboratory, at room temperature, for a period of 24 hours. After this period, the individuals that emerged were collected with manual suckers and placed in microcentrifuge tubes.

At 45 days after inoculation of *B. bassiana* in Eucalyptus, all plants (inoculated and non-inoculated), except control and mother plants, were infested with *L. invasa*. For this, six branches of each plant were wrapped in an organza bag containing a closed 2.0 ml microcentrifuge tube with two individuals of *L. invasa*¹⁰. Then, the microtubes were opened so that the wasps could come out to oviposit. After 48 hours of infestation, the bags and wasps were removed, and after 48 hours from this, samples were collected.

Plant material and treatments

Samples consisted of roots, stems, fully expanded leaves, and leaf apices from mother plants maintained under field conditions and the seedlings produced as previously described. Each of these materials were collected from plants of the following treatments: mother plants, control plants (without inoculation and without infestation), plants infested with *L. invasa*, seedlings inoculated with *B. bassiana*, and plants inoculated with *B. bassiana* and also infested with *L. invasa*. Three biological replicates were used for each sample type, with each biological

replicate consisting of four plants. Samples were collected and immediately frozen in liquid nitrogen and subsequently stored at -80°C until RNA extraction. Molecular analyzes were carried out at the Molecular Analysis Laboratory (LAM) of the Federal University of Tocantins (UFT), Palmas campus.

4.8 RNA EXTRACTION

RNA extraction was performed using the CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) method⁸³ modified by Gonçalves et al., (2021) and with minor alterations (Supplementary S2). After extraction, the RNA quantity and purity (A_{260}/A_{280} and A_{260}/A_{230} ratios) were determined through a spectrophotometer (Nanodrop® One Spectrophotometer), while RNA integrity was verified using the agarose gel (0.8%).

4.9 DNase TREATMENT AND cDNA SYNTHESIS

RNA samples (5 μg) were treated with DNase I, using the Turbo DNA-free kit (Ambion) and following its instructions, to eliminate residual DNA contamination. Subsequently, RNA was evaluated for its quantity and purity (A_{260}/A_{280} and A_{260}/A_{230} ratios) through spectrophotometry (Nanodrop® One Spectrophotometer) and its integrity was analyzed through agarose gels (0.8%). cDNA was synthesized from 1.0 μg of RNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) and following the manufacturer's protocol. cDNA samples were then stored at -20°C .

4.10 IDENTIFICATION AND SELECTION OF TARGET AND REFERENCE GENES

The reference genes analyzed in this study were chosen from a search for Eucalyptus reference gene studies on the Web of Science database (www.webofknowledge.com), using the following keywords: *housekeeping gene*, *endogenous gene*, *reference gene* and *Eucalyptus*. The Boolean interpolator “and” was used. From this search, the selection of the reference genes followed the recommendation criteria of the article in which they were analyzed, that is, the genes that had the best results (greater expression stability in the sample set used) were prioritized. Following this approach, the 12 different genes were selected: *PP2A-1* (*Protein phosphatase 2A-2*), *SAND* (*SAND family, trafficking protein Mon1*), *UPL7* (*Ubiquitin-protein ligase 7*), *PTB* (*Polypyrimidine tract-binding protein 1*)³⁸; *Actin-2* (*Actin 2*), *18srRNA* (*RNA ribosomal 18S*), *IDH* (*NADP-isocitrate dehydrogenase*)³⁴; α -*TUB* (α -*Tubulin*), *UBC* (*Ubiquitin*

C), *EF-1 α* (Elongation factor 1- α)³⁷; *EUC12* (Putative RNA binding protein), *H2B* (Histone H2B)³⁶.

The selection of the target gene used to validate the selected reference genes was based on the gene expression data generated by the tool (<https://plantgenie.org/>) described by Sundell et al., (2015). For this, the PFAM number (PF00847)⁸⁵ corresponding to the AP2/EREBP superfamily (APETALA2/ Ethylene Responsive Element Binding Protein) was used to search, on the available *Eucalyptus grandis* database of the tool, all gene sequences referring to this superfamily. After identifying the sequences, they were selected and used to generate a gene expression graph using the ExHeatmap option. After analyzing the graph, the gene *DREB2* (dehydration-responsive element-binding protein 2) showed a high expression level in *Eucalyptus grandis* tissues subjected to *L. invasa* infestation, being selected for validation analysis.

4.11 GENE SEQUENCE IDENTIFICATION

The reference and target gene sequences were obtained using the BLAST tool (Basic Local Alignment Search)⁸⁶ through the comparison of their nucleotide sequences from *Eucalyptus grandis*, obtained on the Phytozome database (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>), with the *Eucalyptus camaldulensis* Genome Database (www.kazusa.or.jp/eucaly/index.html).

4.12 PRIMER DESIGN

RT-qPCR primers for RT-qPCR were designed by using the reference and target gene sequences obtained from the *Eucalyptus camaldulensis* Genome Database and the OligoPerfect program (apps.thermofisher.com/apps/oligoperfect/). Quality assessment of the designed primers was evaluated by the OligoAnalyzer tool (<http://www.idtdna.com/calc/analyzer>), and the melting curves of all genes analyzed here are described in Supplementary S3.

Gene name	Accession number	Primer sequence (5'-3')	Tm (°C)	Amplicon (bp)	R ²	E (%)
<i>EcPP2A-1</i>	EcC035070.20	Fw: GGAGATTGGAGAGAACATGGACC Rv: GGAGTCTTGCGTGTGGTGTC	62,5 60,7	87	0,99	100

<i>EcEF-1α</i>	EcC054749.90	Fw: TCGGGCTTTGAGGGTGACAA Rv: TCTTGGGCTCTAGGATCAGGTC	61,6 62,8	103	1,00	97,7
<i>EcPTB</i>	EcC038236.10	Fw: TTTCTGCTTTTGGTCCTGTGC Rv: GCAGCAGTCGTTATGTCAGGG	60,8 62,5	94	0,99	96,8
<i>EcACT</i>	EcS556981.10	Fw: GCTGGATTTCGCAGGTGATGATG Rv: CCTTCTGACCCATTCCGACCA	62,8 64,8	97	1,00	1,00
<i>EcIDH</i>	EcC000103.10	Fw: AGCGAGGGAGGTTATGTGTGG Rv: ATGTCATCAAGCCAAGCGATCC	63,7 61,9	97	0,98	96,2
<i>Eca-TUB</i>	EcC009196.10	Fw: GGGGATTTCAGGTCGGCAACT Rv: TGAGGTGTCACTGGGCATCG	62,3 61,7	88	1,00	95,1
<i>EcUBC2</i>	EcS510545.10	Fw: TGCTCTTATCAAGGGACCGTCG Rv: GAAACGAACTTGAGGCGGCT	63,7 60,1	106	0,99	100
<i>EcEUC12</i>	EcC054911.20	Fw: TACCCTGTGAGAGTGCTGCC Rv: GCACATCTCCCGCTCATCCT	60,7 61,2	90	0,99	97,4
<i>EcH2B</i>	EcC049406.40	Fw: CCTGCTCGATTCTTGATGGC Rv: CACCGCCGACTTCTTCTCCT	60,3 61,6	81	0,99	100
<i>EcSAND</i>	EcC020159.20	Fw: TGAGGAAGTGAGGAGTGACGC Rv: CATCATCCTCATCAACGTGCCG	63,8 63,1	80	0,99	99,3
<i>EcUPL7</i>	EcC023921.10	Fw: ACTGAACCCTGTGGCTGGAT Rv: GCGATCAGAGGCACCATGAAA	60,4 62,2	118	0,97	83,1
<i>EcDREB2</i>	EcC047161.20	Fw: GAGGTGACGGAGGTGAAGGG Rv: GCAACGAAACGCACTCCCAC	63,0 61,7	118	1,00	87,4

Table 6. RT-qPCR primer sequences, gene name, accession number, melting temperature (Tm), amplicon size, correlation coefficient (R2), and amplification efficiency (E %) of the reference and target genes analyzed.

4.13 RT-QPCR ANALYSIS

RT-qPCR analyzes were carried out on an ABI PRISM 7500 Real-Time PCR thermocycler (Applied Biosystems), using the PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems). Reactions were performed in 10 µL final volume: 1.0 µL of cDNA (diluted 1:5), 0.2 µL of each primer at 10 µM, and 5.0 µL of PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems), and 3.6 µL of RNase-DNase-free water. Three biological replicates

were used, and reactions were run in triplicates as technical repetitions. Amplification reactions were carried out with the following conditions: 2 minutes at 50°C, 2 minutes at 95°C, followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C and 1 minute at 60°C. To confirm the specificity of the primers, melting curves were generated after 40 amplification cycles for each primer pair by raising the temperature from 60 to 95 °C, with 1 °C increase in temperature every 5s. Cq was determined by the number of cycles in which the fluorescence generated within a reaction crosses the Threshold line. The mathematical model proposed by Pfaffl was used to calculate the relative expression of *EcDREB2*⁴⁸. Relative expression graphs were plotted using the SigmaPlot version 12.0.

4.14 EXPRESSION STABILITY OF THE CANDIDATE REFERENCE GENES

The algorithms geNorm⁵⁸, NormFinder⁶¹, BestKeeper⁶² and Delta-Ct⁶³ were used to calculate the stability values. The algorithms generate a classification based on the stability value of each evaluated gene. Subsequently, the data generated by the algorithms were analyzed by RefFinder, which integrates the four algorithms and provides a general classification of all candidate references gene tested^{64,65}. The following sample sets were used by the RefFinder tool (www.ciidirsinaloa.com.mx/RefFinder-master/) to evaluate the stability of the evaluated genes: root, stem, leaf and leaf apex in all treatments; and root, stem, leaf and leaf apex in each treatment. Box plots were plotted to illustrate the expression levels and variations of the tested genes by the SigmaPlot program (version 12.0).

4.15 DATA AVAILABILITY

All Cq data obtained in this study for every sample and gene in all treatments of the Eucalyptus are available in the tables of Supplementary S1. All melting curves of the candidate reference genes analyzed are available in Supplementary S2. The protocol used for RNA extraction is available in Supplementary S3.

REFERENCES

1. Moura, J. C. M. S. *et al.* Validation of reference genes from *Eucalyptus* spp. under different stress conditions. *BMC Res Notes* **5**, (2012).
2. De Oliveira, L. A. *et al.* Reference genes for the normalization of gene expression in eucalyptus species. *Plant Cell Physiol* **53**, 405–422 (2012).

3. Sistema Nacional de Informações Florestais (SNIF). Cadeia Produtiva. <http://snif.florestal.gov.br/pt-br/cadeia-produtiva> (2020).
4. Florêncio, G. W. L., Martins, F. B. & Fagundes, F. F. A. Climate change on Eucalyptus plantations and adaptive measures for sustainable forestry development across Brazil. *Ind Crops Prod* **188**, (2022).
5. Indústria Brasileira de Árvores (IBÁ). *Relatório Anual*. <https://www.iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-anual-iba2022-compactado.pdf> (2022).
6. Booth, T. H. Eucalypt plantations and climate change. *For Ecol Manage* **301**, 28–34 (2013).
7. de Moraes Gonçalves, J. L. *et al.* Integrating genetic and silvicultural strategies to minimize abiotic and biotic constraints in Brazilian eucalypt plantations. *For Ecol Manage* **301**, 6–27 (2013).
8. Mendel, Z., Protasov, A., Fisher, N. & La Salle, J. Taxonomy and biology of *Leptocybe invasa* gen. & sp. n. (Hymenoptera: Eulophidae), an invasive gall inducer on Eucalyptus. *Aust J Entomol* **43**, 101–113 (2004).
9. Kumari, N. K., Harish, K., Vastrad, A. S. & Goud, K. B. Biology of eucalyptus gall wasp, *Leptocybe invasa* Fisher and La Salle (Hymenoptera: Eulophidae). *Karnataka Journal of Agricultural Sciences* **23**, 211–212 (2010).
10. Sarmiento, M. I. *et al.* Differential development times of galls induced by *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) reveal differences in susceptibility between two Eucalyptus clones. *Pest Manag Sci* **77**, 1042–1051 (2021).
11. Baron, N. C. *et al.* Filamentous fungi in biological control: current status and future perspectives. *Chil J Agric Res* **79**, 307–315 (2019).
12. Rocha, J. P. L. *et al.* Morphophysiological Responses in Eucalyptus Demonstrate the Potential of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* to Promote Resistance against the Gallling Wasp *Leptocybe invasa*. *Forests* **14**, 1349 (2023).
13. Bacon, C. W. *Biotechnology of endophytic fungi of grasses*. (ed. Bacon, C. W & White, J. F), 1-213 (CRC Press, 2018).
14. Zimmermann, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Sci Technol* **17**, 553-596 (2007).
15. Myburg, A. A. *et al.* The genome of *Eucalyptus grandis*. *Nature* **510**, 356–362 (2014).
16. Brazma, A. & Vilo, J. Gene expression data analysis. *FEBS Lett* **480**, 17–24 (2000).
17. Yang, Z., Zhang, R. & Zhou, Z. Identification and validation of reference genes for gene expression analysis in *Schima superba*. *Genes (Basel)* **12**, 732 (2021).

18. Gachon, C., Mingam, A. & Charrier, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? *J Exp Bot* **55**, 1445–1454 (2004).
19. Fernandes-Brum, C. N. *et al.* A panel of the most suitable reference genes for RT-qPCR expression studies of coffee: screening their stability under different conditions. *Tree Genet Genomes* **13**, 131 (2017).
20. Lucho, S. R. *et al.* Validation of reference genes for RT-qPCR studies in *Stevia rebaudiana* in response to elicitor agents. *Physiology and molecular biology of plants* **24**, 767–779 (2018).
21. Nolan, T., Hands, R. E. & Bustin, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* **1**, 1559–1582 (2006).
22. Pfaffl, M. W. Quantification strategies in real-time PCR. *AZ of quantitative PCR* **1**, 89–113 (2004).
23. Yang, Q. *et al.* Reference gene selection for qRT-PCR in *Caragana korshinskii* Kom. under different stress conditions. *Mol Biol Rep* **41**, 2325–2334 (2014).
24. Zhu, J. *et al.* Reference Gene Selection for Quantitative Real-time PCR Normalization in *Caragana intermedia* under Different Abiotic Stress Conditions. *PLoS One* **8**, e53196 (2013).
25. Lin, Y. *et al.* Identification and validation of reference genes for qRT-PCR analyses under different experimental conditions in *Allium wallichii*. *J Plant Physiol* **281**, (2023).
26. Joseph, J. T., Poolakkalody, N. J. & Shah, J. M. Plant reference genes for development and stress response studies. *J Biosci* **43**, 173–187 (2018).
27. Nguyen, D. Q., Eamens, A. L. & Grof, C. P. L. Reference gene identification for reliable normalisation of quantitative RT-PCR data in *Setaria viridis*. *Plant Methods* **14**, (2018).
28. Li, G. *et al.* Identification of Reference Genes for Reverse Transcription-Quantitative PCR Analysis of Ginger Under Abiotic Stress and for Postharvest Biology Studies. *Front Plant Sci* **13**, (2022).
29. Reddy, D. S. *et al.* Identification and validation of reference genes and their impact on normalized gene expression studies across cultivated and wild Cicer species. *PLoS One* **11**, (2016).
30. Zhong, Y. *et al.* Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR normalization in *Psoralea corylifolia* (Babchi) under various abiotic stress. *J Plant Physiol* **274**, 153722 (2022).
31. de Oliveira, L. F. *et al.* Selection and validation of reference genes for measuring gene expression in Piper species at different life stages using RT-qPCR analysis. *Plant Physiology and Biochemistry* **171**, 201–212 (2022).

