

# Projeto iPLANT

**“Inovação na identificação e produção de plantas melhoradas de eucalipto para enfrentar desafios atuais”**

## Tarefa 1.1

**Deliverable 1.1. Indivíduos elite da Altri Florestal e RAIZ em termos de produtividade (crescimento, densidade da madeira e rendimento em pasta).**



**RAIZ**

**30 de abril 2019**

Co financiado por

**COMPETE  
2020**  
PROGRAMA OPERACIONAL COMPETITIVIDADE E INNOVAÇÃO

**Lisb@20<sup>20</sup>**

**POR  
TUGAL  
2020**

 UNIÃO EUROPEIA  
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional

## Enquadramento

O Projecto i-PLANT visa a identificação de clones de elevado desempenho em campo, ultrapassando as limitações ambientais e ainda o desenvolvimento de metodologias de multiplicação operacional em larga escala daqueles materiais. Para tal é fundamental proceder inicialmente a uma análise estatística dos ensaios e respetivas medições pertencentes a ambos os parceiros. Esta análise conjunta permite escolher os genótipos que a incluir nas atividades subsequentes do projeto, designadamente a sua caracterização quanto a de tolerância ao frio e stress hídrico.

Outro aspecto muito importante no projeto é o desenvolvimento de metodologias de multiplicação vegetativa e produção de plantas mais eficientes, que possam a médio prazo tornar-se rotinas nos viveiros. Ora estes trabalhos deverão ser realizados sobre materiais de elevado valor genético que sobressairão da linha de trabalho que agora se reporta.

## Objectivos

Esta actividade (Tarefa 2.1) tem como objectivo identificar do conjunto de genótipos existentes em ensaios do programa de melhoramento do RAIZ e da ALTRI FLORESTAL, os de valor genético excepcional que deverão ser objeto de estudo mais detalhado, designadamente para qualidade de madeira, resistência ao frio e à secura.

## Metodologia

### Ensaios e dados analisados

A Tabela 1 apresenta um resumo dos dados utilizados. Incluíram 282 ensaios, envolvendo 207291 genótipos, num total de 340988 registos (ou árvores) avaliadas. Parte destes ensaios foi avaliada para altura e parte para DAP, havendo um grande número de ensaios avaliados para ambas as variáveis. Todos os ensaios possuem informação de sobrevivência. O Anexo 1 apresenta detalhes sobre estes ensaios.

Ainda na Tabela 1 indica-se de forma mais sintetizada como a informação se encontra dividida por origem ALTRI e RAIZ, qual o número de ensaios de cada origem e total de

genótipos representados, por variável (altura, DAP e sobrevivência), com os respetivo número de registo e idade média, mínima e máxima dos dados analisados.

**Tabela 1.** Número total de registo e respectiva origem e idade, por variável avaliada.

Variável	Origem	Ensaios	Registos	Individuos	Idade (min/média/máx)	Clones "ponte"
ALT	ALTRI	83	143256	112554	2,1 / 9,4 / 17,4	
	RAIZ	177	79606	15557	2,0 / 7,3 / 12,7	
	global	260	222862	128111	2,0 / 8,0 / 17,4	7 clones RAIZ: 1088, 1113, 1204,
DAP	ALTRI	82	145682	115038	2,9 / 9,7 / 17,4	1213, 1235,
	RAIZ	186	90982	30064	2,0 / 8,0 / 12,7	100170003,
	global	268	236664	145102	2,0 / 8,5 / 17,4	100234004 4 clones ENCE:
SOB	ALTRI	93	223910	168368	2,1 / 9,4 / 17,4	ODIEL, SANCHO,
	RAIZ	190	117078	38923	2,0 / 7,8 / 12,7	CANDON, ANSELMO
	global	283	340988	207291	2,0 / 8,3 / 17,4	

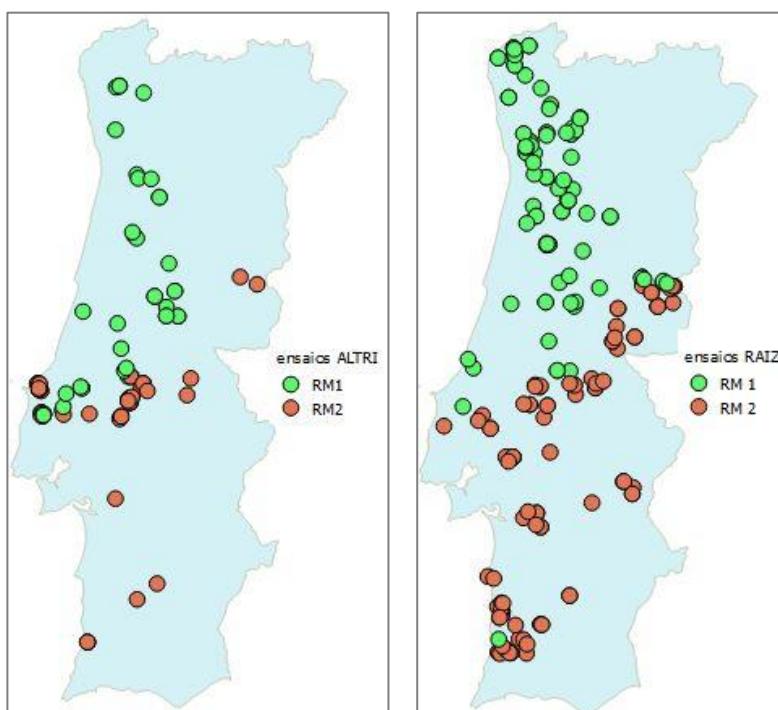
Também nesta tabela se indicam quantos e quais são os clones “ponte”, isto é, clones que se encontram simultaneamente em ensaios de ambas as empresas pois reflectem um grupo de materiais de grande importância por permitirem à metodologia de análise uma melhor comparabilidade entre todos os restantes materiais.

A Tabela 2 elucida de que forma se estabelece esta interligação entre ensaios. Os 7 clones do programa RAIZ encontram-se, em média, em 5,6 ensaios do programa da ALTRI com uma média de 14 cópias por ensaio. Verifica-se igualmente que nos ensaios da ALTRI existem 4 clones de origem ENCE que igualmente se encontram em ensaios do RAIZ. O RAIZ não possui qualquer clone ALTRI integrado nos seus ensaios.

**Tabela 2.** Clones “ponte” (4 ENCE e 7 RAIZ) presentes nos ensaios ALTRI e RAIZ, sua origem e grau de representatividade, nomeadamente número de ensaios e média de cópias em que estão presentes.

	Ensaios	Origem dos clones	Representatividade	
			nº ensaios	nº cópias/ensaio
ALTRI	ENCE		3	
			24	
	RAIZ		6	
			15	
RAIZ	ENCE		5	
			15	

Os 283 ensaios referidos na Tabela 1 estão distribuídos pelo o país cobrindo as principais áreas onde existe eucalipto (ver Figura 1). Nestes mapas distinguem-se os ensaios que se localizam em condições RM1 (condição edafoclimática com produtividade potencial mais elevada) e RM2 (condição de produtividade potencial mais baixa).

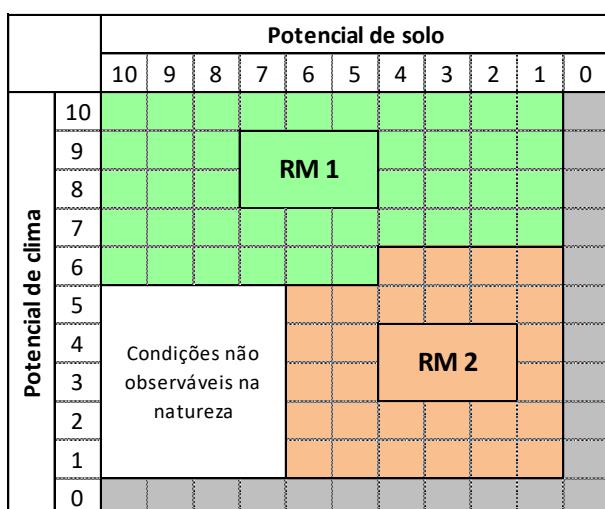


**Figura 1.** Distribuição espacial dos ensaios ALTRI e RAIZ, diferenciados consoante se encontrem em condição típica de RM1 ou RM2.

Deve referir-se que a classificação RM1 e RM2 resulta de uma aglutinação de diferentes combinações de solo e clima classificados estes numa escala de 0 (piores solo e clima) a 10 (melhores solo e clima) como se pode observar na quadrícula da Figura 2, sendo que a RM1 inclui todas as células a verde e a RM2 as células a rosa.

Genericamente, a região RM1, de melhor aptidão para o eucalipto, caracteriza-se por apresentar precipitações anuais superiores a 1000 mm; mais de 100 dias no ano com precipitação superior a 1 mm; precipitações superiores a 55 mm no conjunto dos meses mais quentes, Junho, Julho e Agosto; verões com temperaturas moderadas; solos com grande variedade, em que dominam os derivados de xisto com reduzida profundidade e pedregosidade elevada podendo encontrar-se também solos mais profundos e com menor pedregosidade na litologia de granito.

A **RM2**, de menor aptidão, caracteriza-se genericamente por precipitações anuais inferiores a 1000 mm; menos de 100 dias no ano com precipitação superior a 1 mm; precipitações inferiores a 55 mm no conjunto dos meses mais quentes, Junho, Julho e Agosto; verões quentes ou muito quentes; solos com grande variedade, em que dominam os arenosos com baixa retenção de água e os derivados de xisto com reduzida profundidade e pedregosidade elevada.



	RM1	RM2	Total
ALTRI	ALT = 34	49	83
	DAP = 34	48	82
	SOB = 42	51	93
RAIZ	ALT = 86	91	177
	DAP = 91	95	186
	SOB = 92	98	190
Total	ALT = 120	140	260
	DAP = 125	143	268
	SOB = 134	149	283

**Figura 2.** Combinações de solo e clima e sua agregação nas Regiões RM1 e RM2 (esq.), número de ensaios/origem que providenciaram informação para a estimativa das variáveis altura (ALT), diâmetro 1,3m (DAP) e sobrevivência (SOB) e como estes se integram nas regiões RM1 e RM2 (dir.).

### Análise BLUP

O método estatístico adoptado pelo RAIZ para estimar o mérito genético das árvores da sua população de melhoramento designa-se por **BLUP**, as iniciais de *Best Linear Unbiased Prediction*. A análise BLUP é considerada a melhor estratégia de estimativa de mérito genético em populações de pedigree complexo (viz (Robinson 1991)), sendo o método de escolha de quase todos os programas de melhoramento comerciais. Iremos detalhar brevemente em que consiste esta análise.

O método tem a designação BLUP porque as estimativas que produz, a que chamaremos  $BLUP(u)=\hat{u}$ , são melhores (*Best*), no sentido que minimizam a sua variância, lineares (*Linear*) no sentido em que são funções lineares das medições, e centradas (*Unbiased*) no sentido em que a sua esperança  $E[BLUP(u)]$  é igual ao valor verdadeiro embora desconhecido do que se quer estimar (e que designamos por  $u$ ). O modelo matemático usado para “explicar” iPLANT - “Inovação na identificação e produção de plantas melhoradas de eucalipto para enfrentar desafios atuais”

a diferença entre observações designa-se por *modelo linear*. Num modelo linear, decompõe-se a medição de uma árvore na soma de vários factores ou efeitos (como sejam o *bloco* ou outros elementos do desenho experimental do ensaio, e o *genótipo* de cada árvore). Considera-se estes factores independentes entre si e agindo aditivamente. Uma vez retirados os efeitos de todos os factores experimentais que tenham sido definidos, sobra os respectivos resíduos (com a sua respectiva variância residual). Os resíduos correspondem à parte que não pôde ser explicada pelos factores incluídos no modelo. Quanto menores os resíduos, melhor se considera o modelo linear adoptado, como aproximação à realidade. Este modelo linear pode ser representada, em anotação matricial, da seguinte maneira:

$$y = \mathbf{X}b + \mathbf{Z}u + e \quad [1]$$

Em que  $y$  representa o conjunto (ou em linguagem matricial, o vector) das medições feitas,  $b$  o vector dos efeitos fixos,  $u$  o vector dos efeitos aleatórios e  $e$  os resíduos. As matrizes  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Z}$  são designadas *matrizes de incidência*, sendo constituídas por elementos 0 ou 1. Estas matrizes são construídas de modo a relacionarem cada observação com a respectiva classe de efeitos fixos e aleatórios. Num modelo linear misto, os efeitos considerados aleatórios têm por definição média zero (isto é,  $E(u)=E(e)=0$ ), enquanto a média dos efeitos fixos é  $E(y)=\mathbf{X}b$ . Sendo  $u$  e  $e$  independentes entre si, pode-se demonstrar que a variância das medições  $y$  (ou seja a variação fenotípica) é dada, de novo em notação matricial, por:

$$\mathbf{V} = \mathbf{XGZ}^T + \mathbf{R} \quad [2]$$

Nesta equação, a variância total (ou fenotípica) inclui um primeiro termo que corresponde à contribuição para a variância total, dos efeitos aleatórios do modelo. No caso mais simples de existir apenas um factor aleatório (por exemplo os efeitos genéticos das árvores), a  $var(u) = \mathbf{G}\{\sigma_u^2\mathbf{I}\} = \mathbf{G}$ . O segundo termo da Equação 2 corresponde à contribuição da variância dos resíduos, em que a matriz  $\mathbf{R}$  é em geral uma matriz diagonal do tipo  $\mathbf{R} = \mathbf{I}\sigma_e^2$ .

No caso de o termo aleatório ser o mérito genético *aditivo* de cada árvore, a variância  $\mathbf{G}$  corresponde à variância genética aditiva, sendo descrita matricialmente por:

$$\mathbf{G} = \mathbf{A}\lambda^{-1} \quad [3]$$

em que  $\lambda = \sigma_e^2 / \sigma_u^2$  e  $\mathbf{A}$  é designada por matriz de relacionamento aditivo entre árvores.

Esta matriz  $\mathbf{A}$  estabelece a relação de parentesco que há entre todas árvores na análise.

Considerando a Equação 1, a fórmula matricial que estima os efeitos fixos  $\mathbf{b}$  vem:

$$\hat{\mathbf{b}} = (\mathbf{X}^T \mathbf{V}^{-1} \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^T \mathbf{V}^{-1} \mathbf{y} \quad [4]$$

em que  $\mathbf{V}$  está definida como em 2.

Por sua vez, a estimativa BLUP dos efeitos aleatórios  $\mathbf{u}$  vem:

$$BLUP(\mathbf{u}) = \hat{\mathbf{u}} = \mathbf{G} \mathbf{Z}^T \mathbf{V}^{-1} (\mathbf{y} - \mathbf{X} \hat{\mathbf{b}}) \quad [5]$$

Como se pode deduzir das expressões 4 e 5, para estimar os  $BLUP(\mathbf{u})$  é necessário conhecer as variâncias dos efeitos aleatórios do modelo, neste caso  $\sigma_e^2$  e  $\sigma_u^2$ . Note-se ainda que para obter as soluções de  $\mathbf{u}$  e  $\mathbf{b}$  é necessário inverter a matriz  $\mathbf{V}$ . Quando o vector de observações (árvores) é muito grande, como é o caso da população de melhoramento do RAIZ e ALTRI, inverter  $\mathbf{V}$  pode ser impossível de se computar. Uma das mais importantes contribuições de C.R. Henderson (considerado o pai do BLUP) foi ter derivado um novo conjunto de equações que permitiu contornar este problema ((Henderson 1984)). Ele concluiu que se poderiam obter as soluções para  $\mathbf{b}$  e  $\mathbf{u}$ , formando o que se passou a designar por Equações do Modelo Misto ou *Mixed-Model Equations* (MME):

$$\begin{pmatrix} \mathbf{X}^T \mathbf{R}^{-1} \mathbf{X} & \mathbf{X}^T \mathbf{R}^{-1} \mathbf{Z} \\ \mathbf{Z}^T \mathbf{R}^{-1} \mathbf{X} & \mathbf{Z}^T \mathbf{R}^{-1} \mathbf{Z} + \mathbf{G}^{-1} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \hat{\mathbf{b}} \\ \hat{\mathbf{u}} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \mathbf{X}^T \mathbf{R}^{-1} \mathbf{y} \\ \mathbf{Z}^T \mathbf{R}^{-1} \mathbf{y} \end{pmatrix} \quad [6]$$

Apesar da equação 6 parecer mais complicada que as equações 4 e 5, a inversão de  $\mathbf{R}$  e  $\mathbf{G}$  é computacionalmente simples visto tratarem-se de matrizes diagonais ou de estrutura relativamente simples. Além disso, a dimensão das MME é muito menor que a matriz  $\mathbf{V}$ , nas equações 4 ou 5. Outra das vantagens de se poder inverter as MME é que podemos obter uma estimativa do erro da predição dos BLUP. Assim, representando a inversa da MME como:

$$\begin{pmatrix} \mathbf{X}^T \mathbf{R}^{-1} \mathbf{X} & \mathbf{X}^T \mathbf{R}^{-1} \mathbf{Z} \\ \mathbf{Z}^T \mathbf{R}^{-1} \mathbf{X} & \mathbf{Z}^T \mathbf{R}^{-1} \mathbf{Z} + \mathbf{G}^{-1} \end{pmatrix}^{-1} = \begin{pmatrix} \mathbf{C}_{11} & \mathbf{C}_{12} \\ \mathbf{C}_{12}^T & \mathbf{C}_{22} \end{pmatrix} \quad [7]$$

Neste caso, a matriz das variâncias de predição para os efeitos fixos vem  $\sigma^2(\hat{b}) = \mathbf{C}_{11}$  e para os efeitos aleatórios,  $\sigma^2(\hat{u} - u) = \mathbf{C}_{22}$ . A partir destas estimativas de *variância de predição* é possível estimar o rigor de selecção, isto é da correlação  $\text{corr}(\hat{u}, u)$ , ou por exemplo obter uma estimativa do intervalo de confiança ao redor de  $\hat{u}$ .