32. Dong, X. M., Zhang, W. & Zhang, S. B. Selection and Validation of Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR Analysis of Development and Tissue-Dependent Flower Color Formation in *Cymbidium lowianum*. *Int J Mol Sci* **23**, 738 (2022).
33. Yu, Y. *et al.* Selection of Reference Genes for qPCR Analyses of Gene Expression in Ramie Leaves and Roots across Eleven Abiotic/Biotic Treatments. *Scientific Reports* **2019** 9:1 **9**, 1–13 (2019).
34. Sundari, B. K. R. & Dasgupta, M. G. Selection and validation of reference genes for real-time qRT-PCR normalization in different tissues of *Eucalyptus tereticornis*. *Silvae Genet* **61**, 280–286 (2012).
35. Boava, L. P. *et al.* Selection of endogenous genes for gene expression studies in Eucalyptus under biotic (*Puccinia psidii*) and abiotic (acibenzolar-S-methyl) stresses using RT-qPCR. *BMC Res Notes* **3**, (2010).
36. de Almeida, M. R. *et al.* Reference gene selection for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction normalization during in vitro adventitious rooting in *Eucalyptus globulus* Labill. *BMC Mol Biol* **11**, 1–12 (2010).
37. Fernández, M., Villarroel, C., Balbontín, C. & Valenzuela, S. Validation of reference genes for real-time qRT-PCR normalization during cold acclimation in *Eucalyptus globulus*. *Trees - Structure and Function* **24**, 1109–1116 (2010).
38. Cassan-Wang, H. *et al.* Reference genes for high-throughput quantitative reverse transcription-PCR analysis of gene expression in organs and tissues of eucalyptus grown in various environmental conditions. *Plant Cell Physiol* **53**, 2101–2116 (2012).
39. Martins, G. S., Freitas, N. C., Máximo, W. P. F. & Paiva, L. V. Gene expression in two contrasting hybrid clones of *Eucalyptus camaldulensis* x *Eucalyptus urophylla* grown under water deficit conditions. *J Plant Physiol* **229**, 122–131 (2018).
40. Imai, T., Ubi, B. E., Saito, T. & Moriguchi, T. Evaluation of reference genes for accurate normalization of gene expression for real time-quantitative PCR in *Pyrus pyrifolia* using different tissue samples and seasonal conditions. *PLoS One* **9**, (2014).
41. Xiao, Z. *et al.* Selection of reliable reference genes for gene expression studies on *Rhododendron molle* G. Don. *Front Plant Sci* **7**, (2016).
42. Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F. & Vandesompele, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* **8**, 1–14 (2008).
43. Song, J., Cho, J., Park, J. & Hwang, J. H. Identification and validation of stable reference genes for quantitative real time PCR in different minipig tissues at developmental stages. *BMC Genomics* **23**, (2022).

44. Kozera, B. & Rapacz, M. Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet* **54**, 391–406 (2013).
45. Bustin, S. A. *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem* **55**, 611–622 (2009).
46. Mughal, B. B., Leemans, M., Spirhanzlova, P., Demeneix, B. & Fini, J. B. Reference gene identification and validation for quantitative real-time PCR studies in developing *Xenopus laevis*. *Sci Rep* **8**, (2018).
47. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
48. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45–e45 (2001).
49. Lian, C. *et al.* Validation of suitable reference genes by various algorithms for gene expression analysis in *Isodon rubescens* under different abiotic stresses. *Scientific Reports* 2022 **12:1** **12**, 1–13 (2022).
50. Yao, J. *et al.* Reference Gene Selection for qPCR Analysis in *Schima superba* under Abiotic Stress. *Genes (Basel)* **13**, 1887 (2022).
51. Ji, T. *et al.* Reference genes identification for qRT-PCR normalization of gene expression analysis in *Cucumis sativus* under *Meloidogyne incognita* infection and *Pseudomonas* treatment. *Front Plant Sci* **13**, 4907 (2022).
52. Xu, H. *et al.* Screening of suitable reference genes for gene expression using quantitative real-time PCR in *Gynura bicolor* DC. *ScienceAsia* **48**, 833 (2022).
53. Bai, S. *et al.* Selection and Evaluation of Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Inoculated with *Oidium neolycopersici*. *Agronomy* 2022, Vol. 12, Page 3171 **12**, 3171 (2022).
54. Ling, H., Wu, Q., Guo, J., Xu, L. & Que, Y. Comprehensive Selection of Reference Genes for Gene Expression Normalization in Sugarcane by Real Time Quantitative RT-PCR. *PLoS One* **9**, e97469 (2014).
55. Wang, G. *et al.* Identification and testing of reference genes for qRT-PCR analysis during pear fruit development. *Biologia* 2022 **1**, 1–15 (2022).
56. Wang, J. *et al.* Evaluation and selection of suitable qRT-PCR reference genes for light responses in tea plant (*Camellia sinensis*). *Sci Hortic* **289**, 110488 (2021).
57. Berruén, N. N. A., Murray, J. F. & Smith, C. L. Pregnancy influences the selection of appropriate reference genes in mouse tissue: Determination of appropriate reference genes for quantitative reverse transcription PCR studies in tissues from the female mouse reproductive axis. *Gene* **801**, 145855 (2021).

58. Vandesompele, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**, 1–12 (2002).
59. Freitas, N. C. *et al.* Validation of reference genes for qPCR analysis of *Coffea arabica* L. somatic embryogenesis-related tissues. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **128**, 663–678 (2017).
60. Abbas, A. *et al.* Selection and validation of reference genes for rt-qpcr analysis in *Aegilops tauschii* (Coss.) under different abiotic stresses. *Int J Mol Sci* **22**, 11017 (2021).
61. Andersen, C. L., Jensen, J. L. & Ørntoft, T. F. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Res* **64**, 5245–5250 (2004).
62. Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C. & Neuvians, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* **26**, 509–515 (2004).
63. Silver, N., Best, S., Jiang, J. & Thein, S. L. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Molecular Biol* **7**, 33 (2006).
64. Xie, F., Wang, J. & Zhang, B. RefFinder: a web-based tool for comprehensively analyzing and identifying reference genes. *Funct Integr Genomics* **23**, 1–5 (2023).
65. Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L. & Zhang, B. miRDeepFinder: A miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol Biol* **80**, 75–84 (2012).
66. Coelho, T. C. *et al.* Reference gene selection for quantitative PCR in liver, skeletal muscle, and jejunum of *Bos indicus* cattle. *Revista Brasileira de Zootecnia* **51**, (2022).
67. Xie, C. Di *et al.* Validation of the Reference Genes for the Gene Expression Studies in Different Cell Lines of Pig. *Biomed Res Int* **2021**, (2021).
68. Ni, M. *et al.* Selection and validation of reference genes for the normalization of quantitative real-time PCR in different muscle tissues of rabbits. *BMC Zool* **7**, (2022).
69. Daúde, M. M. *et al.* Selection and validation of reference genes for RT-qPCR gene expression studies in *Candida viswanathii* cultivated under different grown conditions. *J Microbiol Methods* **211**, 106777 (2023).
70. Li, J. Y. *et al.* Screening of reference genes in real-time PCR for *Radopholus similis*. *PeerJ* **7**, e6253 (2019).
71. Pant, N., Rush, C., Warner, J. & Eisen, D. P. Effect of Savirin or Ticagrelor Treatment on the Expression of Commonly Used Reference Genes in *Staphylococcus aureus*. *Microorganisms* **11**, (2023).

72. Volland, M., Blasco, J. & Hampel, M. Validation of reference genes for RT-qPCR in marine bivalve ecotoxicology: Systematic review and case study using copper treated primary *Ruditapes philippinarum* hemocytes. *Aquatic Toxicology* **185**, 86–94 (2017).
73. Zheng, H., Zhao, H., Zhang, X., Liang, Z. & He, Q. Systematic Identification and Validation of Suitable Reference Genes for the Normalization of Gene Expression in *Prunella vulgaris* under Different Organs and Spike Development Stages. *Genes (Basel)* **13**, 1947 (2022).
74. Huang, P. Y., Catinot, J. & Zimmerli, L. Ethylene response factors in Arabidopsis immunity. *J Exp Bot* **67**, 1231–1241 (2016).
75. Chen, L. *et al.* Expansion and stress responses of AP2/EREBP superfamily in *Brachypodium distachyon*. *Scientific Reports* **6**, 1–14 (2016).
76. Liu, C. & Zhang, T. Expansion and stress responses of the AP2/EREBP superfamily in cotton. *BMC Genomics* **18**, 1–16 (2017).
77. Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T. & Shinshi, H. Genome-Wide Analysis of the ERF Gene Family in Arabidopsis and Rice. *Plant Physiol* **140**, 411–432 (2006).
78. Licausi, F., Ohme-Takagi, M. & Perata, P. APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF) transcription factors: mediators of stress responses and developmental programs. *The New phytologist* **199**, 639–649 (2013).
79. Xu, Y., Zhan, C. & Huang, B. Heat Shock Proteins in Association with Heat Tolerance in Grasses. *Int J Proteomics* **2011**, 1–11 (2011).
80. Sundell, D. *et al.* The Plant Genome Integrative Explorer Resource: PlantGenIE.org. *New Phytologist* **208**, 1149–1156 (2015).
81. Pinsupa, S. *et al.* Transcriptome Analysis Reveals Genes Involved in Responses of Eucalyptus to Gall Wasp Infestation. *Horticulturae* **9**, (2023).
82. Siviero, A. [UNESP]. Avaliação de métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica* e mapeamento de QTLs de resistência em híbridos de *Citrus sunki* vs. *Poncirus trifoliata* a gomose. <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/0b640b16-0da3-47f4-b3e0-693e353fd172/content> (2001).
83. Chang, S., Puryear, J. & Cairney, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Report* **11**, 113–116 (1993).
84. Gonçalves, R. C. *et al.* Evaluation of extraction methods for obtaining high-quality RNA from sweet potato. *Genetics and Molecular Research* **20**, (2021).
85. Paysan-Lafosse, T. *et al.* InterPro in 2022. *Nucleic Acids Res* **51**, D418–D427 (2023).
86. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403–410 (1990).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)” (Process number 405279/2023-0), the “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – PROCAD Amazônia (Process number 306011/2022-0)”, the “Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazonia Legal (Bionorte)” and the “Universidade Federal do Tocantins (PROPESQ-UFT).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, R.A.S & H.G.B; Methodology, M.I.S. & R.A.S; Experiment, data collection & Software analysis, M.M.D, J.N.R & N.M.P.L; Supervision, H.G.B & R.A.S; Writing-original draft, M.M.D; Writing-review & editing, H.G.B, R.A.S, S.A.S, A.A.L & M.I.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary S1

Table S1 Cycle of Quantification (Cq) for every samples and genes of the *Eucalyptus* mother plants. Each sample was composed by three biological replicates and one of them was run in technical triplicates. The letters S, L, and LA refer to Stem, Leaves, and Leaf apex, respectively. The numbers right after the letters representing the sample type refer to the number of the biological replicate. *Ec* = *Eucalyptus camaldulensis*.

SAMPLE	<i>EcEF1-α</i>	<i>EcPP2A-1</i>	<i>EcACT</i>	<i>EcTUB</i>	<i>EcPTB</i>	<i>EcUBP6</i>	<i>EcH2B</i>	<i>EcEUC12</i>	<i>EcIDH</i>	<i>EcSAND</i>	<i>EcUPL7</i>
C1	24.56	23.78	17.31	21.49	23.92	21.74	20.43	22.93	19.61	22.71	24.94
C1	24.53	23.59	17.36	21.35	23.65	21.50	20.20	22.75	19.43	22.64	24.87
C1	24.65	23.41	17.33	21.34	23.61	21.53	20.18	22.67	19.79	22.78	24.61
C2	23.16	22.53	15.99	20.66	23.17	20.59	19.48	21.57	19.15	22.07	24.41
C2	23.04	22.28	16.19	20.49	22.97	20.48	19.22	21.51	18.69	22.04	24.30
C2	23.06	22.25	16.64	20.48	22.93	20.41	19.26	21.45	18.88	22.10	24.32
C3	23.43	22.62	16.22	20.85	23.49	20.67	19.44	21.90	19.25	22.41	24.71
C3	23.32	22.48	16.24	20.58	23.16	20.54	19.39	21.78	18.98	22.62	24.85
C3	23.20	22.31	16.65	20.43	23.04	20.54	19.23	21.78	18.99	22.32	24.79
F1	28.77	25.98	22.52	24.26	26.15	22.48	23.43	25.58	21.68	24.51	27.66
F1	28.49	25.77	22.58	24.28	25.91	22.32	23.33	25.62	21.59	24.42	27.75

F1	28.38	25.80	22.50	23.87	25.85	22.37	23.39	25.28	21.56	24.60	27.78
F2	28.10	25.73	21.86	23.64	25.67	22.15	22.78	24.97	21.03	24.81	27.19
F2	27.73	25.45	21.84	23.61	25.61	22.22	22.87	25.06	20.78	24.85	27.09
F2	27.98	25.23	21.78	23.49	25.63	22.63	22.78	24.93	20.88	24.78	27.18
F3	26.92	24.77	20.19	23.24	25.41	21.76	22.48	24.63	20.73	23.72	26.75
F3	26.94	24.68	20.21	23.14	25.14	21.68	22.30	24.47	20.33	23.72	26.75
F3	27.01	24.64	20.47	23.04	25.05	21.69	22.25	24.29	20.47	23.72	26.68
AF1	24.03	23.13	17.43	21.29	24.16	21.82	17.56	23.32	20.60	22.52	26.24
AF1	24.04	23.14	17.22	21.11	23.90	21.58	17.16	23.02	20.41	22.50	26.04
AF1	23.98	23.00	17.41	20.98	23.83	21.49	17.97	22.91	20.32	22.54	26.03
AF2	24.07	23.31	18.74	20.98	23.98	21.54	18.17	23.11	20.04	23.48	25.67
AF2	24.18	23.27	18.55	20.71	23.79	21.54	19.97	22.93	19.79	23.17	25.51
AF2	24.12	23.20	18.47	20.66	23.83	21.44	17.89	22.78	19.63	22.99	25.36
AF3	24.34	23.65	18.66	21.24	23.90	21.62	18.31	23.24	20.31	23.37	25.91
AF3	24.37	23.62	18.53	21.11	23.84	21.60	18.32	23.03	20.17	23.22	25.60
AF3	24.29	23.60	18.48	20.87	23.70	21.50	18.21	22.87	20.09	23.25	25.66

Table S2 Cycle of Quantification (Cq) for every samples and genes of the *Eucalyptus* control plants. Each sample was composed by three biological replicates and one of them was run in technical triplicates. The letters R, S, L, and LA refer to Roots, Stem, Leaves, and Leaf apex, respectively. The numbers right after the letters representing the sample type refer to the number of the biological replicate. *Ec* = *Eucalyptus camaldulensis*.