Pode ser demonstrado que não é necessário assegurar a normalidade das medições para que as estimativas de ***b*** e de ***u*** sejam *Best*, *Linear* e *Unbiased*, embora como se referiu antes, as suas variâncias devam ser conhecidas.

### *O modelo linear usado*

O efeito mais importante a estimar na presente análise é o mérito genético de cada indivíduo. Ele representa o valor acumulado do efeito dos genes que a árvore possui. Um dos aspectos mais relevantes da análise BLUP é que este mérito genético é estimado com base na informação fenotípica de todas as árvores aparentadas. Isso é feito através da matriz de relacionamento ***A***, que como vimos antes está incluída no termo da variância de *u* (isto é,  $\mathbf{G}^{-1} = \lambda \mathbf{A}^{-1}$  em que  $\lambda = \sigma_e^2 / \sigma_u^2$ ). À medida que a complexidade do pedigree aumenta, o rigor da estimativa do mérito genético de uma árvore melhora já que passa a incluir não só a medição de si própria, como de todas as árvores consigo aparentadas.

Outro dos elementos essenciais para que a análise seja de qualidade é um bom delineamento dos ensaios de campo. Isso é fundamental para que haja uma efetiva separação dos efeitos ambientais e genéticos, especialmente no caso de variáveis com baixa heritabilidade como sejam o crescimento e a sobrevivência. O delineamento usado varia entre ensaios ensaios, embora se agrupe em duas categorias principais: (i) em blocos completos casualizados (*RCB*) em que cada família ou clone está representado aleatoriamente, geralmente por uma árvore, em cada replicação, e (ii) em blocos incompletos dentro de replicações, onde cada replicação está subdividida em blocos incompletos. Estes blocos incompletos usam um desenho circular específico, designado de *alpha-design* (viz (John and Williams 1995), pg 68). Trata-se de um tipo particular de desenho, onde o número de blocos por replicação e a representação das famílias ou clones dentro dos blocos incompletos é optimizado de modo a aumentar o poder de contraste entre tratamentos. O arranjo final é feito com o uso do software *CycDesigN*, que encontra

por simulação a melhor composição de famílias dentro dos blocos, para um dado número de replicações, de tratamentos e de número de tratamentos por bloco. Estes desenhos têm uma eficiência muito alta, acima de 95% e frequentemente perto de 100% relativamente a um desenho óptimo teórico (i.e. um em que os tratamento sejam totalmente balanceados). No geral, os ensaios do RAIZ, quer sejam do tipo RCB ou ALPHA são por isso muito eficientes. Além disso as replicações e blocos têm pequena dimensão (tipicamente menos de 100 árvores por bloco, ou aproximadamente de 1000 m<sup>2</sup>). Há igualmente uma elevada boa sobreposição de tratamentos (clones e progenitores de famílias) comuns entre ensaios. No modelo de análise BLUP, os ensaios e as replicações dentro dos ensaios foram consideradas factores fixos. Nos ensaios em blocos incompletos (do tipo ALPHA), os blocos incompletos foram inicialmente ajustados como factores aleatórios, como aliás é recomendado por (Williams and Matheson 1994), mas demonstrou-se posteriormente que considerar a unidade *ensaio.replicação.bloco* como factor fixo resulta em idênticas estimativas de  $u$ . Esta é aliás a estratégia recomendada quando se pretende maximizar o rigor de selecção (isto é, o rigor dos BLUP), pois evita enviesamentos causados por historiais de selecções prévias distintas que poderão ocorrer entre ensaios (e.g. (Visscher and Goddard 1993)).

O modelo linear utilizado inclui como efeitos aleatórios as distintas componentes de mérito genético. Em primeiro lugar, o *mérito genético aditivo (a)*, que corresponde ao valor genético que é transmitido à descendência por uma árvore. Esta é uma informação chave para a escolha dos futuros progenitores do programa de melhoramento. Por isso, *a* também se designa por *Estimativa do Valor Reprodutivo* (ou *Expected Breeding Value*). Em segundo lugar, e para o caso de árvores pertencentes a famílias de polinização controlada, a análise estima o efeito genético da *Família* (designado *f*). Ele corresponde ao desvio genético em relação à média dos efeitos aditivos dos pais dessa família, causado pela combinação específica dos alelos de cada um dos progenitores, maioritariamente devidos a efeitos de dominância. Finalmente, e sempre que uma árvore seja clonada, a análise estima ainda os efeitos do *clone* dentro da família (designado por *c*). Este efeito genético inclui os efeitos não aditivos (de dominância e epistáticos) que não foram já incluídos em *f*. A soma dos efeitos genéticos *a* + *f* + *c* equivale ao mérito genético total da árvore

(designado por  $g$ ), ou o **mérito clonal**. A propagação vegetativa de um clone réplica todos os efeitos genéticos presentes nesse indivíduo. Esta informação é por isso usada na escolha dos clones a usar operacionalmente.

Resumindo, os termos do modelo e portanto as soluções obtidas com a análise BLUP permitem, para uma árvore  $k$ , filha de  $i$  e de  $j$ , obter uma estimativa do seu *valor reprodutivo*, dado por  $\hat{a}_k$ , do valor agregado da família entre pais  $i$  e  $j$ , dado por  $\frac{(\hat{a}_i + \hat{a}_j)}{2} + \hat{f}_{ij}$  e se a árvore tiver sido clonada, do seu valor genético total, dado por  $\hat{g}_{k(ij)} = \hat{a}_k + \hat{f}_{ij} + \hat{c}_k$ . No caso de árvores clonadas em que o pedigree é incompleto ou desconhecido,  $\hat{f}_{ij} = 0$  (isto é, não pode ser estimado). No caso de árvores não clonadas e de pedigree incompletos, então  $\hat{f}_{ij} = \hat{c}_k = 0$ . E finalmente, no caso de árvores de pedigree completo, mas não clonadas,  $\hat{c}_k = 0$ . Em anotação matricial, o modelo linear completo para a análise BLUP do RAIZ pode ser então representado como:

$$y = \mathbf{X}s + \mathbf{Z}_1a + \mathbf{Z}_2f + \mathbf{Z}_3c + e \quad [8]$$

em que  $s$  corresponde aos efeitos fixos de replicação e bloco dentro de cada ensaio (sendo  $E(s) = \mathbf{X}s$ ), e como vimos atrás,  $a$ ,  $f$  e  $c$  correspondem aos efeitos genéticos aditivo, de família completa e clonal dentro da família, respectivamente e  $e$  os resíduos. As matrizes  $\mathbf{X}$ ,  $\mathbf{Z}_1$ ,  $\mathbf{Z}_2$  e  $\mathbf{Z}_3$  são matrizes de zeros e uns, que relacionam as observações com os respectivos factores (chamadas de *design matrices*). As médias e variâncias destes efeitos aleatórios vêm:

$$\begin{bmatrix} a \\ f \\ c \\ e \end{bmatrix} \sim N \left( \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}, \begin{bmatrix} \mathbf{A}\sigma_a^2 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \mathbf{I}\sigma_f^2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \mathbf{I}\sigma_c^2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \mathbf{R} \end{bmatrix} \right) \quad [9]$$

Para interpretar os termos genéticos do modelo, consideremos o caso geral do fenótipo ( $P$ ) de uma árvore ser a soma de um grande número de genes (implicitamente um número infinito) em que a natureza dos efeitos é separada em efeitos genéticos aditivos ( $A$ ), de dominância ( $D$ ) e epistáticos ( $I$ ) e os respectivos desvios ambientais ( $E$ ). Neste caso, podemos interpretar os termos genéticos estimados pelo modelo linear, como:

$$\hat{a} \approx A$$

$$\hat{f} \approx \frac{1}{4}D$$

$$\hat{c} \approx \frac{3}{4}D + I$$

[10]

Note-se que algumas destas igualdades são apenas uma aproximação, pois fracções dos efeitos epistáticos podem co-ocorrer em  $a$ ,  $f$  e  $c$  (detalhes em (Araújo et al. 2011)). No caso de árvores em que um ou os dois progenitores são desconhecidos, como seja o caso de clones  $F_0$  ou descendências de famílias de polinização aberta, a análise não tem possibilidade de estimar  $f$  ou  $c$ , e os efeitos não aditivos acabam por ser incorporados em parte na estimativa de  $a$ , que assim poderá ficar algo enviesada (viz (Lynch and Walsh 1998), pg 769). Apesar das Equações 10 serem aproximadas, podemos considerar no entanto que a soma dos valores  $a$ ,  $f$  e  $c$  é uma estimativa correcta do valor genético total, mesmo se a partição dos efeitos  $A$ ,  $D$  e  $I$  possa ser questionável. Por outras palavras:

$$G = A + D + I = \hat{a} + \hat{f} + \hat{c} \quad [11]$$

### *As variáveis usadas e o valor de referência*

As variáveis incluídas na análise relativas à produtividade são o *Diâmetro* sobre casca a 1.3 m (*Dap*), a *altura total* e a sobrevivência (0 ou 1) à altura de medição, considerando-se neste caso como morte (=0) apenas se ocorreu depois dos primeiros 6 meses após plantação.

Como se depreende da Equação 9, as estimativas de BLUP de todos os efeitos aleatórios estão centradas em zero. O significado de  $u=0$  para o mérito genético de *Dap* ou altura corresponde ao valor genético médio das árvores fundadoras (ou *progenitores de base*) dos programas. Estas árvores fundadoras correspondem a todo e qualquer árvore da qual nada se sabe relativamente aos seus pais e que contribuíram directamente ou através de sua descendência, para a população de melhoramento. É de esperar que alguns destes fundadores terão algum grau de melhoramento. Por exemplo muitos dos fundadores são árvores-plus, selecionados em matas pelo seu excelente porte. Assim, o valor de referência em relação ao qual os BLUP se centram pode estar algo enviesado relativamente ao que se consideraria um nível nulo de melhoramento genético. É de supor que este desvio seja **iPLANT** - "Inovação na identificação e produção de plantas melhoradas de eucalipto para enfrentar desafios atuais"

mínimo, por várias razões. Em primeiro lugar porque a eficiência da seleção massal é baixa (e.g. (Cornelius 1994)). Em segundo lugar, porque muitos dos fundadores são efetivamente árvores não seleccionadas, provenientes de bosques nativos na Austrália. Na média, podemos considerar o nível  $BLUP=0$  como referencial correcto, em relação ao qual se poderá definir o mérito de cada árvore, e estabelecer os ganhos genéticos obtidos pelo programa.

### *As Equações Lineares Mistas (MME) na análise RAIZ+ALTRI*

Com base no modelo dado pela Equação 8, podemos expandir as MME (dadas de modo simplificado pela Equação 6), e incluindo agora todos os factores:

$$\begin{pmatrix} \mathbf{X}^T \mathbf{R}^{-1} \mathbf{X} & \mathbf{X}^T \mathbf{R}^{-1} \mathbf{Z}_1 & \mathbf{X}^T \mathbf{R}^{-1} \mathbf{Z}_2 & \mathbf{X}^T \mathbf{R}^{-1} \mathbf{Z}_3 \\ \mathbf{Z}_1^T \mathbf{R}^{-1} \mathbf{X} & \mathbf{Z}_1^T \mathbf{R}^{-1} \mathbf{Z}_1 + \mathbf{G}^{-1} & \mathbf{Z}_1^T \mathbf{R}^{-1} \mathbf{Z}_2 & \mathbf{Z}_1^T \mathbf{R}^{-1} \mathbf{Z}_3 \\ \mathbf{Z}_2^T \mathbf{R}^{-1} \mathbf{X} & \mathbf{Z}_2^T \mathbf{R}^{-1} \mathbf{Z}_1 & \mathbf{Z}_2^T \mathbf{R}^{-1} \mathbf{Z}_2 + \mathbf{F}^{-1} & \mathbf{Z}_2^T \mathbf{R}^{-1} \mathbf{Z}_3 \\ \mathbf{Z}_3^T \mathbf{R}^{-1} \mathbf{X} & \mathbf{Z}_3^T \mathbf{R}^{-1} \mathbf{Z}_1 & \mathbf{Z}_3^T \mathbf{R}^{-1} \mathbf{Z}_2 & \mathbf{Z}_3^T \mathbf{R}^{-1} \mathbf{Z}_3 + \mathbf{C}^{-1} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \hat{s} \\ \hat{a} \\ \hat{f} \\ \hat{c} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \mathbf{X}^T \mathbf{R}^{-1} \mathbf{y} \\ \mathbf{Z}_1^T \mathbf{R}^{-1} \mathbf{y} \\ \mathbf{Z}_2^T \mathbf{R}^{-1} \mathbf{y} \\ \mathbf{Z}_3^T \mathbf{R}^{-1} \mathbf{y} \end{pmatrix} \quad [12]$$

Em que  $\mathbf{G}^{-1} = \mathbf{A}^{-1} \sigma_e^2 / \sigma_a^2$ ,  $\mathbf{F}^{-1} = \mathbf{I} \sigma_e^2 / \sigma_f^2$ ,  $\mathbf{C}^{-1} = \mathbf{I} \sigma_e^2 / \sigma_c^2$  e  $\mathbf{R} = \mathbf{K} \sigma_e^2$ . Destes termos, apenas  $\mathbf{K}$  não tinha sido previamente definido. A matriz  $\mathbf{K}$  é diagonal, estando os seus elementos definidos de acordo com a idade de medição, como iremos detalhar mais adiante. Na análise de qualidade de madeira (densidade e rendimento), o modelo simplifica-se pois apenas se incluem as replicações (isto é, nos ensaios com desenho ALPHA, ignorara-se os blocos incompletos) e não se considerou a matriz  $\mathbf{K}$ , donde os resíduos são independentes da idade, e  $\mathbf{R} = \mathbf{I} \sigma_e^2$ .

### *A matriz $\mathbf{K}$ – ponderar o efeito da idade de medição*

No caso do crescimento, as variáveis medidas (altura e Dap) são cumulativas. Quanto mais velha a medição, mais ela traduz o crescimento acumulado em anos sucessivos e por isso mais será de esperar que a sua medição corresponda ao crescimento final, que é a variável que se pretende estimar. Em situações simples, em que os dados estão agrupados em poucas classes de idades, as diferentes idades podem ser modeladas considerando cada idade como uma variável distinta, embora correlacionada com as restantes, e procede-se a **iPLANT** - “Inovação na identificação e produção de plantas melhoradas de eucalipto para enfrentar desafios atuais”

com uma análise multivariada dos dados. Porém se as medições se dispersarem por muitas idades, uma análise multivariada deste tipo torna-se excessivamente pesada e desnecessariamente complexa. Uma estratégia alternativa foi proposta por (Wei and Borralho 1996) e consiste em se considerar a medição numa dada idade como a soma dos seus vários incrementos anuais e em que cada incremento corresponde à expressão da mesma variável biológica. Assim, medições mais velhas correspondem a observações repetidas mais vezes, em que o número de repetições corresponde à idade de medição. A grande vantagem desta estratégia é que deste modo a análise mantém-se univariada, embora a variância residual passe a depender da idade da medição. A correcção da variância residual vem, como vimos atrás:

$$\mathbf{R} = \mathbf{K} \sigma_e^2 \quad [13]$$

Em que  $\sigma_e^2$  se refere à variância residual para a média das idades de medição e  $\mathbf{K}$  é uma matriz diagonal com os valores calculado de acordo com uma adaptação da fórmula da repetibilidade de (Falconer and MacKay 1996):

$$k_i = \frac{(1-h^2) \times w_i^*}{(1-h^2 \times w_i^*)} \quad [14]$$

Em que:

$$w_i^* = \frac{w_i}{w_{ref}} = \frac{t_i \times (1 + (t_{ref} - 1) \times \rho)}{t_{ref} \times (1 + (t_i - 1) \times \rho)} \quad [15]$$

Em que  $t_i$  é a idade de medição,  $t_{ref}$  é a idade de referência da análise global (isto é a média das idades de todas medições a que se referem as estimativas de variâncias a usar no BLUP), e  $\rho$  é a repetibilidade entre incrementos anuais. Esta repetibilidade é um valor que tem de se saber *a priori*. Para altura e Dap, ela parece situar-se entre 0.4 e 0.6 (viz (Wei and Borralho 1998)). Em AsReml, no caso de se considerar a opção para o erro residual de !S2==1.00, a Equação 14 virá:

$$k_i = \frac{1-h^2 w_i^*}{h^2 w_i^*} \quad [16]$$

---

As Eq. 13 a 16 vão ponderar as variâncias residuais na análise BLUP, em função da idade de medição.

### *Heterogeneidade de variâncias entre ensaios*

Para uma adequada análise BLUP referiu-se atrás que não é necessário que as variáveis medidas tenham uma distribuição normal, embora desvios à normalidade venham a complicar a interpretação dos erros de predição das estimativas e dos respectivos testes de significância dos efeitos. Teoricamente, é importante assegurar que as variâncias são conhecidas. É igualmente fundamental que estas variâncias sejam homogéneas entre as distintas classes de efeitos, designadamente entre ensaios. O principal impacto de não se corrigir a heterogeneidade de variâncias é que isso levará às melhores estimativas BLUP tenderem a ser escolhidas nos ensaios de maior variância, não sendo necessariamente as árvores de melhor mérito genético. Por outras palavras, a heterogeneidade de variâncias pode afectar a comparação do mérito entre árvores testadas em ensaios diferentes. Os dados de crescimento são obtidos em ensaios com diferentes idades e produtividades, e isso cria uma alta heterogeneidade de variância entre ensaios, sobretudo devido a efeitos de escala. Na presente análise procedeu-se a uma normalização dos dados de crescimento, dividindo a medição de cada árvore pelo desvio padrão fenotípico do respectivo ensaio e deste modo, forçando a que todos os ensaios apresentem uma variância unitária, independentemente da idade ou média.