SAMPLE	<i>EcEF1-α</i>	<i>EcPP2A-1</i>	<i>EcACT</i>	<i>EcTUB</i>	<i>EcPTB</i>	<i>EcUBP6</i>	<i>EcH2B</i>	<i>EcEUC12</i>	<i>EcIDH</i>	<i>EcSAND</i>	<i>EcUPL7</i>
R1	23.63	23.68	18.55	22.27	23.87	21.31	19.49	22.59	18.69	23.15	25.82
R1	23.63	23.63	18.40	22.11	23.96	21.18	19.45	22.53	18.62	23.01	25.53
R1	23.67	23.49	18.28	22.00	23.67	21.00	19.53	22.44	18.65	23.09	25.54
R2	23.82	23.79	18.30	22.17	23.71	20.92	20.37	22.43	19.40	22.26	25.35
R2	23.95	23.73	18.20	22.14	23.68	20.76	20.27	22.36	18.99	21.91	25.43
R2	23.83	23.68	18.07	21.90	23.61	20.76	20.32	22.18	19.39	22.15	25.27
R3	23.67	23.51	18.33	21.74	23.96	21.16	20.52	22.71	20.08	21.65	25.73
R3	23.52	23.48	18.15	21.57	23.90	20.93	20.34	22.41	19.79	21.58	25.46
R3	23.51	23.48	18.40	21.51	24.09	20.88	20.27	22.35	19.80	21.64	25.40
C1	23.77	22.92	17.46	20.73	23.29	20.36	19.62	21.76	18.96	22.17	24.84
C1	23.66	22.75	17.24	20.69	23.08	20.10	19.41	21.59	18.74	22.09	24.77
C1	23.57	22.73	17.19	20.68	22.97	20.21	19.29	21.59	19.16	21.88	24.91
C2	23.28	22.44	17.41	20.75	23.28	20.30	19.26	21.74	18.95	21.85	24.78
C2	23.36	22.32	17.41	20.82	23.23	20.09	19.33	21.62	19.02	21.75	24.66

C2	23.39	22.33	17.46	20.78	23.24	20.11	19.31	21.64	19.30	21.93	24.42
C3	23.39	22.66	17.50	20.96	23.50	20.61	19.28	21.80	19.28	21.92	24.76
C3	23.41	22.47	17.40	20.86	23.30	20.34	19.25	21.80	19.22	21.81	24.68
C3	23.41	22.39	17.38	20.81	23.34	20.34	19.24	21.63	19.17	21.76	24.59
F1	26.41	24.61	20.95	22.88	24.98	21.17	20.68	23.58	21.66	23.67	25.75
F1	26.35	24.33	20.93	22.97	24.92	20.97	20.67	23.90	21.52	23.62	25.54
F1	26.34	24.36	20.81	22.80	24.87	20.93	20.53	23.45	21.59	23.25	25.48
F2	25.49	24.04	19.99	22.51	24.36	20.97	20.21	22.75	21.70	23.45	25.21
F2	25.59	23.93	19.82	22.09	24.25	20.81	20.19	22.79	21.64	23.43	25.35
F2	25.64	23.93	19.80	21.96	24.29	20.77	19.96	22.70	21.77	23.27	25.20
F3	25.92	23.80	19.81	22.00	24.31	20.69	19.13	22.99	20.86	23.65	25.54
F3	25.84	23.85	19.75	22.02	24.11	20.75	19.13	22.80	20.10	23.56	25.41
F3	25.93	23.88	19.76	22.21	24.13	20.67	18.93	22.87	20.18	23.58	25.42
AF1	26.02	24.33	18.96	22.53	24.76	22.09	19.35	23.24	20.69	24.35	26.71
AF1	26.18	24.28	18.64	22.48	24.60	21.99	19.23	23.26	20.69	24.32	26.87
AF1	25.79	24.11	18.80	22.60	24.53	21.95	18.96	23.03	20.70	24.31	26.75
AF2	27.48	25.33	20.13	23.80	25.61	22.39	21.64	23.81	20.84	24.65	27.12
AF2	27.36	25.25	19.77	23.61	25.32	22.44	21.25	23.75	20.76	24.49	26.98

AF2	27.38	25.08	19.95	23.72	25.47	22.47	21.51	23.70	20.93	24.39	27.05
AF3	25.19	24.21	19.00	21.91	24.34	21.71	18.90	23.03	20.95	22.90	26.16
AF3	25.09	24.00	18.88	21.91	24.31	21.66	18.76	22.85	20.81	23.27	26.22
AF3	25.08	24.08	18.85	21.83	24.28	21.62	18.35	22.86	20.67	22.96	26.27

Table S3 Cycle of Quantification (Cq) for every samples and genes of the *Eucalyptus* plants infested with the *L. invasa* wasp. Each sample was composed by three biological replicates and one of them was run in technical triplicates. The letters S, L, and LA refer to Stem, Leaves, and Leaf apex, respectively. The numbers right after the letters representing the sample type refer to the number of the biological replicate. *Ec* = *Eucalyptus camaldulensis*.

SAMPLE	<i>EcEF1-α</i>	<i>EcPP2A-1</i>	<i>EcACT</i>	<i>EcTUB</i>	<i>EcPTB</i>	<i>EcUBP6</i>	<i>EcH2B</i>	<i>EcEUC12</i>	<i>EcIDH</i>	<i>EcSAND</i>	<i>EcUPL7</i>
C1	24.12	23.37	18.19	21.35	24.55	21.17	19.39	22.99	19.94	22.85	24.70
C1	24.05	23.34	17.90	21.18	24.13	20.99	19.17	22.76	19.81	22.62	24.57
C1	23.99	23.33	17.93	21.23	24.17	20.90	19.14	22.66	19.78	22.50	24.58
C2	23.83	22.90	17.86	21.16	24.08	20.86	19.05	22.63	19.53	22.52	24.54
C2	23.64	22.86	17.53	20.97	23.86	20.61	18.97	22.44	19.36	22.22	24.54
C2	23.73	22.85	17.56	20.88	23.83	20.52	18.88	22.28	19.32	22.28	24.71
C3	24.08	23.33	18.14	21.41	24.22	20.84	19.17	22.68	19.80	22.73	24.87
C3	23.95	23.12	18.13	21.32	24.12	20.75	19.07	22.56	19.75	22.61	24.86
C3	23.92	23.13	17.89	21.21	23.98	20.67	18.93	23.14	19.55	22.59	25.14
F1	24.67	23.37	19.42	21.57	24.36	20.73	19.56	22.52	20.26	22.44	24.65
F1	24.56	23.42	19.28	21.53	24.28	20.54	19.52	22.59	20.11	22.43	24.76
F1	24.55	23.41	19.24	21.41	24.29	20.55	19.48	22.57	20.00	22.41	24.80
F2	24.97	23.74	19.42	21.85	24.13	20.68	19.83	22.56	20.15	22.72	24.72

F2	24.81	23.54	19.36	21.73	23.93	20.50	19.67	22.63	20.15	22.58	24.74
F2	24.78	23.43	19.31	21.69	23.89	20.57	19.76	22.65	20.05	22.57	24.85
F3	25.89	24.78	20.61	22.79	25.03	21.34	21.09	23.48	21.05	23.46	25.82
F3	25.91	24.62	20.45	22.75	24.92	21.18	20.81	23.57	20.85	23.53	25.75
F3	25.79	24.54	20.42	22.65	24.70	21.08	20.92	23.51	20.82	23.36	25.75
AF1	27.67	25.84	21.68	24.34	26.36	22.99	21.11	24.26	22.81	24.95	27.43
AF1	27.45	25.88	21.22	24.00	26.14	22.73	21.95	24.35	22.64	24.75	27.32
AF1	27.52	25.70	21.26	24.01	26.10	22.72	21.75	24.19	22.62	24.75	27.41
AF2	28.96	26.36	22.45	25.26	26.85	23.84	23.03	25.25	23.62	25.73	28.19
AF2	29.50	26.50	22.34	24.91	26.96	23.53	22.58	25.06	23.54	25.70	27.88
AF2	28.31	26.74	22.24	24.95	26.74	23.49	22.59	25.13	23.41	25.55	28.17
AF3	30.31	27.34	24.39	26.95	27.97	24.63	24.45	26.80	25.01	27.21	29.70
AF3	30.66	27.19	24.35	26.86	27.92	24.43	24.28	26.41	24.82	27.23	29.62
AF3	30.13	27.66	24.21	26.65	27.88	24.47	24.26	26.21	24.75	27.10	29.49

Table S4 Cycle of Quantification (Cq) for every samples and genes of the *Eucalyptus* plants inoculated with the *B. bassiana* fungus. Each sample was composed by three biological replicates and one of them was run in technical triplicates. The letters S, L, and LA refer to Stem, Leaves, and Leaf apex, respectively. The numbers right after the letters representing the sample type refer to the number of the biological replicate. *Ec* = *Eucalyptus camaldulensis*.

SAMPLE	<i>EcEF1-α</i>	<i>EcPP2A-1</i>	<i>EcACT</i>	<i>EcTUB</i>	<i>EcPTB</i>	<i>EcUBP6</i>	<i>EcH2B</i>	<i>EcEUC12</i>	<i>EcIDH</i>	<i>EcSAND</i>	<i>EcUPL7</i>
C1	23.86	23.22	17.46	21.15	23.78	20.71	19.24	21.93	19.16	22.85	25.12
C1	23.86	23.22	17.65	21.00	23.57	20.57	19.19	21.95	18.82	22.73	25.14
C1	23.87	23.22	17.85	20.95	23.62	20.50	19.13	21.90	19.04	22.64	24.97
C2	23.80	23.36	17.81	21.06	23.73	20.95	18.64	22.00	19.68	22.42	24.30
C2	23.85	23.15	17.20	21.07	23.74	21.25	18.42	22.12	19.54	22.48	24.86
C2	23.91	23.20	17.50	20.94	23.73	20.79	18.20	22.31	19.83	22.36	24.68
C3	23.90	23.35	17.93	21.28	23.99	21.00	18.76	22.45	19.98	22.81	24.75
C3	23.96	23.12	17.26	21.16	23.90	21.11	18.71	22.37	19.71	22.73	24.69
C3	24.04	23.12	17.59	21.12	23.90	20.81	18.66	22.38	19.89	22.70	24.72
F1	24.74	23.22	19.28	21.44	23.70	20.54	19.60	22.55	18.55	21.92	24.49
F1	24.68	23.19	18.99	21.40	23.61	20.51	19.56	22.55	18.44	21.75	24.43
F1	24.58	23.11	19.13	21.41	23.99	20.52	19.55	22.60	18.66	21.97	24.34
F2	25.70	24.14	20.22	22.02	24.09	21.03	19.54	23.20	19.53	23.23	25.59

F2	25.64	23.97	20.04	22.02	24.25	20.85	19.77	23.13	19.48	23.27	25.51
F2	25.75	24.04	20.30	22.21	24.51	20.79	19.71	23.26	19.59	23.49	25.55
F3	25.45	23.82	19.98	21.86	23.88	20.81	19.32	23.28	19.50	22.63	25.68
F3	25.41	23.77	19.92	21.81	24.05	20.83	19.50	23.34	19.34	22.68	25.43
F3	25.45	23.48	20.07	21.97	24.29	20.83	19.19	23.33	19.66	22.74	25.18
AF1	24.93	23.34	18.57	21.40	23.75	21.52	17.88	22.44	20.89	22.97	24.85
AF1	24.23	23.25	18.44	21.44	23.86	21.56	17.96	23.43	20.63	22.92	24.81
AF1	24.29	23.19	18.48	21.43	24.02	21.47	17.66	22.51	20.81	22.81	24.90
AF2	24.32	23.34	18.65	21.22	23.86	21.36	19.12	22.38	19.71	22.61	24.51
AF2	24.27	23.32	18.47	21.22	23.71	21.40	18.76	22.22	19.50	22.60	24.51
AF2	24.29	23.22	18.47	21.16	23.94	21.43	18.72	22.19	19.71	22.42	24.51
AF3	24.47	23.34	18.78	21.56	24.02	21.66	18.80	22.57	19.52	23.16	25.85
AF3	24.48	23.48	18.54	21.51	23.84	21.44	18.35	22.51	19.43	22.96	25.71
AF3	24.50	23.48	18.60	21.48	24.36	21.54	18.21	22.35	19.62	22.99	25.76

Table S5 Cycle of Quantification (Cq) for every samples and genes of the *Eucalyptus* plants infested with the *L. invasa* wasp and inoculated with the *B. bassiana* fungus. Each sample was composed by three biological replicates and one of them was run in technical triplicates. The letters S, L, and LA refer to Stem, Leaves, and Leaf apex, respectively. The numbers right after the letters representing the sample type refer to the number of the biological replicate. *Ec* = *Eucalyptus camaldulensis*.

SAMPLE	<i>EcEF1-α</i>	<i>EcPP2A-1</i>	<i>EcACT</i>	<i>EcTUB</i>	<i>EcPTB</i>	<i>EcUBC6</i>	<i>EcH2B</i>	<i>EcEUC12</i>	<i>EcIDH</i>	<i>EcSAND</i>	<i>EcUPL7</i>
C1	29.57	27.10	22.55	25.66	27.07	23.33	23.96	25.76	22.91	26.19	29.08
C1	29.80	27.01	22.52	25.62	26.89	23.27	23.88	25.81	22.81	26.03	28.96
C1	29.68	27.15	22.31	25.44	26.87	23.15	23.86	25.77	22.70	25.79	28.75
C2	29.62	27.25	22.65	25.52	26.98	23.23	23.94	25.52	22.95	26.03	28.99
C2	29.55	26.96	22.49	25.37	26.74	22.94	23.85	25.57	22.78	25.66	29.15
C2	29.43	27.28	22.41	25.32	26.88	22.84	23.87	25.65	22.61	25.76	28.71
C3	26.18	24.58	19.11	21.87	23.23	21.53	20.81	23.41	20.18	23.71	26.29
C3	26.04	24.41	19.21	21.81	23.83	21.43	20.68	23.21	20.10	23.48	26.18
C3	25.96	24.88	19.01	21.73	23.53	21.30	20.69	23.21	19.93	23.42	25.96
F1	25.75	24.05	19.91	21.53	24.66	21.07	20.72	23.44	20.21	23.41	25.96
F1	25.82	24.00	19.68	21.47	24.42	20.85	20.50	23.19	19.86	23.28	25.74
F1	25.73	23.98	19.74	21.45	24.41	20.73	20.53	23.21	20.06	23.08	25.81
F2	26.73	25.75	21.69	24.03	26.18	20.08	21.75	24.84	21.58	24.69	27.28

F2	26.82	25.78	21.62	24.00	26.00	22.09	21.55	24.76	21.46	24.74	26.75
F2	26.87	25.83	21.65	24.00	25.82	21.94	21.49	24.64	21.55	24.71	27.08
F3	28.32	26.65	22.62	24.34	27.39	23.30	22.92	25.97	22.45	25.62	28.50
F3	28.40	26.66	22.62	24.32	26.98	23.29	22.82	25.69	22.40	25.53	28.47
F3	28.60	26.67	22.50	24.30	26.98	23.30	23.02	25.84	22.43	25.65	28.36
AF1	24.95	23.85	18.79	21.90	24.21	21.16	19.21	22.77	20.43	23.07	25.54
AF1	25.05	23.73	18.82	21.73	24.22	21.57	19.19	22.68	20.44	22.95	25.52
AF1	24.99	23.75	18.70	21.80	24.14	21.48	19.34	22.54	20.47	22.91	25.49
AF2	25.06	24.04	18.77	21.81	24.37	21.76	19.04	22.81	20.83	23.50	25.65
AF2	25.07	23.85	18.78	21.77	24.10	21.65	18.89	22.64	20.66	23.44	25.52
AF2	25.01	23.89	18.76	21.74	24.15	21.55	18.92	22.63	20.75	23.23	25.66
AF3	25.48	24.53	19.31	22.00	24.41	21.94	19.72	23.20	20.67	23.55	25.91
AF3	25.40	24.41	19.28	22.06	24.34	21.80	19.57	23.14	20.58	23.43	26.14
AF3	25.44	24.36	19.25	22.08	24.25	21.90	19.58	23.13	20.41	23.40	25.81

Supplementary S2

Detailed description of the RNA extraction protocol used for *Eucalyptus* tissues.