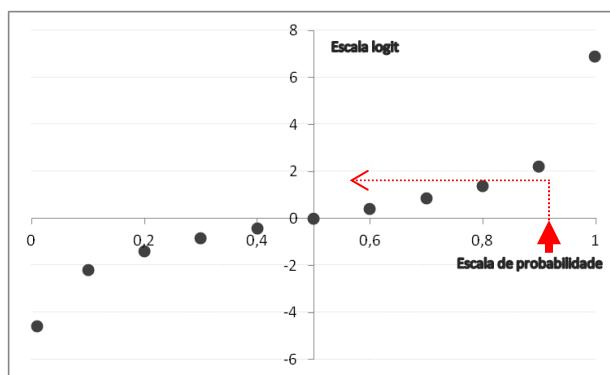
### *A análise de Sobrevivência*

O modelo linear de análise de sobrevivência, e consequentemente a formulação das MME, é em tudo semelhante à descrita para as restantes variáveis. A sobrevivência trata-se porém de uma variável binária (0 ou 1), tendo o fenótipo uma distribuição tipicamente binomial. Nestes casos podemos considerar que a sobrevivência continua a ser uma variável com distribuição contínua *Normal* mas em que o fenótipo muda de 0 a 1 quando se ultrapassa um determinado nível crítico subjacente. A função de ligação entre estas duas distribuições (a *Binomial* e a subjacente *Normal*) pode ter muitas formas. Na análise

do RAIZ, foi assumida que é uma função logística ou *logit*. Demonstrou-se que outras distribuições tipicamente usadas, como a *probit*, davam resultados muito semelhantes. Ao se considerar a função de *logit*, assume-se que a sobrevivência segue uma distribuição binomial em que a sua variância residual é constante e igual a  $\pi^2/3=3.29$  ((McCullagh and Nelder 1989)). Os valores BLUP estimados deste modo apresentam-se numa escala binomial, variando tal como uma Normal, de  $-\infty$  a  $+\infty$ . Chamemos a esta estimativa,  $\hat{\eta}$ . A escala binomial em que estão reportados estes  $\hat{\eta}$  tem a grande vantagem de ser independente da sobrevivência média de cada ensaio. Isso é muito útil, pois os dados de sobrevivência, que contribuem para a estimativa final do BLUP, agregam ensaios com sobrevivências médias que podem ser muito diferentes e isso impactaria as variâncias se estas fossem estimadas numa escala probabilística (de 0 a 100%). A escala binomial não é de fácil interpretação em termos biológicos, mas pode ser convertida na tradicional escala probabilística (chamemos a esta estimativa,  $\hat{\pi}$ ), usando a expressão:

$$\hat{\eta} = \ln \left( \frac{\hat{\pi}}{1-\hat{\pi}} \right) \quad [17]$$

A relação entre as duas escalas pode ser visualizada na Figura 3.



**Figura 3.** Uma comparação gráfica entre a escala logit (em que é feita a análise BLUP de sobrevivência) e a escala probabilística em que é apresentado o BLUP final.

Por exemplo, considerando uma sobrevivência média (de referência) de  $\pi = 85\%$ , o valor correspondente na escala binomial vem:

$$\eta_{85\%} = \ln \left( \frac{0.85}{1 - 0.85} \right) = 1.7346$$

A relação está ilustrada com as setas a vermelho na Figura 3. Assim, após a análise BLUP de sobrevivência em que obtemos uma estimativa  $BLUP = \hat{\eta}_i$ , podemos converter o BLUP para a escala probabilística, relativamente a uma sobrevivência de referência de por exemplo de 85% ( $\pi_{i|85\%}$ ), usando a seguinte expressão:

$$\hat{\pi}_{i|85\%} = \frac{1}{1+e^{-(\hat{\eta}_i + \eta_{85\%})}} = \frac{1}{1+e^{-(\hat{\eta}_i + 1.7346)}} \quad [18]$$

Note-se pois que sempre que se apresentem os valores de BLUP na escala probabilística, estes referem-se a uma sobrevivência média ou de referência.

### Variâncias

Como foi referiu, a análise BLUP requer o conhecimento prévio das variâncias para os factores aleatórios no modelo. Estes incluem os efeitos genéticos (**a**, **f** e **c**) e os resíduos (**e**), para as variáveis Dap, Altura, sobrevivência. Estas variâncias nunca são conhecidas, devendo-se usar aproximações ao seu valor tipicamente com base em estimativas obtidas da literatura ou de uma análise de variâncias usando os mesmos ensaios e dados ou sub-conjunto deles. As variâncias usadas (resumidas na Tabela 3) foram calculadas a partir de um sub-conjunto de cerca de 40 ensaios, situando-se dentro da gama reportada para a espécie. Assim, podemos constatar que a heritabilidade é baixa para sobrevivência e moderada para crescimento.

**Tabela 3.** Valores de variâncias de referência usados na análise do RAIZ, para os efeitos genéticos aditivo (Va), de família (Vf) e clonal (Vc) e variância dos resíduos (Ve) e as correspondentes heritabilidades no sentido restrito ( $h^2$ ) e lato ( $H^2$ ).

	bloco	Variâncias				heritabilidade	
		aditiva	família	clonal	erro	$h^2$	$H^2$
ALT	0,19	0,25	0,03	0,05	0,72	0,24	0,31
DAP	0,08	0,15	0,03	0,04	0,80	0,15	0,22
SOB (*)	-	0,45	0,05	0,25	3,29	0,11	0,19

\*na escala binomial

Em geral, os modelos de análise BLUP usados em melhoramento de animais e plantas incluem apenas a estimativa de mérito genético aditivo. No entanto, na população de *E. globulus*, os efeitos genéticos não aditivos ( $f+c$ ) constituem uma parte importante dos efeitos genéticos totais, pelo menos para crescimento, um resultado amplamente discutido em (Araújo et al. 2011). Assim, na análise, considerou-se que os efeitos não aditivos correspondiam a 30% dos efeitos aditivos para altura e Dap e 66% para sobrevivência.

### Software

As soluções BLUP para altura, diâmetro e sobrevivência foram obtidas com o programa ASREML (Gilmour et al 1999).

### O modelo estatístico em ASREML

Os modelos de análise utilizados pelo software ASREML para as **variáveis de crescimento**, respectivamente altura (ALT) e diâmetro (DAP), foram os seguintes:

**ALT** !WT=W = mu Rep !r Rep.Bloco !GF 0.19 INDIV !GF 0.25 at(Tipo\_fam,2).FAM !GF 0.03 at(Tipo\_cl,1).ide(INDIV) !GF 0.05, assumindo uma variância do erro de 0.72

**DAP** !WT=W = mu Rep !r Rep.Bloco !GF 0.08 INDIV !GF 0.15 at(Tipo\_fam,2).FAM !GF 0.03 at(Tipo\_cl,1).ide(INDIV) !GF 0.04, assumindo uma variância do erro de 0.80

onde ALT e DAP são os méritos para altura e DAP, mu a média dos ensaios, Rep o efeito da repetição, Rep.Bloco o efeito dos blocos dentro de cada repetição (no caso de ensaios com blocos incompletos), INDIV o efeito genético aditivo de cada indivíduo, (Tipo\_fam,2).FAM o efeito da família se esta for de polinização controlada e (Tipo\_cl,1).ide(INDIV) o efeito do clone se o indivíduo estiver clonado.

Para estas duas análises recorreu-se à totalidade dos dados, independentemente destes terem origem em ensaios localizados em RM1 ou RM2.

Relativamente à **sobrevivência** esta variável foi avaliada pela presença ou ausência (por morte natural) da árvore a partir de um ano. As árvores desaparecidas até essa idade foram consideradas como *missing values* na análise, considerando-se portanto que as falhas iniciais (próximas da data de plantação) não são representativas desta variável mas resultam antes de problemas de outro tipo (atempamento das plantas, altura errada de plantação, etc.). Árvores mortas por animais ou máquinas também foram descartadas. Recorreu-se somente ao conjunto de dados obtidos nos ensaios pertencentes à zona RM2, já que é nesta grande região que ocorre a mortalidade essencialmente devida à secura/stress hídrico e que é esta variável para a qual estamos a caracterizar o material genético.

O modelo linear para a sobrevivência foi:

```
SOB !bin = mu Rep !r INDIV !GF 0.55 at(Tipo_fam,2).FAM !GF 0.10
at(Tipo_cl,1).ide(INDIV) !GF 0.25,
```

considerando uma variância do erro de 3.29 e onde SOB representa o vector de sobrevivência (definido como variável binomial) com uma distribuição logit de acordo com a transformação:  $logit(SOB) = \log (SOB/1-SOB) = a + b'x$ .

De modo a apresentar as soluções BLUP como desvios em relação a uma sobrevivência padrão (pontos percentuais em relação a essa média), aplicou-se a transformação  $SOB = 1/(1+e^{-b'x})$ , sendo que o referencial foi de 82% pois que foi o valor obtido para a grande média dos ensaios utilizados.

### O BLUP do Volume

Uma vez estimado o BLUP de altura e Dap, o BLUP de Volume Individual (isto é o volume em pé de uma árvore viva) pode ser calculado usando a teoria clássica dos índices de selecção ((Schneeberger et al. 1992)):

$$\mathbf{b} = \mathbf{G}_{11}^{-1} \mathbf{G}_{12}$$

[19]

em que  $\mathbf{b}$  são os coeficientes do índice,  $\mathbf{G}_{11}$  é a matriz de variâncias e co-variâncias genéticas (aditivas ou totais) entre as estimativas BLUP de Altura e Dap, e  $\mathbf{G}_{12}$  as co-variâncias genéticas entre estas estimativas e a variável *Volume*. As correlações genéticas e fenotípicas entre diâmetro, altura e volume utilizadas apresentam-se na Tabela 4.

**Tabela 4.** Estimativas de correlações genéticas (triangular superior) e fenotípicas (triangular inferior) entre variáveis.

	ALT	DAP	VOL
ALT		0,85	0,75
DAP	0,80		0,80
VOL	0,70	0,80	

Os valores de BLUP para Volume Individual podem ser estimados com base no vector  $\mathbf{b}$ :

$$\hat{u}_{VOL} = \mathbf{b}_1 \hat{u}_{ALT} + \mathbf{b}_2 \hat{u}_{DAP} \quad [20]$$

Note-se que as variâncias de Volume Individual na Tabela 3 (ALT e DAP, na realidade) estão expressas em unidades de desvio padrão, donde  $\hat{u}_{VOL}$  virá igualmente nessa escala. Os coeficientes  $\mathbf{b}$  estão resumidos na Tabela 5 (retirada do Del 1&2 de 2010).

**Tabela 5.** Coeficientes usados no cálculo dos BLUP de Volume individual, com base nas variâncias apresentadas para Altura e Dap e o pressuposto de correlações com volume dados na Tabela 4.

$u_{VOL}$	$\mathbf{b}_{ALT}$	$\mathbf{b}_{DAP}$	$\mathbf{b}_{alt}$ (apenas alt)	$\mathbf{b}_{dap}$ (apenas dap)
Aditivo	0,2256	0,5856	0,6708	0,8000
Clonal	0,2196	0,5635	0,6528	0,7698

### *BLUP de Volume por Hectare*

Uma vez determinado o BLUP de Volume Individual ( $\hat{u}_{Vol}$ ) e de Sobrevivência relativa a um determinado nível ( $X\%$ ) de sobrevivência de referência ( $\hat{u}_{Sob|X\%}$ ), o BLUP para Volume por Hectare pode ser aproximado pela expressão:

$$\hat{u}_{Vol/ha} = \hat{u}_{Vol} \times CV_{Vol} \times \frac{\hat{u}_{Sob|X\%}}{X\%} \quad [21]$$

em que  $CV_{Vol}$  é o coeficiente de variação de Volume Individual. Nas últimas análises BLUP, considerou-se  $CV_{Vol}=60\%$ .

Usando a Equação 21, os BLUP de Volume por Hectare vêm expressos em termos percentuais, isto é acima ou abaixo da média geral (que é de 1.00) e que como vimos corresponde à média de todos os fundadores do programa de melhoramento, aliás do mesmo modo que os BLUP para altura e Dap. Assim,  $\hat{u}_{Vol/Ha}=1.00$  significa que o mérito genético da árvore é semelhante à média de todas as árvores fundadoras do programa de melhoramento.

Por fim, o resultado que se apresenta em desvios padrão é multiplicado por 0,60 de forma a que resulte em valores percentuais. O ganho (ou perda) em volume/hectare (Vol/ha) resulta da multiplicação direta dos ganhos (ou perdas) do volume individual (vol\_unit) e da sobrevivência (Sob), de acordo com o esquema da Figura 4.

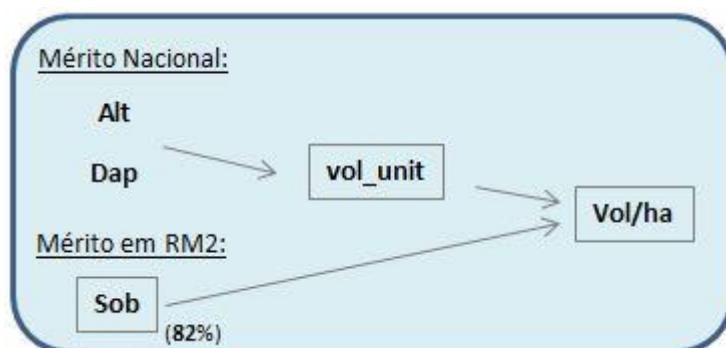


Figura 4. Esquema da transformação dos méritos genéticos (dados em desvios padrão, e posteriormente transformados em percentagem) nos índices de seleção volume individual e volume/ha (percentagem).

No final do processo é obtido um ganho genético para volume individual e volume/hectare para cada indivíduo do programa de melhoramento e por cada região de sobrevivência considerada (uma região cuja sobrevivência média seja próxima de 100% e outra onde a sobrevivência seja próxima da obtida no conjunto de ensaios pertencentes a RM2 da base de dados usada, isto é 82%), na base dos quais se podem fazer as melhores escolhas de materiais.

## Resultados

A análise BLUP permitiu estimar o mérito genético para altura, diâmetro e sobrevivência em 212805 indivíduos dos programa do RAIZ e ALTRI. Os BLUP de altura e Dap foram integrados num índice que expressa o mérito para volume individual da árvore média desse genótipo para a árvore média da população base dos dois programa (em percentagem). O BLUP de sobrevivência, obtido numa distribuição binomial, foi convertido para um valor de sobrevivência correspondente à grande média de todos os ensaios. O BLUP de sobrevivência de cada indivíduo, também em percentagem, está pois reportado relativamente à grande média de 82%.

**Tabela 5.** Valores mínimos e máximos para os três índices estimados e número de indivíduos por intervalo de variação para cada índice (entre menor a 70% e superior a 70%).

intervalos	vol_indiv [ -84 ; 69 ]	sobrev. [ -90 ; 22 ]	Vol/há [ -94 ; 91 ]
menor que -70%	8	21	44
- 70% ; - 50%	27	66	126
- 50% ; - 30%	498	696	1440
- 30% ; - 10%	9120	17425	14709
- 10% ; + 10%	100776	165845	84275
+10% ; + 30%	90743	28752	84321
+ 30% ; + 50%	11418	-	25359
+ 50% ; + 70%	215	-	2367
superior a 70%	-	-	164
total de individuos	212805	212805	212805

A Tabela 5 ilustra a dispersão dos 212805 genótipos pelas 9 classes em que se fraccionou a amplitude observada para cada índice. Assinala-se a classe intermédia, onde caiem grande parte dos indivíduos, especialmente ao nível da sobrevivência. Ao nível do volume individual e, por inerência do volume/ha, nota-se uma prevalência das classes centrais e superiores a esta, denotando uma melhoria global da população em estudo como efeito dos programas de melhoramento em curso de há anos a esta parte.

### Genótipos com vol/ha > 50%

Verifica-se que há 2531 genótipos (2367+164, na Tabela 5) com valor de VOL/HA superior a 50%. Destes, existem 93 que têm esse valor totalmente deduzido por inferência a partir dos seus relacionados genéticos pois que não possuem qualquer árvore medida. Podemos portanto aceitar que somente 2438 genótipos devem merecer neste momento alguma atenção sendo que dois deles têm origem na ENCE (ODIEL e TINTO). Restam assim 2436 genótipos, 1533 são de origem ALTRI e 891 de origem RAIZ, existindo ainda 12 (clones) híbridos RAIZ com origem RAIZ.

Como se pode observar na Tabela 6 a população *E. globulus* é constituída por um genótipo F0, portanto com progenitores desconhecidos, bem replicado (60 ramegos em diversos ensaios) e com valor estimado de 54%. Além deste, existem oito de que se conhece somente a mãe (e replicados em média através de 17 cópias) e 2415 de pedigree completo mas em geral pouco replicados (em termos médios com 3 plantas por genótipo) e apresentando um valor genético de cerca de 57% para Vol/ha.

**Tabela 6.** Número de genótipos *E. globulus* e híbridos com mérito genético para Vol/ha superior a 50%, respectiva representatividade e tipo de pedigree.

Materiais seleccionados		Pedigree conhecido			Total / média
		F0	só Mãe	Mãe e Pai	
E. globulus	nº total de genótipos	1	8	2415	2424
	nº médio de cópias/genótipo	60	17	3	6
	média do ganho genético de VOL/HA (%)	54%	57%	57%	57%
híbridos	nº total de genótipos	-	-	12	12
	nº médio de cópias/genótipo	-	-	129	129
	média do ganho genético de VOL/HA (%)	-	-	64%	64%

Contudo deve realçar-se que a seleção a médio/longo prazo de novos materiais operacionais se fará essencialmente dentro da população de 2415 genótipos através da identificação dos melhores, sua clonagem intensa para reforço em ensaios de campo e aferição mais rigorosa do seu potencial e paralela avaliação da capacidade de enraizamento.

Neste grupo, e numa perspectiva de curto prazo encontram-se 178 genótipos razoavelmente bem representados (em média apresentam 25 plantas dispersas por vários ensaios) e cujo valor global para Vol/ha é de 61%. Constituem desta forma um recurso onde será plausível identificar clones com capacidade para operacionalizar a curto prazo.