1° step: add 525 µL of extraction buffer [2% (p/v) CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), PVP 2% (p/v), Tris-HCL (100 mM), EDTA (25 mM), NaCl (20 mM)], 525 µL de TES [TRIS-HCL (10 Mm) pH 7,5, EDTA (10 mM) SDS (0,5%)], and 250 µL of β-mercaptoetanol for 100 ng of plant tissue;

2° step: mix the samples (vortex) for 45s and incubate them for one hour (mix samples every 10 min) at 65 °C;

3° step: add 700 µL of chloroform and mix (vortex) samples for 45s;

4° step: centrifuge samples for 10 min at 4 °C and 14,000 RPM;

5° step: transfer 800 µL of the top aqueous phase to a new 2 mL centrifuge tube (2 mL). Add 1 mL chloroform and mix (vortex) samples for 45s;

6° step: centrifuge samples for 10 min at 4 °C and 14,000 RPM;

Thereafter, for leaf apex:

7° step: transfer 400 µL of the top aqueous phase to a new 1.5 mL centrifuge tube, add 400 µL chlooroform, and mix (vortex) samples for 45s;

8° step: centrifuge samples for 10 min at 4 °C and 14,000 RPM;

9° step: transfer 150 µL of the supernatant to a new 1.5 mL centrifuge tube. Add 150 µL of isopropyl alcohol and mix samples by inversion (15 times);

Thereafter, for roots, stem and leaves:

7° step: tranfer 300 µL of the top aqueous phase to a new 1.5 mL centrifuge tube. Add 300 µL of isopropyl alcohol and mix samples by inversion (15 times);

After performing these specific steps for each plant tissue, the following steps were common for every tissue:

10° or 8° step: incubate samples for one hour at -20 °C;

11° or 9° step: centrifuge samples for 30 min at 4 °C and 14,000 RPM;

12° or 10° step: discard the supernatant and wash the pellet by adding 800 µL of 75 % ethanol;

13° or 11° step: centrifuge samples for 8 min at 4 °C and 14,000 RPM;

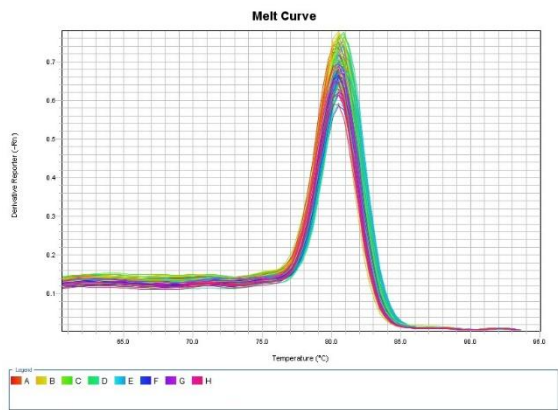
14° or 12° step: discard the ethanol and let the pellets dry (centrifuge tubes opened) for 5 min at 37 °C;

15° or 13° step: resuspend the pellets with 20 µL of RNase-free water.

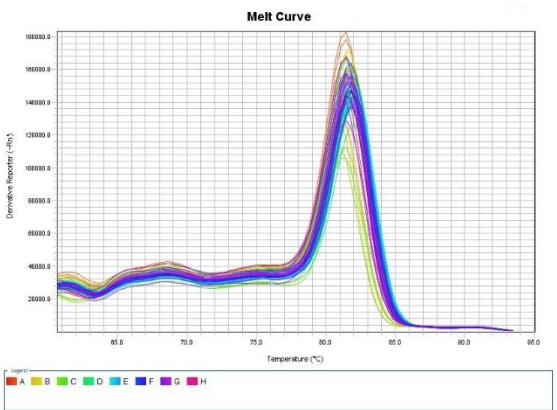
Supplementary S3

Figure S1 Melting curves of the candidate reference genes analyzed.

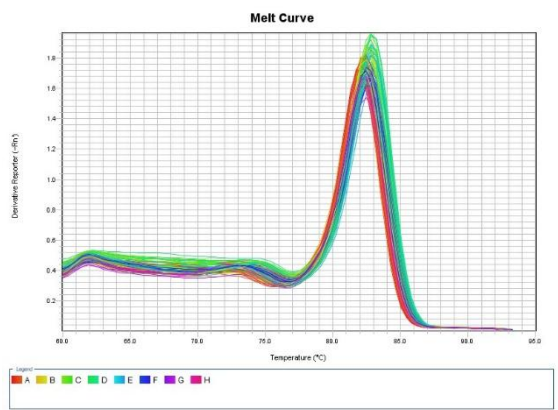
EcPP2A-1



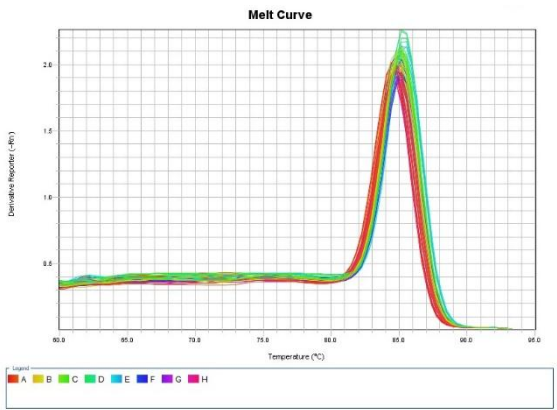
EcEF1-a



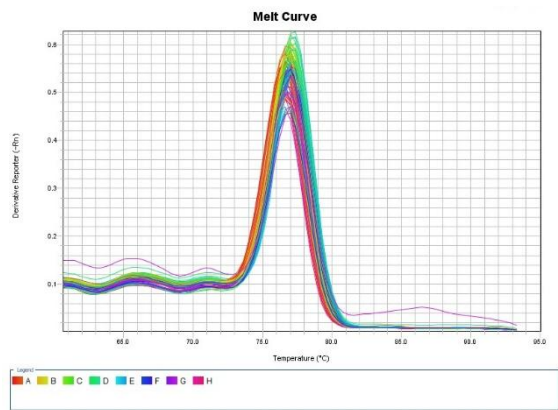
EcACT



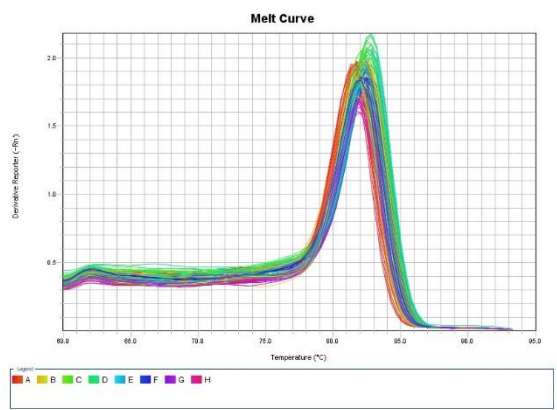
EcTUB



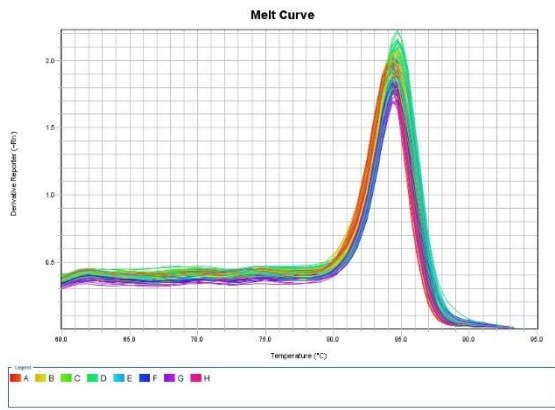
EcPTB



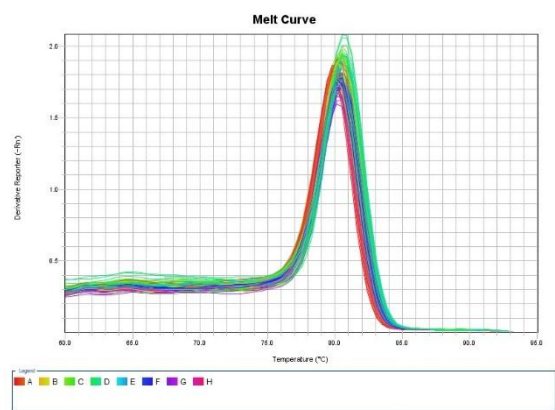
EcUBP6



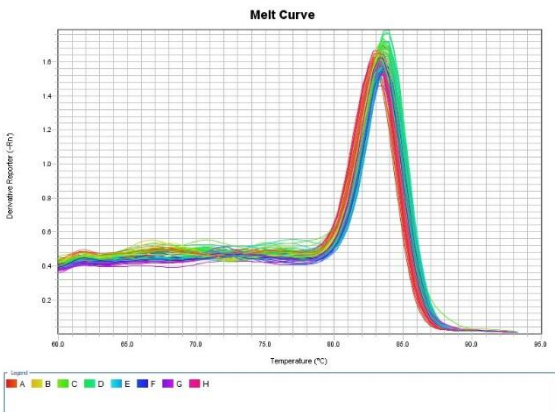
EcH2B



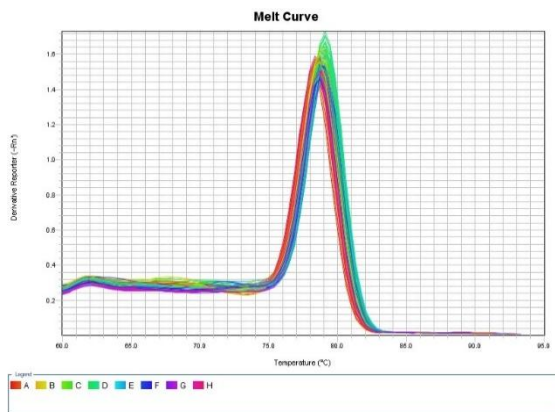
EcEUC12



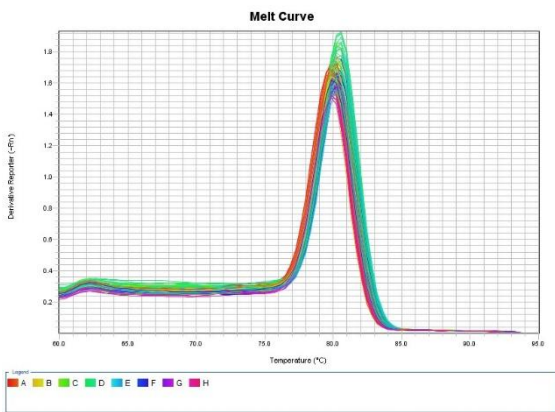
EcSAND



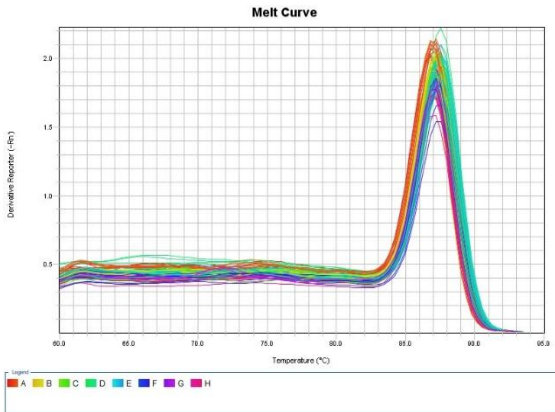
EcUPL7



EcIDH



EcDREB2



CAPÍTULO II

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL DOS GENES *ERF* E *PR* EM RESPOSTA AO
ATAQUE DA VESPA-DA-GALHA-DO-EUCALIPTO (*LEPTOCYBE INVASA*) EM
MUDAS DE EUCALIPTO INOCULADAS COM O FUNGO *BEAUVERIA BASSIANA***

Análise transcricional dos genes *ERF* e *PR* em resposta ao ataque da vespa-da-galha-do-eucalipto (*Leptocybe invasa*) em mudas de eucalipto inoculadas com o fungo *Beauveria bassiana*

Matheus Martins Daude^{1,2}; Solange Aparecida Ságio^{1,3}; João Pedro Laurindo Rocha⁴, Pedro Augusto Laurindo Rocha⁵, Máira Ignacio Sarmiento⁶; Antonio Chalfun-Junior⁷; Renato Almeida Sarmiento^{2,6}; Horllys Gomes Barreto^{*1,2,3}.

¹Laboratório de Análises Moleculares (LAM), Departamento de Ciências da Vida, Universidade Federal do Tocantins, Palmas, TO, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte, Universidade Federal do Tocantins, Palmas, TO, Brasil.

³Programa de Pós-Graduação em Agroenergia Digital, Universidade Federal do Tocantins, Palmas, TO, Brasil.

⁴Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG, Brasil

⁵Curso de graduação em Agronomia, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, TO, Brasil.

⁶Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais e Ambientais, Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, TO, Brasil.

⁷Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil

5 RESUMO

O cultivo de *Eucalyptus* L'Hér é essencial para a indústria madeireira, com o Brasil liderando a produção global. No entanto, desafios como pragas e mudanças climáticas afetam a sustentabilidade das plantações. A *Leptocybe invasa* é uma praga que induz galhas causando danos severos às plantas de eucalipto. Embora estratégias de controle tenham sido implementadas, o uso de genótipos tolerantes à seca foi inviabilizado devido à sua alta susceptibilidade à *L. invasa*, destacando a necessidade de abordagens integradas. O uso do fungo *Beauveria bassiana* tem mostrado potencial por conferir resistência às plantas contra essa praga. Além disso, estudos moleculares são fundamentais para entender os mecanismos de resposta genética das plantas ao ataque da *L. invasa*. Os genes da família *AP2/EREBP* desempenham um papel crucial na resposta das plantas a estresses, além de participarem das vias de transdução de sinal relacionadas a hormônios. Em eucalipto, o etileno é o principal hormônio de defesa contra a *L. invasa* nas fases iniciais após a infestação. A sinalização e interação entre fitormônios são fundamentais para ativar uma rede de fatores de transcrição (FTs) que regulam a expressão de genes relacionados à patogênese (*PR*). Os genes *ERF* são

FTs que atuam na defesa de plantas e, embora a maioria esteja associada a respostas a estresses abióticos, um pequeno grupo está envolvido nas respostas a estresses biótico, como os genes *ERF1*, *ORA59*, *ERF6* e *ERF96*. Os insetos galhadores, como a *L. invasa*, apesar de serem artrópodes herbívoros, estabelecem uma relação tão íntima com o hospedeiro que já foram comparados com patógenos. Nesse sentido, a análise dos genes de resposta à patogênese, bem como os fatores de transcrição que os regulam, pode ser um caminho promissor para compreender a resposta genética ao ataque da microvespa. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi analisar a expressão relativa, por RT-qPCR, dos genes *ERF* e *PR* em um híbrido de *E. tereticornis* x *E. camaldulensis* em diferentes condições experimentais. Os resultados das análises mostraram que, exceto para *EcERF6*, todos os genes apresentaram seus maiores níveis de expressão em ápice foliar de plantas infestadas com a *L. invasa*. A alta expressão dos genes *EcERF1*, *ERF96*, *EcORA59* e *EcPR4* no ápice foliar das plantas infestadas por *L. invasa* sugere uma resposta localizada e intensificada, possivelmente devido ao maior ataque do inseto nesse local. Além disso, a redução da expressão de todos os genes em plantas inoculadas com *B. bassiana* e subsequentemente infestadas por *L. invasa* indica um ganho de resistência da planta ao ataque da praga, corroborando com os dados da literatura. Essas descobertas fornecem uma base para investigações futuras sobre os mecanismos moleculares da defesa do eucalipto contra a *L. invasa*. Destaca-se a relevância dos genes *ERF* e *PR* nesse processo, indicando caminhos para estudos de melhoramento genético visando aumentar a resistência das plantas a esse estresse biótico. É relevante destacar que não foram encontrados estudos prévios sobre os perfis de expressão desses genes em resposta a esses estímulos específicos.