Acrescentam-se ainda ao grupo de materiais *E. globulus* atrás referido, 12 clones híbridos de combinações diversas envolvendo essencialmente as espécies *E. grandis*, *E. rufida*, *E. saligna*, *E. tereticornis* e *E. globulus*. Podem igualmente vir a ser opções para uso florestal alargado e de uso a curto prazo pois que a sua representatividade também é bastante boa (em média cerca de 129 plantas por clone). Tal como para os anteriores clones *E. globulus*, estes também devem ser testados para enraizamento e qualidade da madeira já que serão os factores mais limitante para a sua operacionalização.

#### Genótipos para estudo nos diversos ensaios do Projecto

Na Tabela 7 listam-se os materiais que o Projecto usará nas fases seguintes, nomeadamente nos testes de tolerância ao frio e secura e ainda nos testes dos factores de enraizamento.

Era reconhecida a necessária concessão que se teria de fazer entre os melhores indivíduos listados na análise BLUP (e referidos atrás, designadamente os 178 clones) e os que poderiam suportar os testes previstos em Projecto. Por exemplo, quaisquer testes de enraizamento obrigam há existência em parque de pés-mãe desse clone e com um número mínimo de plantas de forma a produzirem todas as estacas necessárias aos tratamentos dos ensaios. Outro exemplo é sobre os clones a testar para a secura que terão de estar integrados, em simultâneo, nos mesmos ensaios.

Outros critérios, por exemplo no caso dos testes de frio e, agora, com vista à inclusão de materiais, são os lotes/clones de referência como sejam o lote de *E. nitens* (MacAlister), o clone R85058 de *E. benthamii* e os híbridos de *E. dalrympleana*, espécies conhecidas de maior resistência ao frio; neste caso o seu interesse justificava a não existência de informação para crescimento e sobrevivência.

---

Todas estas contingências levam a que as escolhas que integram os futuros ensaios não sejam sempre as mesmas nem sempre as constantes na listagem “top” produzida pela análise BLUP.

Assim, pode observar-se na Tabela 7 que, em média, os materiais a usar nos diversos ensaios do Projecto apresentam valores elevados em ganho genético para produtividade florestal (Vol/ha igual a 39%), alcançado através dos ganhos parcelares em volume individual (+ 28%) e sobrevivência (+ 8%).

Em termos de densidade da madeira e rendimento em pasta os valores apresentados resultam directamente de informação interna dos parceiros obtida nos seus programas de melhoramento. Pode no decurso dos trabalhos vir a ser melhorada e deve ser tida em conta na seleção definitiva dos materiais no final do Projecto.

Pode observar-se que, em média, este grupo é muito próximos do padrão *E. globulus*, compensando alguma perda em densidade (- 4kg equivale a -1% da média *E. globulus* que é 540 kg/m<sup>3</sup>) com um maior ganho em rendimento (+ 0,4 pontos percentuais equivale a + 1% relativamente à média *E. globulus* que é 54.5 %).

## Outra informação

Fez-se uma apresentação pública deste trabalho, através de documento em texto e apresentação oral, em fórum da especialidade promovido pela TECNICELPA, conferência XXIV em Tomar, Outubro 2018. Anexa-se a referida documentação.

**Tabela 7.** Genótipos incluídos nos testes de frio, secura e enraizamento e respectivos méritos para volume individual, sobrevivência, volume/ha, densidade e rendimento da madeira.

Clone / lote	Espécie	Teste	Vol_ind (%)	Sob (%)	V/Ha (%)	Dens (Kg)	Rend (pp)
A0050708007	<i>E. globulus</i>	frio + secura + enraiz	28	11	42	-	-
A007086088	<i>E. globulus</i>	frio	15	-6	8	-	-
A0232209003	<i>E. globulus</i>	frio + secura	17	0	17	-	-
A10024	<i>E. globulus</i>	frio + secura	21	11	34	-	-
A1005	<i>E. globulus</i>	frio + secura + enraiz	21	6	28	-	-
A1106	<i>E. globulus</i>	frio	17	1	18	-	-
A1205	<i>E. globulus</i>	frio	-14	5	-10	-	-
A1319	<i>E. globulus</i>	frio + secura	42	-1	41	-	-
A40056	<i>E. globulus</i>	frio	12	12	26	-	-
A40090	<i>E. globulus</i>	frio	9	2	11	-	-
A40338	<i>E. globulus</i>	frio + enraiz	37	6	45	-	-
A50019	<i>E. globulus</i>	frio	14	7	22	-	-
A50051	<i>E. globulus</i>	frio	8	9	18	-	-
A50053	<i>E. globulus</i>	frio	24	20	49	-	-
A50223	<i>E. cypellocarpa x E. globulus</i>	frio	15	21	39	-	-
R100074002	<i>E. globulus</i>	frio + secura + enraiz	39	-2	37	16	3,1
R100170003	<i>E. globulus</i>	frio	24	4	29	6	1,2
R100830025	<i>E. globulus</i>	frio	56	12	75	-20	1,1
R100840012	<i>E. globulus</i>	frio	35	13	52	-5	1,8
R100850009	<i>E. globulus</i>	frio + enraiz	59	12	78	-20	0,4
R100850009	<i>E. globulus</i>	frio	59	12	78	-20	0,4
R100890020	<i>E. globulus</i>	frio	39	8	50	7	-0,1
R102051011	<i>E. globulus</i>	frio + secura	43	3	48	27	1,6
R102062014	<i>E. globulus</i>	frio	28	13	44	17	0,6
R1113	<i>E. globulus</i>	frio	23	4	27	-42	-0,8
R1214	<i>E. globulus</i>	secura	29	6	37	-18	0,7
R77000	<i>E. grandis x E. globulus</i>	frio + secura + enraiz	58	17	85	-17	-1,4
R77010	<i>E. saligna x E. rufa</i>	frio + enraiz	51	21	82	21	-2,0
R77105	<i>E. nitens x E. globulus</i>	frio	-30	-11	-38	8	0,0
R82405	<i>E. tereticornis x E. globulus</i>	secura	56	22	90	-8	0,1
R85005	<i>E. maideni x E. urophylla</i>	frio	40	16	61	-19	0,1
EPIEDRAS	<i>E. globulus</i>	frio	21	3	25	-	-
R85058	<i>E. benthamii</i>	frio	-	-	-	-	-
lote_MacAlister	<i>E. nitens</i>	frio	-	-	-	-	-
JARRAMA	<i>E. globulus</i>	frio	-	-	-	-	-
CORUMBEL	<i>E. globulus</i>	frio	-	-	-	-	-
MURTIGA	<i>E. globulus</i>	frio	-	-	-	-	-
R102122083	( <i>E. dalrympleana x E. globulus</i> ) x <i>E. globulus</i>	frio	-	-	-	-	-
R102122097	( <i>E. dalrympleana x E. globulus</i> ) x <i>E. globulus</i>	frio	-	-	-	-	-
valores médios para os clones/lotes em estudo			28	8	39	-4	0,4

## Anexo 1

Lista de ensaios de suporte à análise

**Lista de ensaios usados na análise BLUP e pertencentes à Região de Melhoramento RM 1**

com indicação das variáveis avaliadas, número de registo e idade respectiva.

Código ensaio	ALTURA			DAP			SOBREVIVÊNCIA		
	Id	Genotipos	Registos	Id	Genotipos	Registos	Id	Genotipos	Registos
R2	11,3	22	218	11,3	22	255	11,3	22	319
R5	5,6	66	656	10,2	66	613	10,2	69	715
R7	11,4	52	583	11,4	52	583	11,4	52	652
R11	12,7	63	806	12,7	63	806	12,7	54	868
R18	12,0	43	313	12,0	43	313	12,0	44	386
R21	7,3	98	380	9,7	96	307	9,7	105	792
R23	4,5	371	371	4,5	371	371	4,5	540	540
R26				9,7	824	840	9,7	1114	1150
R32				5,6	3233	3324	5,6	3673	3780
R34				5,0	820	916	5,0	938	1057
R38				5,5	1728	1728	5,5	2270	2270
R71	4,6	137	1047	8,6	136	996	8,6	140	1249
R72				8,6	343	381	8,6	530	582
R79	7,0	71	628	7,0	71	628	7,0	72	690
R80	4,2	216	1250	8,2	215	1133	8,2	224	1877
R86	10,7	15	192	10,7	15	192	10,7	15	223
R87	9,6	9	134	9,6	9	134	9,6	9	135
R88	3,9	14	187	3,9	14	187	3,9	14	210
R89	11,8	15	203	11,8	15	203	11,8	15	225
R90	12,4	10	122	12,4	10	122	12,4	10	129
R91	7,6	15	135	7,6	15	135	7,6	15	136
R92	11,3	10	145	11,3	10	145	11,3	10	146
R95	2,0	15	225	2,0	15	225	2,0	15	225
R96	8,5	10	130	8,5	10	130	8,5	10	142
R97	8,6	10	144	8,6	10	144	8,6	10	150
R98	10,5	10	133	10,5	10	133	10,5	10	143
R100	12,2	10	123	12,2	10	123	12,2	10	147
R104	10,0	16	211	10,0	16	211	10,0	16	240
R107	11,3	10	120	11,3	10	120	11,3	10	130
R117	10,2	10	136	10,2	10	136	10,2	10	149
R118	7,2	10	278	7,2	669	964	7,2	741	1054
R119	9,8	10	140	9,8	10	140	9,8	10	144
R121	8,5	15	222	8,5	15	222	8,5	15	225
R122	6,5	10	144	6,5	10	144	6,5	10	150
R123	8,6	14	179	8,6	14	179	8,6	14	210
R124	3,9	14	198	3,9	14	171	3,9	14	210
R125	10,3	13	148	10,3	13	148	10,3	14	207
R126	10,8	10	138	10,8	10	138	10,8	10	145