Palavras-chave: Patogênese, Expressão gênica, Espécie florestal, Resistência, RT-qPCR.

6 INTRODUÇÃO

O *Eucalyptus* L'Hér é o gênero florestal mais extensivamente cultivado no mundo e representa uma das principais fontes globais de madeira e amplamente cultivado para uso industrial (DE OLIVEIRA *et al.*, 2012; MOURA *et al.*, 2012; TAMAYO-PEÑA *et al.*, 2024). O Brasil se destaca como o maior produtor mundial de eucalipto e, em 2021, a cultura ocupou 7,53 milhões de ha (75,8%) do total de área plantada com árvores, contribuindo significativamente para a receita total de 244,6 bilhões de reais e gerando mais de 2 milhões de empregos (IBÁ, 2022). Assim, a importância econômica e socioeconômica dos recursos florestais tem impulsionado o crescimento do setor, embora a incidência de fatores bióticos, como pragas, e abióticos, como as alterações climáticas, ainda representem desafios a serem

superados (BOOTH, 2013; GONCALVES *et al.*, 2013; MOTA; BARBOSA; MARCHIORO, 2022; ROCHA *et al.*, 2020).

No Brasil, o aumento da demanda industrial por produtos florestais tem levado à expansão de florestas plantadas em regiões com restrições hídricas relativamente intensas. Essa prática tem resultado na redução da produtividade e no aumento da taxa de mortalidade das plantas devido à seca (HODECKER *et al.*, 2018). Diante desse cenário, a busca por genótipos mais tolerantes a estresses abióticos, como a seca, tem ganhado destaque, e as espécies *E. camaldulensis*, *E. teretinornis* e seus híbridos estão entre as variedades de eucalipto mais resistentes à escassez de água (GONÇALVES *et al.*, 2013). Além disso, os fatores bióticos também representam uma ameaça para as plantações de eucalipto (TESHOME; ZHARARE; NAIDOO, 2020). À medida que as áreas de florestas naturais diminuem e as plantações de eucalipto se expandem, a migração de pragas provocada pela globalização, a falta de inimigos naturais nas novas áreas associado às condições ambientais favoráveis, tem possibilitado a disseminação de insetos-pragas exóticos (PAINE; STEINBAUER; LAWSON, 2011; SILVA *et al.*, 2020).

A microvespa-da-galha do eucalipto, *Leptocybe invasa* (Fisher & LaSalle, 2004 Hymenoptera: Eulophidae), é um inseto-praga exótico que ingressou no Brasil e representa um fator biótico que impacta a sustentabilidade das plantações de eucalipto, especialmente dos híbridos de *E. camaldulensis* e *E. tereticornis* (MENDEL *et al.*, 2004). A *L. invasa* é uma praga que induz galhas, principalmente em mudas e plantios novos, ao longo das nervuras, em pecíolos de folhas jovens e nos entrenós dos ápices dos ramos, causando danos devastadores, como a aparência áspera das plantas, crescimento atrofiado e, em casos extremos, a morte (KUMARI *et al.*, 2010; MENDEL *et al.*, 2004; SARMENTO *et al.*, 2021). Embora estratégias de controle e manejo dessa praga tenham sido empregadas, a utilização de genótipos adaptados a diferentes condições climáticas, porém susceptíveis ao ataque da *L. invasa*, torna-se inviável em regiões com alta infestação (NUNES *et al.*, 2023). Nesse contexto, para enfrentar esse desafio, é essencial explorar estratégias integradas, como a associação planta-microrganismo, além de estudos genéticos.

Os estudos com fungos endofíticos, como o *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill, têm despertado interesse à sua capacidade de conferir resistência nas plantas contra insetos-praga, como a vespa-da-galha do eucalipto (BARON *et al.*, 2019; ROCHA *et al.*, 2023). O *B. bassiana* é um fungo entomopatogênico frequentemente usado como biopesticida em culturas agrícolas, devido à sua segurança ambiental, não apresentar risco à saúde humana e provocar mínimos efeitos adversos em organismos não-alvo (ZIMMERMANN, 2007). Em eucalipto, o uso do *B. bassiana* tem mostrado grande potencial para ser usado como agente de controle biológico de

L. invasa em genótipos tolerantes à seca, porém, susceptíveis a esta praga (ROCHA *et al.*, 2023).

Os estudos moleculares, assim como os voltados para o controle biológico, tem ganhado progressiva atenção devido as diversas possibilidades que oferecem para as investigações sobre o eucalipto (DAUDE *et al.*, 2024; NUNES *et al.*, 2023; ROCHA *et al.*, 2023). Nesse sentido, a análise de expressão gênica é um método importante para auxiliar no entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos por trás de diferentes processos biológicos (BRAZMA; VILO, 2000), como a resposta de defesa a inoculação do *B. bassiana* e a infestação da *L. invasa*. Entre os métodos empregados, a Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real com transcrição reversa (RT-qPCR) é amplamente utilizada para o estudo de processos biológicos em plantas (BARRETO *et al.*, 2019; DAUDE *et al.*, 2021; HUANG *et al.*, 2024) devido à sua rapidez, alta sensibilidade, reprodutibilidade e precisão quanto a determinação dos níveis de expressão gênica (FERNANDES-BRUM *et al.*, 2017; GACHON; MINGAM; CHARRIER, 2004; LUCHO *et al.*, 2018).

Os genes pertencentes à família AP2/EREBP (*APETALA2/Ethylene-Responsive Element Binding Proteins*) tem um papel crucial no crescimento, desenvolvimento e resposta a estresses em plantas, como temperaturas extremas, seca, alta salinidade e doenças (LIU; ZHANG, 2017). Além disso, esses genes participam de vias de transdução de sinal relacionadas a hormônios, incluindo o ácido abscísico (ABA), etileno (ET), citocininas e jasmonato (CHEN *et al.*, 2016; NAKANO *et al.*, 2006). Os fitormônios como o JA, ácido salicílico (SA), ET e ABA desempenham papel crucial na regulação de importantes vias de sinalização de defesa associadas a esses genes (BOUAZIZ *et al.*, 2015). Em eucalipto, o ET é o principal hormônio de defesa contra a *L. invasa* nas fases iniciais após a infestação, além de ser responsável pela modulação da defesa de plantas contra outros herbívoros e patógenos (BROEKGAARDEN *et al.*, 2015; SARMENTO, 2019). A sinalização e interação entre fitormônios são fundamentais para orquestrar as respostas de defesa das plantas (PIETERSE *et al.*, 2009, 2012), ativando uma rede de fatores de transcrição (FTs) que regulam a expressão de genes relacionados à patogênese (PR) (HUANG; CATINOT; ZIMMERLI, 2016).

O papel dos genes *ERF* (*Ethylene Response Factor*) na defesa de plantas parece ser conservado em todo o reino vegetal, agindo pela capacidade de se ligar ao DNA e a habilidade de ativar ou reprimir a transcrição (HUANG; CATINOT; ZIMMERLI, 2016). Embora, a maioria dos fatores de transcrição *ERF* estejam associados a respostas a estresses abióticos, um pequeno grupo está envolvido nas respostas a estresses bióticos (FENG *et al.*, 2005; GUTTERSON; REUBER, 2004; LICAUSI; OHME-TAKAGI; PERATA, 2013), como evidenciado pelos genes *ERF1* (*Ethylene Response Factor 1*), *ORA59* (*OCTADECANOIC-*

RESPONSIVE ARABIDOPSIS AP2/ERF59), *ERF6* (*Ethylene Response Factor 6*) e *ERF96* (*Ethylene Response Factor 96*) em *Arabidopsis thaliana*, conhecidos por regular a imunidade inata (HUANG; CATINOT; ZIMMERLI, 2016).

Os genes *PR* codificam proteínas em níveis basais ou não detectáveis em tecidos saudáveis e têm suas expressões aumentadas em condições de estresses bióticos, como ataques diretos de diferentes pragas (insetos e outros herbívoros) e patógenos (fungos, bactérias e vírus), bem como em respostas a ferimentos (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006; VAN LOON; VAN STRIEN, 1999). Esses genes desempenham um papel crucial na defesa natural de plantas, interagindo com diferentes sinalizadores de defesa, como os fitormônios AS, AJ e ET (HERNÁNDEZ *et al.*, 2005). Compreendendo cerca de 19 famílias (*PR-1* a *PR-19*), os genes *PR* codificam diferentes proteínas como quitinases, peroxidases, proteínas inativadoras de ribossomos, defensinas, entre outras (STINTZI *et al.*, 1993; ZRIBI; GHORBEL; BRINI, 2021). Essas proteínas, podem exercer efeitos diretos ou indiretos na resistência da planta contra microrganismos, inibindo o crescimento do patógeno e/ou a germinação de esporos, além de atuarem como agentes antimicrobianos, hidrolases, inibidores de proteinases e desempenharem outras atividades (JAIN; KHURANA, 2018; ZRIBI; GHORBEL; BRINI, 2021).

Os insetos galhadores de plantas, como a *L. invasa*, apesar de serem artrópodes herbívoros (STONE; SCHÖNROGGE, 2003), estabelecem uma relação tão íntima com o hospedeiro que alguns já foram comparados com patógenos (KALOSHIAN; WALLING, 2005). Nesse sentido, a análise dos genes de resposta à patogênese, bem como os fatores de transcrição que os regulam, pode ser um caminho promissor para compreender a resposta gênica ao ataque a microvespa. Por exemplo, em *Arabidopsis*, os genes *ERF1*, *ERF6* e *ORA59* têm sido associados à promoção da expressão de genes *PR*, como *PDF1.2* (*PLANT DEFENSIN 1.2*). Além disso, o gene *ERF96* ativa a expressão dos genes *PDF1.2*, *PR3* e *PR4* (HUANG; CATINOT; ZIMMERLI, 2016). Nesse contexto, o estudo transcricional dos genes *ERF* e *PR* pode proporcionar *insights* sobre quais genes estão envolvidos no mecanismo de resposta genética em eucalipto. Portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar a expressão relativa, por RT-qPCR, dos genes *ERF* e *PR* em um híbrido de *E. tereticornis* x *E. camaldulensis* (tolerante à seca e susceptível à *L. invasa*) em diferentes condições experimentais.

7 MATERIAL E MÉTODOS

7.1 MONTAGEM DO EXPERIMENTO

7.1.1 Área de estudo

O experimento de campo foi realizado na Estação Experimental de Pesquisa da Universidade Federal do Tocantins – UFT, no Câmpus Universitário de Gurupi (11°43' S e 49°04' O 284 m de altitude). O clima da região é do tipo Aw (clima tropical savânico, com uma estação quente e úmida e outra estação quente e seca), apresentando uma temperatura média anual de 26,1°C e uma pluviosidade de aproximadamente 1776,4 mm anuais.

7.1.2 Produção de mudas de *Eucalyptus*

As estacas enraizadas do clone híbrido de *Eucalyptus tereticornis* x *Eucalyptus camaldulensis* (VS058), susceptível à *Leptocybe invasa*, foram produzidas em casa de vegetação na Universidade Federal do Tocantins (UFT/Câmpus de Gurupi). Essas estacas, com idade de 120 dias, foram transplantadas de tubetes para vasos de 3,8 litros, contendo substrato comercial Bioplant® a base de casca de pinus, casca de arroz carbonizada, vermiculita, macronutrientes e micronutrientes. Após o transplante, as mudas foram aclimatadas em casa de vegetação por 30 dias. Em seguida, foram levadas para uma área a pleno sol, da Estação Experimental da UFT (Câmpus de Gurupi).

7.1.3 Preparo e inoculação do fungo *B. bassiana*

O fungo *B. bassiana* (Bals.) Vuill (cepa PL 63) foi obtido da coleção micológica do Laboratório de Simbioses Insetos-Microrganismos da UFT (Câmpus de Gurupi). As placas da coleção foram repicadas para novas placas contendo meio B.D.A. (Batata, Dextrose, Ágar), suplementado com amoxicilina (500µg.mL⁻¹) e mantidas em B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*) por um período de 12 dias a 25 °C ± 2°C e fotoperíodo de 12 horas.

Após esse período, as placas foram abertas em câmara de fluxo laminar e, sob condições assépticas, os esporos foram removidos das colônias. Essa etapa foi realizada adicionando 10 ml de água destilada e Tween 80® 0,02% (v/v), previamente autoclavado, com os esporos sendo gentilmente raspados com uma espátula esterilizada. Esses esporos foram transferidos para um béquer estéril contendo 100 ml de água destilada esterilizada. Esta solução foi agitada em uma incubadora com agitação orbital, a 150 rpm, durante 10 minutos, em temperatura ambiente. Após esse processo, a suspensão foi filtrada para um béquer autoclavado, através de uma dupla camada de gaze esterilizada, para reter os fragmentos de micélio e restos de meio de cultura. Uma alíquota dessa solução foi colocada em câmara de Neubauer para contagem de esporos

com auxílio de microscópio óptico. Em seguida, a concentração da solução foi ajustada para 108 esporos/ml com água destilada contendo Tween 80® a 0,02% (v/v) e autoclavada. A inoculação foi feita imediatamente após o preparo da solução. Para as plantas controle, foi utilizada uma solução autoclavada de água destilada contendo 0,02% (v/v) de Tween 80®. Da mesma solução, uma alíquota de 15 ml foi usada para realizar o teste de viabilidade com auxílio da câmera de Neubauer. Após o período de 48 horas, foi feito o teste de viabilidade, onde os conídios avaliados apresentaram viabilidade de 80%.

A epiderme adaxial da quarta, quinta e sexta folhas totalmente expandidas, de cada uma das plantas utilizadas no experimento, foi levemente lesionada com uma esponja macia. As pulverizações foram realizadas, especialmente, nas folhas lesionadas. Após a pulverização, seis ramos do terço superior de cada planta foram cobertos por sacos plásticos transparentes. Os sacos foram mantidos por um período de 36 horas (SIVIERO, 2001).

7.1.4 Criação e infestação de *Leptocybe invasa*

Os indivíduos de *L. invasa* utilizados neste trabalho foram obtidos de uma gaiola de criação (2,8m x 5,2m x 3,0m - altura x comprimento x largura). Para tanto, ramos com galhas próximas da emergência foram cortados de plantas de *Eucalyptus* (híbrido *E. tereticornis* x *E. camaldulensis*) da gaiola de criação. Após o corte dos ramos, eles foram levados imediatamente para o laboratório e colocados em um béquer com água destilada dentro de uma gaiola de bancada revestida por organza. Um recipiente com uma solução de água e mel foi colocado dentro da gaiola para alimentar os indivíduos de vespa que emergiram das galhas. A gaiola foi mantida no laboratório, a temperatura ambiente, por um período de 24 horas. Após esse período, os indivíduos que emergiram foram coletados com sugadores manuais e colocados em microtubos de centrifugação.

Aos 45 dias após a inoculação de *B. bassiana* em *Eucalyptus*, todas as plantas (inoculadas e não inoculadas), exceto as plantas controle e matriz, foram infestadas com *L. invasa*. Para isso, seis ramos de cada planta foram envoltos por uma sacola de organza contendo um microtubo de centrifugação de 2,0 ml fechado contendo dois indivíduos de *L. invasa* (SARMENTO *et al.*, 2021). Em seguida, os microtubos foram abertos para que as vespas pudessem sair para ovipositar. Após 48 horas de infestação, as sacolas e as vespas foram retiradas, e 48 horas após a remoção das sacolas e vespas, as amostras foram coletadas.

7.1.5 Coleta de material vegetal

As amostras consistiram em caules, folhas completamente expandidas e ápices foliares das mudas produzidas conforme descrito anteriormente. Essas amostras foram coletadas de plantas de cada tratamento, sendo: plantas controle (sem inoculação e sem infestação), plantas inoculadas com *B. bassiana*, plantas infestadas com *L. invasa* e plantas inoculadas com o *B. bassiana* e posteriormente infestadas por *L. invasa*. Três repetições biológicas foram utilizadas para cada tipo de amostra, sendo que as repetições biológicas consistiram em quatro plantas. As amostras foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, sendo posteriormente armazenadas a -80°C até a extração de RNA. As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Análises Moleculares (LAM) do Câmpus Palmas da Universidade Federal do Tocantins (UFT).

7.2 EXTRAÇÃO DE RNA

A extração de RNA foi realizada utilizando o método CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) (CHANG; PURYEAR; CAIRNEY, 1993) modificado por Gonçalves *et al.*, (2021) e com pequenas alterações (DAUDE *et al.*, 2024). Após a extração, a quantidade e a pureza do RNA (relações A260/A280 e A260/A230) foram determinadas por meio de um espectrofotômetro (Nanodrop® One Spectrophotometer), enquanto a integridade do RNA foi verificada utilizando gel de agarose (0,8%).

7.3 TRATAMENTO COM A DNase E SÍNTESE DE cDNA

As amostras de RNA (5µg) foram tratadas com DNase I, usando o kit *Turbo DNA-free* (Applied Biosystems) e seguindo as instruções do fabricante, para eliminar a contaminação residual de DNA. Posteriormente, o RNA foi avaliado quanto a sua quantidade e pureza (relações A260/A280 e A260/A230) por espectrofotometria (*Nanodrop® One Espectrophotometer*) e sua integridade foi analisada por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose (0,8%). O cDNA foi sintetizado a partir de 1,0 µg de RNA tratado livre de DNA usando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) seguindo o protocolo do fabricante. As amostras de cDNA foram armazenadas em freezer a -20 ° C.

7.4 IDENTIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS GÊNICAS

As sequências foram obtidas por meio da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search*; ALTSCHUL *et al.*, 1990) confrontando as sequências de nucleotídeos dos gene-alvo

da espécie *Eucalyptus grandis*, oriundas do banco de dados *Phytozome* (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>), contra o banco de dados *Eucalyptus camaldulensis* *Genome Database* (www.kazusa.or.jp/eucaly/index.html).

7.5 DESENHO DOS PRIMERS

Os *primers* para RT-qPCR foram desenhados a partir das sequências dos genes-alvo obtidas no banco de dados *Eucalyptus camaldulensis* *Genome Database* utilizando o programa *OligoPerfect* (apps.thermofisher.com/apps/oligoperfect/). A avaliação de qualidade dos *primers* desenhados foi realizada por meio da ferramenta *OligoAnalyzer* (www.idtdna.com/calc/analyzer). Os *primers* utilizados para os genes de referência foram descritos por Daude *et al.*, (2024).

Tabela 1 - Descrições das sequências dos primers para RT-qPCR, nome do gene, número de acesso, temperatura de *melting* (Tm), tamanho do *amplicon*, coeficiente de correlação (R²) e eficiência de amplificação (E%) dos genes analisados.

Gene	Número de acesso	Sequência do primer (5'-3')	Tm (°C)	Amplicon (bp)	R ²	E (%)
<i>EcERF1</i>	EcC019691.50	Fw: TGCTCCTCCTCAACCTCCTC Rv: AATCGTCCGTGCTGCAAGTG	61,1 °C 59,8 °C	113	1,00	100,0
<i>EcERF6</i>	EcC081223.10	Fw: AAGGTGGTGGAGTCCGATGC Rv: TCGCGTCATCACAGTCCCAA	61,9 °C 61,0 °C	88	0,99	98,0
<i>EcERF96</i>	EcC045072.10	Fw: CGGGCTGCGTACAACATGAG Rv: AGGAGGCGGCTGAAGAAGAG	60,3 °C 61,1 °C	94	0,99	91,6
<i>EcORA59</i>	EcC014511.10	Fw: ACTGGAGTCGGTGAGGAGGA Rv: CGCCTTCTCACACCTCGGTA	62,3 °C 61,3 °C	89	0,99	98,4
<i>EcPR4</i>	EcC034229.60	Fw: GCGTTGTTGCTTTGCCTTGC Rv: CGCTCACGGCATTCAAGTCC	59,9 °C 61,1 °C	118	0,99	98,2

7.6 RT-qPCR

As análises de RT-qPCR foram realizadas no termociclador *ABI PRISM 7500 RealTime PCR* (*Applied Biosystems*), utilizando o *PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix* (*Applied Biosystems*). As reações foram realizadas em um volume final de 10 µL: 1,0 µL de cDNA (diluído 1:5), 0,2 µL de cada primer a 10 µM, 5,0 µL de *PowerUp™ SYBR™ Green Master*

Mix e 3,6 µL de água livre de RNase-DNase. Três replicatas biológicas foram utilizadas, e as reações foram realizadas em triplicatas como repetições técnicas. As reações de amplificação foram conduzidas nas seguintes condições: 2 minutos a 50°C, 2 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Para confirmar a especificidade dos primers, curvas de *melting* foram geradas após 40 ciclos de amplificação para cada par de primers, elevando a temperatura de 60 a 95 °C, com um aumento de 1 °C a cada 5 segundos. O Cq foi determinado pelo número de ciclos nos quais a fluorescência gerada dentro de uma reação ultrapassa a linha de *threshold*. O modelo matemático proposto por Pfaffl foi utilizado para calcular a expressão relativa de todos os genes avaliados (PFAFFL, 2001). Os genes de referência utilizados foram *EcPP2A-1*, *EcSAND* e *EcEUC12* descrito por Daude *et al.*, (2024). Os gráficos de expressão relativa foram plotados usando o *SigmaPlot* (versão 12.0). O teste de média foi realizado segundo o teste de *Scott-Knott* ($p \leq 0.05$).

8 RESULTADOS

8.1 ANÁLISE DE EXPRESSÃO RELATIVA POR RT-QPCR

O perfil de expressão relativa dos genes *EcERF1* (Figura 1A), *EcERF6* (Figura 1B), *EcERF96* (Figura 1C), *EcORA59* (Figura 1D) e *EcPR4* (Figura 1E), avaliados nos tecidos de caule, folha e ápice foliar, de todos os tratamentos, está descrito na figura 1.

8.1.1 Gene *EcERF1*

O nível de expressão do gene *EcERF1* (Figura 1A) nas plantas controle foi semelhante nos tecidos de caule, folha e ápice foliar, sem diferenças significativas. Em plantas inoculadas com *B. bassiana*, a expressão relativa do gene *EcERF1* foi mais alta no caule, com uma média de expressão de 2,08, em comparação com o mesmo tecido nos outros tratamentos. Para plantas infestadas com *L. invasa*, o nível de expressão mais alto foi observado no ápice foliar, com um valor médio de 5,0, apresentando diferença significativa tanto em relação ao mesmo tecido nos outros tratamentos quanto aos demais tecidos no mesmo tratamento. Em plantas inoculadas com *B. bassiana* e posteriormente infestadas por *L. invasa*, os níveis de expressão foram baixos em todos os tecidos, não apresentando diferenças significativas. Por fim, entre todos os tratamentos e tecidos, o maior nível de expressão foi observado no ápice foliar das plantas infestadas por *L. invasa*.

8.1.2 Gene *EcERF6*

Os maiores níveis de expressão do gene *EcERF6* (Figura 1B) foram observados no caule, independentemente do tratamento aplicado. Em folha, os níveis de expressão mantiveram-se praticamente constantes em todos os tratamentos, sem diferença significativa. Similarmente, no ápice foliar, os níveis de expressão foram próximos em todos os tratamentos. Por outro lado, as plantas infestadas por *L. invasa* apresentaram expressão, aproximadamente, 10 vezes maior.

8.1.3 Gene *EcERF96*

O gene *EcERF96* (Figura 1C) apresentou baixa variação nos níveis de expressão entre todos os tecidos e tratamentos. Ao analisar individualmente cada tratamento, observa-se que nas plantas testemunhas, assim como nas inoculadas com *B. bassiana* e posteriormente infestadas por *L. invasa*, os níveis de expressão não apresentaram diferença significativa entre os tecidos. Nas plantas inoculadas com o *B. bassiana*, a expressão do gene *EcERF96* foi mais alta em caule quando comparado ao mesmo tecido dos demais tratamentos. O nível de expressão mais alto foi notado no ápice foliar das plantas infestadas por *L. invasa*, onde a expressão alcançou um valor médio de 7,0, sendo aproximadamente quatro vezes mais alta em relação aos demais tecidos. Comparando somente o ápice foliar em plantas infestadas pela *L. invasa* com os demais tratamentos, a valor de expressão é ainda maior, sendo quase 7 vezes mais expresso.

8.1.4 Gene *EcORA59*

O perfil de expressão do gene *EcORA59* (Figura 1D) foi semelhante tanto nas plantas testemunhas quanto nas inoculadas com *B. bassiana* e nas que foram posteriormente infestadas por *L. invasa* após a inoculação com *B. bassiana*. Os valores de expressão em caule, folha e ápice foliar foram próximos entre esses tratamentos, apresentando diferença significativa somente no tecido de caule das plantas inoculadas com o *B. bassiana* em comparação ao mesmo tecido dos outros tratamentos. Em relação às plantas infestadas por *L. invasa*, os maiores valores médios de expressão foram observados no ápice foliar, com aproximadamente 330,0. Em comparação com todos os tratamentos, a expressão do *EcORA59* no ápice foliar das plantas infestadas por *L. invasa* foi cerca de 300 vezes mais alta. Em termos de valores de expressão, o

EcORA59 foi o gene que apresentou a maior diferença de expressão quando comparado a todos os demais genes analisados.

8.1.5 Gene *EcPR4*

O maior nível de expressão do gene *EcPR4* (Figura 1E) foi observado no ápice foliar das plantas infestadas por *L. invasa*, com um valor médio de expressão de 63,27. Em comparação com o ápice foliar dos outros tratamentos, esse valor representa uma expressão 7,5 vezes maior. Nos demais tratamentos, o perfil de expressão foi semelhante, sem diferença significativa nas plantas testemunhas e as inoculadas com o *B. bassiana* e posteriormente infestadas pela *L. invasa*. Nas plantas inoculadas com o *B. bassiana* o tecido de caule apresentou diferença significativa quando comparado ao mesmo tecido dos outros tratamentos.

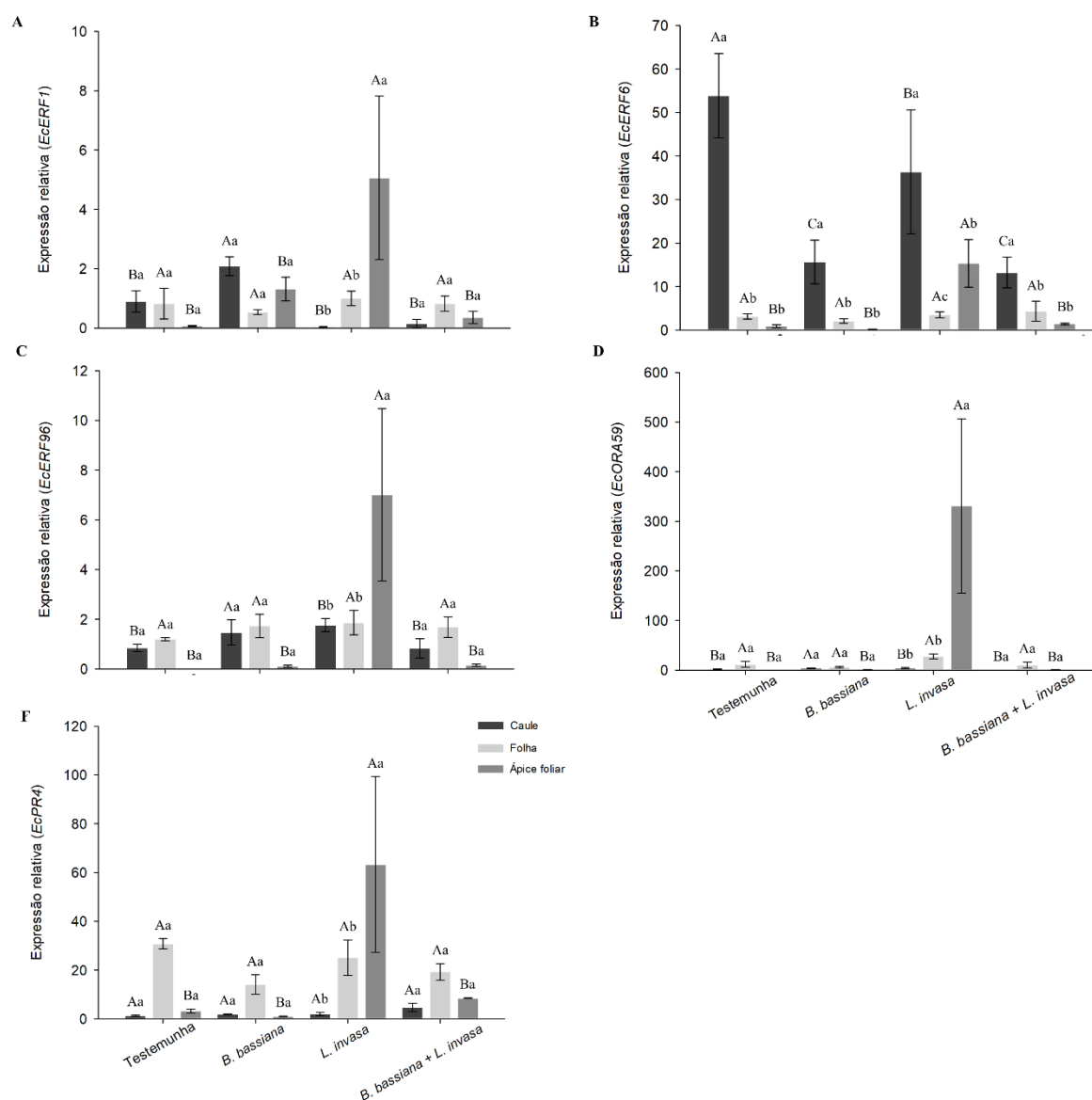


Figura 1. Padrão de expressão relativa de todos os genes analisados. A) *EcERF1*. B) *EcERF6*. C) *EcERF96*. D) *EcORA59*. E) *EcPR4*. As colunas representam a diferença na expressão gênica em relação a uma amostra calibradora. Para todos os genes, a amostra calibradora foi o caule (testemunha), exceto para o gene *EcERF6* que utilizou o ápice foliar (testemunha). Os níveis de expressão foram obtidos a partir de três replicatas biológicas e as barras de erro representam o desvio padrão entre essas replicatas. As médias com a mesma letra não são significativamente diferentes entre si, sendo letras maiúsculas usadas para comparar médias de expressão entre os tecidos e as letras minúsculas para comparar médias de expressão entre os tratamentos, segundo o teste de Scott-Knott ($p \leq 0.05$).

9 DISCUSSÃO

9.1 ANÁLISE DE EXPRESSÃO RELATIVA POR RT-QPCR

A ação dos FTs é caracterizada por dois fatores principais: sua capacidade de (I) se ligar ao DNA e (II) ativar ou reprimir a expressão (HUANG; CATINOT; ZIMMERLI, 2016). Os genes *ERF*, por meio do domínio *AP2/ERF*, são capazes de se ligar a sequências de DNA contendo regiões específicas contendo a sequência GCC (AGCCGCC) (HAO; OHME-TAKAGI; SARAI, 1998). Estas regiões geralmente são conservadas nas regiões promotoras de genes *PR* induzidos por JA e ET (BROWN *et al.*, 2003; OHME-TAKAGI'; SHINSHI, 1995; VAN DER DOES *et al.*, 2013). No entanto, a ativação de uma rede FTs, como os genes *ERF*, que regulam a expressão de genes *PR* (HUANG; CATINOT; ZIMMERLI, 2016), está diretamente ligada à sinalização e interação entre diferentes fitormônios, como ET, AJ, AS e ABA, fundamentais para organizar as respostas de defesa das plantas (BROEKGAARDEN *et al.*, 2015; PIETERSE *et al.*, 2009, 2012). Em eucalipto, o ET é o principal hormônio de defesa contra a *L. invasa* na fase inicial após a infestação, sendo também responsável pela modulação da defesa das plantas contra outros herbívoros e patógenos (BROEKGAARDEN *et al.*, 2015; SARMENTO, 2019). Entretanto, a análise dos fatores de transcrição *ERF* e dos genes *PR* em resposta à inoculação do *B. bassiana* e ao ataque da *L. invasa* ainda é escassa, tornando os resultados descobertas valiosas para o melhor entendimento do envolvimento desses genes no processo de defesa.

9.1.1 Gene *EcERF1*

A expressão observada no ápice foliar, que foi quatro vezes maior em plantas infestadas pela *L. invasa* (Figura 1A), sugere uma resposta específica do hospedeiro que parece se restringir aos tecidos diretamente afetados, uma vez que o inseto ataca, preferencialmente, as folhas novas em formação (ápice foliar) (MENDEL *et al.*, 2004; SARMENTO *et al.*, 2022). Em *Arabidopsis*, o gene *ERF1* foi o primeiro identificado a participar da via de sinalização de

ET, onde desempenha um papel promotor na expressão de genes de defesa induzidos por ET, como o *PDF1.2* e *PR3* (LORENZO *et al.*, 2003; SOLANO *et al.*, 1998). Considerando a função do gene *ERF1* na indução desses genes de resposta a patógenos (HUANG; CATINOT; ZIMMERLI, 2016), a maior expressão observada nesse tecido é justificada, uma vez que o aumento da expressão gênica parece ser crucial para a planta responder eficazmente ao estresse biótico. Essa resposta pode incluir a inibição do crescimento microbiano e o aumento da resistência a patógenos necrotróficos, como observado em estudos anteriores com *Arabidopsis* (BERROCAL-LOBO; MOLINA, 2004; BERROCAL-LOBO; MOLINA; SOLANO, 2002; SOLANO *et al.*, 1998). Além disso, em outras espécies, como trigo, estudos tem mostrado a influência do gene *ERF1* na expressão de genes relacionados a patógenos e no processo de defesa em plantas (ZHU *et al.*, 2014).

Contrastando com o ápice foliar em plantas infestadas apenas pela *L. invasa*, o tecido atacado pelo mesmo inseto, mas que foi inoculado previamente com *B. bassiana* não mantém o nível de expressão elevado. Isso pode estar relacionado ao fungo *B. bassiana* promover a resistência do eucalipto ao ataque da *L. invasa*, como observado por Rocha *et al.*, (2023), o que justificaria um nível de expressão menor mesmo a planta sob ataque. Esta alteração na expressão reforça o papel do gene *ERF1* no mecanismo de defesa da planta contra o ataque da vespa e corrobora que a inoculação com o fungo *B. bassiana* pode efetivamente conferir resistência ao eucalipto (NUNES *et al.*, 2023; ROCHA *et al.*, 2023), como indicado por um menor nível de expressão, que sugere uma resposta reduzida ao ataque devido à ação do fungo.

9.1.2 Gene *EcERF6*

Entre todos os genes analisados, o *EcERF6* apresentou o perfil de expressão mais distinto (Figura 1B). Enquanto a maior expressão dos outros genes foi observada no ápice foliar das plantas infestadas pela *L. invasa* (Figura 1), o *EcERF6* exibiu seus maiores níveis de expressão no caule. Esse perfil de expressão pode estar relacionado ao fato de o gene *ERF6* desempenhar um papel não apenas na imunidade das plantas (MOFFAT *et al.*, 2012; WARMERDAM *et al.*, 2019), mas também na resposta das plantas a estresses abióticos, como estresses oxidativos, de seca, osmóticos e luminosos (DUBOIS *et al.*, 2013; SEWELAM *et al.*, 2013; SKIRYCH *et al.*, 2011; VOGEL *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2013). Além disso, diferentemente de outros FTs, como o *ERF1* e o *ORA59*, a expressão de *ERF6* induzida por patógenos é independente de ET, o que pode justificar o motivo pelo qual o gene *EcERF6* apresenta as maiores expressões em tecidos não atacados pelo inseto.

No entanto, ao focar somente no ápice foliar, observa-se um aumento de expressão quando a planta está sob o ataque da vespa, podendo indicar o envolvimento do gene na resposta ao ataque da vespa. Em *Arabidopsis*, a expressão do gene *ERF6* resultou em um aumento significativo da resistência ao fungo necrófito *Botrytis cinérea* (MOFFAT *et al.*, 2012). Além disso, o *ERF6* regula a suscetibilidade de *Arabidopsis* a *Meloidogyne incógnita*, um nematóide que parasita as raízes e é capaz de induzir galhas (WARMERDAM *et al.*, 2019) similares as induzidas pela *L. invasa*.

9.1.3 Gene *EcERF96*

O gene *EcERF96* foi mais expresso no ápice foliar das plantas infestadas por *L. invasa*, apresentando uma expressão aproximadamente sete vezes maior em comparação com o ápice foliar dos outros tratamentos (Figura 1C). Esse resultado corrobora com os estudos disponíveis na literatura, considerando o papel do ET na indução dos genes *ERF* (HUANG; CATINOT; ZIMMERLI, 2016) e a ativação da via do ET nas fases iniciais após a infestação (BROEKGARDEN *et al.*, 2015; SARMENTO, 2019). Em *Arabidopsis*, por exemplo, observou-se um aumento da expressão do gene *ERF96* quando a planta foi tratada com um precursor de ET, o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), e a superexpressão do gene *ERF96* aumentou a resistência da planta a patógenos necrotróficos, como o fungo *Botrytis cinerea* e a bactéria *Pectobacterium carotovorum*. Esse aumento da resistência, quando o *ERF96* é superexpressado, está correlacionado com a indução de genes *PR* dependentes de JA/ET, como *PDF1.2*, *PR3* e *PR4*, uma vez que o gene *ERF96* se liga às regiões promotoras desses genes *PR* dependentes de JA/ET, provavelmente por meio dos elementos GCC presentes em seus promotores (CATINOT *et al.*, 2015).

9.1.4 Gene *EcORA59*

O gene *EcORA59* mostrou alta expressão no ápice foliar das plantas infestadas por *L. invasa*, sendo cerca de 300 vezes maior em comparação com outros tecidos analisados. Dentre todos os genes avaliados, o *EcORA59* destacou-se com a maior expressão (Figura 1D). Essa elevada expressão pode ser atribuída a função crucial do *ORA59* como principal integrador das vias de sinalização de JA e ET, que regulam a expressão de *PDF1.2* e, consequentemente, a defesa da planta contra patógenos necrotróficos (HUANG; CATINOT; ZIMMERLI, 2016). A análise com mutantes de *ORA59* revelaram que o gene é essencial para induzir a expressão de genes *PDF* (*PLANT DEFENSIN*) após o ataque do patógeno fúngico *Colletotrichum tropicale*.

Os ensaios de inoculação com *Alternaria brassicicola* também mostraram que o *ORA59* está envolvido na resistência da planta após a invasão do patógeno (KOSAKA *et al.*, 2020).

A expressão de *ORA59* é controlada pelas vias de transdução de sinal de JA e ET e, similarmente ao *ERF1*, a superexpressão de *ORA59* resulta no aumento da resistência, enquanto o silenciamento de *ORA59* em *Arabidopsis* aumenta a suscetibilidade ao fungo *B. cinerea* (PRÉ *et al.*, 2008). O fenótipo de resistência está associado a capacidade do *ORA59* se ligar ao promotor de *PDF1.2* e ativar diretamente sua transcrição (ZAREI *et al.*, 2011). Além disso, o promotor do *ORA59* tem uma sequência GCC, que é uma região de ligação para *ERF96* (CATINOT *et al.*, 2015), e provavelmente para outros genes *ERFs* (ÇEVIK *et al.*, 2012).

9.1.5 Gene *EcPR4*

Os genes *PR* são regulados por uma rede FTs (HUANG; CATINOT; ZIMMERLI, 2016), que são ativados pela sinalização e interação entre diferentes fitormônios (PIETERSE *et al.*, 2009, 2012). Segundo a literatura, o *ERF96* está envolvido na indução de genes *PR* dependentes de JA/ET, como *PR4*, uma vez que se liga às regiões promotoras desses genes, provavelmente por meio da sequência GCC (CATINOT *et al.*, 2015). Em nosso estudo, essa possível relação de regulação entre o *ERF96* e *PR4* foi evidenciada pelos perfis de expressão gênica observados. O gene *EcERF96*, assim como o gene *PR4*, apresentou o maior nível de expressão no ápice foliar das plantas infestadas por *L. invasa* (Figura 1C). Esses resultados sugerem, conforme descrito na literatura, que o aumento de expressão do gene *ERF96* está diretamente ligado ao aumento de expressão do gene *PR4*.

O gene *PR4* tem sido associado ao mecanismo de defesa plantas contra o ataque de patógenos (AGRAWAL *et al.*, 2003), uma vez que, durante a interação planta-patógeno necrotrófico, a via de sinalização JA/ET é ativada, induzindo a expressão de genes *PR*, entre os quais inclui o *PR4* (ALI *et al.*, 2017). Os resultados obtidos para o gene *EcPR4* sugerem o envolvimento deste gene na resposta ao ataque *L. invasa*. Embora esta praga seja um inseto galhador de plantas (STONE; SCHÖNROGGE, 2003), a literatura indica que a relação entre o inseto e o hospedeiro pode ser equiparada à interação planta-patógeno, considerando os danos que o inseto pode causar durante sua alimentação e formação de galhas (KALOSHIAN; WALLING, 2005).

10 CONCLUSÃO

Os resultados revelam padrões específicos de expressão para cada gene e tecido, destacando o papel crucial dos fatores de transcrição *ERF* e dos genes *PR* na resposta de defesa das plantas. Em particular, a alta expressão dos genes *EcERF1*, *ERF96*, *EcORA59* e *EcPR4* no ápice foliar das plantas infestadas por *L. invasa* sugere uma resposta localizada e intensificada, possivelmente devido ao maior ataque do inseto nesse tecido. Além disso, a redução da expressão de todos os genes em plantas inoculadas com *B. bassiana* e subsequentemente infestadas por *L. invasa* indica um ganho de resistência da planta ao ataque da praga, corroborando com estudos descritos na literatura.

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, G. K. *et al.* Isolation of a novel rice *PR4* type gene whose mRNA expression is modulated by blast pathogen attack and signaling components. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 81–90, 2003.
- ALI, S. *et al.* Isolation and molecular characterization of pathogenesis related *PR2* gene and its promoter from *Brassica juncea*. **Biologia Plantarum**, v. 61, n. 4, p. 763–773, 2017.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.
- BARON, N. C. *et al.* Filamentous fungi in biological control: current status and future perspectives. **Chilean journal of agricultural research**, v. 79, n. 2, p. 307–315, 2019.
- BARRETO, H. G. *et al.* Transcriptional profiling of the AFL subfamily of B3-type transcription factors during the in vitro induction of somatic embryogenesis in the model legume *Medicago truncatula*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 139, n. 2, p. 327–337, 2019.
- BERROCAL-LOBO, M.; MOLINA, A. *Ethylene Response Factor 1* mediates *Arabidopsis* resistance to the soilborne fungus *Fusarium oxysporum*. **MPMI**, v. 17, n. 7, p. 763–770, 2004.
- BERROCAL-LOBO, M.; MOLINA, A.; SOLANO, R. Constitutive expression of *Ethylene-Response-Factor1* in *arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. **Plant Journal**, v. 29, n. 1, p. 23–32, 2002.

BOOTH, T. H. Eucalypt plantations and climate change. **Forest ecology and management**, v. 301, p. 28–34, 2013.

BOUAZIZ, D. *et al.* Identification and functional characterization of ten *AP2/ERF* genes in potato. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 123, n. 1, p. 155–172, 2015.

BRAZMA, A.; VILO, J. Gene expression data analysis. **FEBS letters**, v. 480, n. 1, p. 17–24, 2000.

BROEKGAARDEN, C. *et al.* Ethylene: Traffic controller on hormonal crossroads to defense. **Plant Physiology**, v. 169, n. 4, p. 2371–2379, 2015.

BROWN, R. L. *et al.* A role for the GCC-box in jasmonate-mediated activation of the *PDF1.2* gene of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 132, n. 2, p. 1020–1032, 2003.

CATINOT, J. *et al.* *ETHYLENE RESPONSE FACTOR 96* positively regulates *Arabidopsis* resistance to necrotrophic pathogens by direct binding to GCC elements of jasmonate - and ethylene-responsive defence genes. **Plant Cell and Environment**, v. 38, n. 12, p. 2721–2734, 2015.

ÇEVIK, V. *et al.* *MEDIATOR25* acts as an integrative hub for the regulation of jasmonate-responsive gene expression in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 160, n. 1, p. 541–555, 2012.

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant molecular biology reporter**, v. 11, n. 2, p. 113–116, 1993.

CHEN, L. *et al.* Expansion and stress responses of *AP2/EREBP* superfamily in *Brachypodium Distachyon*. **Scientific Reports 2016 6:1**, v. 6, n. 1, p. 1–14, 2016.

DAUDE, M. M. *et al.* Molecular analysis of *ERF* subfamily genes during coffee somatic embryogenesis. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 57, p. 128–142, 2021.

DAUDE, M. M. *et al.* Reference genes for *Eucalyptus* spp. under *Beauveria bassiana* inoculation and subsequently infestation by the galling wasp *Leptocybe invasa*. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, 2024.

DE OLIVEIRA, L. A. *et al.* Reference genes for the normalization of gene expression in eucalyptus species. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, n. 2, p. 405–422, 2012.

DUBOIS, M. *et al.* *ETHYLENE RESPONSE FACTOR6* acts as a central regulator of leaf growth under water-limiting conditions in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 162, n. 1, p. 319–332, 2013.

FENG, J. X. *et al.* An Annotation update via cDNA sequence analysis and comprehensive profiling of developmental, hormonal or environmental responsiveness of the *Arabidopsis* *AP2/EREBP* transcription factor gene family. **Plant Molecular Biology**, v. 59, n. 6, p. 853–868, 2005.

FERNANDES-BRUM, C. N. *et al.* A panel of the most suitable reference genes for RT-qPCR expression studies of coffee: screening their stability under different conditions. **Tree Genetics & Genomes**, v. 13, n. 6, p. 131, 2017.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 402, p. 1445–1454, 2004.

GONÇALVES, J. L. DE M. *et al.* Integrating genetic and silvicultural strategies to minimize abiotic and biotic constraints in Brazilian eucalypt plantations. **Forest Ecology and Management**, v. 301, p. 6–27, 2013.

GONÇALVES, R. C. *et al.* Evaluation of extraction methods for obtaining high-quality RNA from sweet potato. **Genetics and Molecular Research**, v. 20, n. 4, 2021.

GUTTERSON, N.; REUBER, T. L. Regulation of disease resistance pathways by *AP2/ERF* transcription factors. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, n. 4, p. 465–471, 2004.

HAO, D.; OHME-TAKAGI, M.; SARAI, A. Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plant. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 41, p. 26857–26861, 9 out. 1998.

HERNÁNDEZ, I. *et al.* Proteins and peptides for the control of phytopathogenic fungi. **Biotecnología Aplicada**, v. 22, p. 256–260, 2005.

HODECKER, B. E. R. *et al.* Water availability preceding long-term drought defines the tolerance of *Eucalyptus* to water restriction. **New Forests**, v. 49, n. 2, p. 173–195, 2018.

HUANG, F. *et al.* Investigation of heat stress responses and adaptation mechanisms by integrative metabolome and transcriptome analysis in tea plants (*Camellia sinensis*). **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 10023, 2024.

HUANG, P. Y.; CATINOT, J.; ZIMMERLI, L. Ethylene response factors in *Arabidopsis* immunity. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 5, p. 1231–1241, 2016.

IBÁ – Indústria Brasileira de Árvores. **Relatório Anual 2022**. Disponível em: < <https://www.iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-anual-iba2022-compactado.pdf> >. Acesso em: 21 maio. 2022.

JAIN, D.; KHURANA, J. P. Role of *pathogenesis-related (PR)* proteins in plant defense mechanism. **Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction**, p. 265–28, 2018.

KALOSHIAN, I.; WALLING, L. L. Hemipterans as plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 491–521, 2005.

KOSAKA, A. *et al.* Plant defensin expression triggered by fungal pathogen invasion depends on *EDR1* protein kinase and *ORA59* transcription factor in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Signaling and Behavior**, v. 15, n. 12, 2020.

KUMARI, N. K. *et al.* Biology of eucalyptus gall wasp, *Leptocybe invasa* Fisher and La Salle (Hymenoptera: Eulophidae). **Karnataka Journal of Agricultural Sciences**, v. 23, n. 1, p. 211–212, 2010.

LICAUSI, F.; OHME-TAKAGI, M.; PERATA, P. *APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF)* transcription factors: mediators of stress responses and developmental programs. **The New phytologist**, v. 199, n. 3, p. 639–649, 2013.

LIU, C.; ZHANG, T. Expansion and stress responses of the *AP2/EREBP* superfamily in cotton. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 1–16, 2017.

LORENZO, O. *et al.* *ETHYLENE RESPONSE FACTOR1* integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. **Plant Cell**, v. 15, n. 1, p. 165–178, 2003.

LUCHO, S. R. *et al.* Validation of reference genes for RT-qPCR studies in *Stevia rebaudiana* in response to elicitor agents. **Physiology and molecular biology of plants**, v. 24, n. 5, p. 767–779, 2018.

MENDEL, Z. *et al.* Taxonomy and biology of *Leptocybe invasa* gen. & sp. n. (Hymenoptera: Eulophidae), an invasive gall inducer on *Eucalyptus*. **Australian Journal of Entomology**, v. 43, n. 2, p. 101–113, 2004.

MOFFAT, C. S. *et al.* *ERF5* and *ERF6* play redundant roles as positive regulators of JA/Et-mediated defense against *Botrytis cinerea* in arabidopsis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, 2012.

MOTA, J. S.; BARBOSA, L. R.; MARCHIORO, C. A. Suitable areas for invasive insect pests in Brazil and the potential impacts for eucalyptus forestry. **Pest Management Science**, v. 78, n. 6, p. 2596-2606, 2022.

MOURA, J. C. M. S. *et al.* Validation of reference genes from *Eucalyptus* spp. under different stress conditions. **BMC Research Notes**, v. 5, 2012.

NAKANO, T. *et al.* Genome-Wide analysis of the *ERF* gene family in *Arabidopsis* and rice. **Plant Physiology**, v. 140, n. 2, p. 411–432, 2006.

NUNES, T. V. *et al.* Endophytic development of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* reduced the development of galls and adult emergence of *Leptocybe invasa* in susceptible *Eucalyptus*. **Sustainability**, v. 15, n. 23, p. 16411, 2023.

OHME-TAKAGI, M.; SHINSHI, H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. **The Plant Cell**, v. 7, p. 173–182, 1995.

PAINE, T. D.; STEINBAUER, M. J.; LAWSON, S. A. Native and exotic pests of eucalyptus: A worldwide perspective. **Annual Review of Entomology**, v. 56, p. 181–201, 2011.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. e45–e45, 2001.

PIETERSE, C. M. J. *et al.* Networking by small-molecule hormones in plant immunity. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 5, p. 308–316, 2009.

PIETERSE, C. M. J. *et al.* Hormonal modulation of plant immunity. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 28, p. 489–521, 2012.

PRÉ, M. *et al.* The AP2/ERF domain transcription factor *ORA59* integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. **Plant Physiology**, v. 147, n. 3, p. 1347–1357, 2008.

ROCHA, J. P. L. *et al.* Morphophysiological responses in *Eucalyptus* demonstrate the potential of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to promote resistance against the galling wasp *Leptocybe invasa*. **Forests**, v. 14, n. 7, p. 1349, 2023.

ROCHA, S. M. G. *et al.* Influence of climatic variations on production, biomass and density of wood in eucalyptus clones of different species. **Forest Ecology and Management**, v. 473, p. 118290, 2020.

SARMENTO, M. I. **Respostas fisiológicas e metabólicas para a seleção precoce de *Eucalyptus* spp. tolerantes à seca e pragas.** 2019. 118 f. Tese (Doutorado em Biologia e Ecologia das Alterações Globais) - Universidade de Aveiro, Aveiro, 2019.

SARMENTO, M. I. *et al.* Differential development times of galls induced by *Leptocybe invasa* (Hymenoptera: Eulophidae) reveal differences in susceptibility between two *Eucalyptus* clones. **Pest Management Science**, v. 77, n. 2, p. 1042–1051, 2021.

SARMENTO, R. A. *et al.* First report of *Leptocybe invasa* Fischer & Lasalle (Hymenoptera: Eulophidae) in the southern Tocantins, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, 2022.

SEWELAM, N. *et al.* Ethylene Response Factor 6 is a regulator of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.

SILVA, P. H. M. *et al.* Susceptibility of eucalypt taxa to a natural infestation by *Leptocybe invasa*. **New Forests**, v. 51, p. 753-763, 2020.

SIVIERO, A. **Avaliação de métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica* e mapeamento de QTLs de resistência em híbridos de *Citrus sunki* vs. *Poncirus trifoliata* a gomose.** 2001. 114 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

SKIRYCZ, A. *et al.* Pause-and-stop: The effects of osmotic stress on cell proliferation during early leaf development in *Arabidopsis* and a role for ethylene signaling in cell cycle arrest. **Plant Cell**, v. 23, n. 5, p. 1876–1888, 2011.

SOLANO, R. *et al.* Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by *ETHYLENE-INSENSITIVE3* and *ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1*. **Genes & Development**, v. 12, p. 3703–3714, 1998.

STINTZI, A. *et al.* Plant “pathogenesis-related” proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, p. 687–706, 1993.

STONE, G. N.; SCHÖNROGGE, K. The adaptive significance of insect gall morphology. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 18, n. 10, p. 512–522, 2003.

TAMAYO-PENÑA, J. A. *et al.* *Eucalyptus grandis* Forestry Residue Valorization: Distinct and Integrated Pretreatment Methods for Enhanced Xylooligosaccharide Production. **BioEnergy Research**, p. 1-19, 2024.

TESHOME, D. T.; ZHARARE, G. E.; NAIDOO, S. The threat of the combined effect of biotic and abiotic stress factors in forestry under a changing climate. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 2020.

VAN DER DOES, D. *et al.* Salicylic acid suppresses jasmonic acid signaling downstream of SCFCOI1-JAZ by targeting GCC promoter motifs via transcription factor *ORA59*. **Plant Cell**, v. 25, n. 2, p. 744–761, 2013.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, p. 135–162, 2006.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of *PR-1* type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 85–97, 1999.

VOGEL, M. O. *et al.* Fast retrograde signaling in response to high light involves metabolite export, *MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE6*, and AP2/ERF transcription factors in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 26, n. 3, p. 1151–1165, 2014.

WANG, P. *et al.* The MPK6-ERF6-ROS-responsive cis-acting element7/GCC box complex modulates oxidative gene transcription and the oxidative response in arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 161, n. 3, p. 1392–1408, 2013.

WARMERDAM, S. *et al.* Mediator of tolerance to abiotic stress *ERF6* regulates susceptibility of *Arabidopsis* to *Meloidogyne incognita*. **Molecular Plant Pathology**, v. 20, n. 1, p. 137–152, 2019.

ZAREI, A. *et al.* Two GCC boxes and AP2/ERF-domain transcription factor *ORA59* in jasmonate/ethylene-mediated activation of the *PDF1.2* promoter in *Arabidopsis*. **Plant Molecular Biology**, v. 75, n. 4–5, p. 321–331, 2011.

ZHU, X. *et al.* The wheat ethylene response factor transcription factor *PATHOGEN-INDUCED ERF1* mediates host responses to both the necrotrophic pathogen *Rhizoctonia cerealis* and freezing stresses. **Plant Physiology**, v. 164, n. 3, p. 1499–1514, 2014.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 6, p. 553–596, 2007.

ZRIBI, I.; GHORBEL, M.; BRINI, F. *Pathogenesis related proteins (PRs)*: From cellular mechanisms to plant defense. **Current Protein and Peptide Science**, v. 22, n. 5, p. 396–412, 2021.

12 CONCLUSÃO

Este estudo pioneiro identificou os genes de referência adequados para a normalização de análises de expressão gênica em híbridos de *Eucalyptus* (*E. tereticornis* x *E. camaldulensis*) sob à inoculação com o fungo *B. bassiana* e à infestação por *L. invasa*. Além disso, é a primeira pesquisa a investigar a expressão dos genes *ERF* e *PR* nestas condições específicas. A seleção acurada dos genes de referência estabelece uma base sólida para futuros estudos de expressão gênica neste contexto. A análise dos genes *ERF* e *PR* fornece *insights* importantes para compreender os mecanismos de defesa do eucalipto contra o ataque da *L. invasa*, contribuindo significativamente para o desenvolvimento de estratégias de melhoramento genético focadas na resistência a esta praga.

scientific reports



OPEN Reference genes for *Eucalyptus* spp. under *Beauveria bassiana* inoculation and subsequently infestation by the galling wasp *Leptocybe invasa*

Matheus Martins Daude^{1,2}, Solange Aparecida Ságio^{1,3}, Jovielly Neves Rodrigues⁴, Nívea Maria Pereira Lima⁵, André Almeida Lima¹, Maíra Ignacio Sarmiento⁴, Renato Almeida Sarmiento^{2,4} & Horllys Gomes Barreto^{1,2,3✉}

Relative gene expression analysis through RT-qPCR is an important molecular technique that helps understanding different molecular mechanisms, such as the plant defense response to insect pests. However, the use of RT-qPCR for gene expression analysis can be affected by factors that directly affect the reliability of the results. Among these factors, the appropriate choice of reference genes is crucial and can strongly impact RT-qPCR relative gene expression analyses, highlighting the importance in correctly choosing the most suitable genes for the success of the analysis. Thus, this study aimed to select and validate reference genes for relative gene expression studies through RT-qPCR in hybrids of *Eucalyptus tereticornis* × *Eucalyptus camaldulensis* (drought tolerant and susceptible to *Leptocybe invasa*) under conditions of inoculation by the *Beauveria bassiana* fungus and subsequent infestation by *L. invasa*. The expression level and stability of eleven candidate genes were evaluated. Stability was analyzed using the RefFinder tool, which integrates the geNorm, NormFinder, BestKeeper, and Delta-Ct algorithms. The selected reference genes were validated through the expression analysis of the transcriptional factor *EcDREB2* (dehydration-responsive element-binding protein 2). For all treatments evaluated, *EcPTB*, *EcPP2A-1*, and *EcEUC12* were the best reference genes. The triplets *EcPTB/EcEUC12/EcUBP6*, *EcPP2A-1/EcEUC12/EcPTB*, *EcIDH/EcSAND/Ecα-TUB*, *EcPP2A-1/Ecα-TUB/EcPTB*, and *EcPP2A-1/EcUPL7/EcSAND* were the best reference genes for the control plants, mother plants, plants inoculated with *B. bassiana*, plants infested with *L. invasa*, and plants inoculated with *B. bassiana* and subsequently infested with *L. invasa*, respectively. The best determined reference genes were used to normalize the RT-qPCR expression data for each experimental condition evaluated. The results emphasize the importance of this type of study to ensure the reliability of relative gene expression analyses. Furthermore, the findings of this study can be used as a basis for future research, comprising gene expression analysis of different eucalyptus metabolic pathways.

The *Eucalyptus* genus belongs to the *Myrtaceae* family and is composed by approximately 600 species and sub-species, being one of the main global sources of wood and widely cultivated for industrial use^{1,2}. Worldwide, raw materials derived from the forestry sector are used in the production of various products, such as civil construction structures, furniture, paper, pharmaceutical, and cosmetic products, being also used for energy generation³. Globally, *Eucalyptus* spp. is the most extensively cultivated forest genus, with a planted area of around 25 million hectares⁴. Brazil stands out as the world's largest eucalyptus producer, with a cultivation area of more

¹Laboratory of Molecular Analysis (LAM), Life Sciences Department, Faculty of Medicine, Federal University of Tocantins, Palmas, TO, Brazil. ²Postgraduate Program in Biodiversity and Biotechnology, Rede Bionorte, Federal University of Tocantins, Palmas, TO, Brazil. ³Postgraduate Program in Digital Agroenergy, Federal University of Tocantins, Palmas, TO, Brazil. ⁴Postgraduate Program in Forest and Environmental Sciences, Federal University of Tocantins, Palmas, TO, Brazil. ⁵Agronomy Undergraduate Course, Federal University of Tocantins, Palmas, TO, Brazil. ✉email: horllys@uft.edu.br

Anexo 1. Página inicial do artigo publicado referente ao primeiro capítulo da tese.