Código ensaio	ALTURA			DAP			SOBREVIVÊNCIA		
	Id	Genotipos	Registros	Id	Genotipos	Registros	Id	Genotipos	Registros
R127	9,5	10	121	9,5	10	121	9,5	10	150
R128	10,5	19	185	10,5	19	185	10,5	19	214
R129	8,9	15	121	8,9	15	121	8,9	15	220
R130	10,3	10	147	10,3	10	147	10,3	10	148
R136	10,8	29	29	10,8	137	137	10,8	145	145
R141	5,7	201	201	5,7	201	201	5,7	225	225
R142	5,7	209	209	7,6	197	197	7,6	219	219
R147	9,7	130	130	11,3	120	120	11,3	131	131
R153	8,6	74	74	10,5	67	67	10,5	71	71
R154	10,3	134	134	10,3	134	134	10,3	149	149
R157	5,5	159	159	5,5	159	159	5,5	225	225
R159	8,5	49	49	10,3	52	52	10,3	73	73
R160	8,6	70	70	8,6	70	70	8,6	75	75
R161	8,5	216	216	8,5	216	216	8,5	225	225
R162	9,8	135	135	9,8	135	135	9,8	150	150
R163	6,6	135	135	10,2	126	126	10,2	147	147
R169	12,2	118	118	12,2	118	118	12,2	150	150
R171	10,5	132	132	10,5	132	132	10,5	142	142
R175	7,3	146	146	11,3	68	68	11,3	68	68
R176	12,4	133	133	12,4	133	133	12,4	142	142
R177	3,9	57	57	3,9	57	57	3,9	65	65
R178				10,7	173	173	10,7	225	225
R187	3,2	271	1309	9,0	271	1170	9,0	251	1528
R188	9,0	242	309	9,0	242	309	9,0	285	367
R193	10,0	182	1256	10,0	182	1256	10,0	191	1443
R194	6,5	352	352	6,5	352	352	6,5	368	368
R197	10,3	122	1107	10,3	122	1107	10,3	132	1257
R204	9,3	153	364	9,3	153	364	9,3	179	477
R206	8,2	193	448	8,2	193	447	8,2	208	538
R221	7,6	220	604	7,6	220	606	7,6	234	707
R225	12,5	169	691	12,5	169	695	12,5	171	715
R240	11,0	170	528	11,0	170	528	11,0	177	570
R255	3,3	217	954	9,3	214	884	9,3	218	1010
R262	9,1	276	1189	9,1	276	1190	9,1	286	1245
R263_I	4,2	525	1139	4,2	525	1139	4,2	536	1200
R263-II	7,0	478	740	7,0	478	740	7,0	497	785
R264	7,0	402	454	7,0	403	455	7,0	447	514
R273	8,6	225	672	8,6	226	674	8,6	227	702
R281	10,9	102	500	10,9	102	500	10,9	104	524
R290	5,0	186	453	7,0	174	438	7,0	219	521

Código ensaio	ALTURA			DAP			SOBREVIVÊNCIA		
	Id	Genotipos	Registros	Id	Genotipos	Registros	Id	Genotipos	Registros
R292	7,0	195	562	7,0	195	561	7,0	206	609
R304	4,7	107	429	4,7	106	428	4,7	115	507
R318	6,5	106	379	6,5	106	379	6,5	115	445
R321	4,4	118	545	7,6	118	537	7,6	119	575
R326	7,2	86	404	7,2	86	404	7,2	89	435
R337	5,1	82	551	5,1	82	551	5,1	85	603
R338	2,6	158	544				2,6	160	549
R355	4,1	178	372	4,1	178	372	4,1	200	442
R359	4,4	395	465	4,4	395	465	4,4	428	500
R364	3,9	57	557	3,9	57	557	3,9	58	575
R365	4,0	63	428	4,0	63	428	4,0	64	488
R367	3,7	65	607	3,7	65	607	3,7	67	645
R369	3,9	134	997	3,9	134	1000	3,9	134	1083
R370	3,2	60	536	3,2	60	536	3,2	60	563
A30	10,6	538	562	10,6	596	623	10,6	2006	2089
A31	10,6	37	53	10,6	41	58	10,6	178	828
A69	4,0	568	1204	4,0	593	1239	4,0	715	1704
A71							3,9	697	1663
A78	17,4	57	554	17,4	57	557	17,4	61	600
A82	15,1	46	457	15,1	48	466	15,1	61	632
A85	9,1	2234	2234	9,1	2234	2234	9,1	2858	2858
A89	15,3	26	172	15,3	27	209	15,3	44	420
A90	8,7	68	787	8,7	68	788	8,7	83	1083
A91	12,8	27	155	12,8	29	185	12,8	48	570
A92	12,8	49	390	12,8	52	448	12,8	69	880
A125				12,7	355	355	12,7	951	951
A131	6,0	2407	2407	6,0	2424	2424	6,0	2604	2604
A141	11,8	2661	2661	11,8	2661	2661	11,8	3120	3120
A151	12,3	692	1008	12,3	722	1049	12,3	1282	1920
A153	12,3	988	1412	12,3	1079	1526	12,3	1278	1800
A156	12,1	866	1213	12,1	874	1225	12,1	1279	1830
A176	11,7	101	322	11,7	109	399	11,7	144	891
A184	5,9	6506	6506	5,9	6526	6526	5,9	8076	8076
A190	11,1	2544	2544	11,1	2696	2696	11,1	5335	5335
A195	9,9	4185	4185	9,9	4578	4578	9,9	6197	6197
A198	9,9	3829	3829	9,9	4168	4168	9,9	6129	6129
A200							9,7	6231	6231
A202	9,8	4113	4113	9,8	4334	4334	9,8	6183	6183
A213	7,9	7858	7858	7,9	7964	7964	7,9	9525	9525
A217	12,0	1180	1180	12,0	1202	1202	12,0	1358	1358

Código ensaio	ALTURA			DAP			SOBREVIVÊNCIA		
	Id	Genotipos	Registros	Id	Genotipos	Registros	Id	Genotipos	Registros
A241	12,7	929	929	12,7	1104	1104	12,7	1357	1357
A245	8,9	344	2258	8,9	347	2277	8,9	393	2727
A254							6,9	1231	1231
A259	6,8	1202	1202	6,8	1208	1208	6,8	1710	1710
A270	14,7	977	977	14,7	977	977	14,7	1092	1092
A271							8,8	380	1661
A285	12,7	252	1180	12,7	280	1468	12,7	316	1917
A289	8,0	11	12	8,0	11	12	8,0	326	1951
A291	7,9	282	1413	7,9	288	1427	7,9	329	1967
A303	6,1	3417	3417	6,1	3507	3507	6,1	3986	3986
A701							10,5	942	942
A702							10,5	215	937
A715							3,3	268	1428
A725	2,9	105	205	2,9	105	208	2,9	695	1814
A726	6,1	561	1406	6,1	602	1471	6,1	712	1862
A762	2,1	1104	1978				2,1	1277	2336

Lista de ensaios usados na análise BLUP e pertencentes à Região de Melhoramento RM 2  
com indicação das variáveis avaliadas, número de registo e idade respectiva.

Código ensaio	ALTURA			DAP			SOBREVIVÊNCIA		
	Id	Genotipos	Registos	Id	Genotipos	Registos	Id	Genotipos	Registos
R1	10,7	20	100	10,7	20	100	10,7	23	216
R3	6,8	24	168	6,8	24	168	6,8	24	240
R4	7,8	27	231	7,8	27	231	7,8	27	270
R8	7,8	51	541	7,8	51	541	7,8	51	617
R9	11,5	44	254	11,5	44	254	11,5	49	538
R10	7,6	58	886	7,6	58	886	7,6	58	1135
R12	11,9	41	522	11,9	41	522	11,9	42	696
R13	10,3	79	481	10,3	79	480	10,3	82	742
R22	3,8	436	436	3,8	436	436	3,8	507	507
R25				6,4	107	108	5,0	305	317
R28	2,7	2131	2131	9,8	1649	1649	9,8	2921	2921
R29				5,7	3029	3029	5,7	4305	4305
R35				7,4	1182	1323	7,4	1766	1984
R75				5,4	113	120	5,4	276	299
R78	6,4	80	668	6,4	80	668	6,4	81	1010
R81	9,4	15	181	9,4	15	181	9,4	15	218
R82	8,1	10	145	8,1	517	666	8,1	760	1079
R94	10,5	10	91	10,5	10	91	10,5	10	143
R101	5,6	15	137	5,6	15	137	5,6	15	225
R102	7,4	10	141	7,4	10	141	7,4	10	150
R103	8,8	15	83	8,8	15	83	8,8	15	223
R108	3,7	14	168	3,7	14	154	3,7	14	210
R109	8,1	10	132	8,1	10	132	7,0	10	300
R110	2,7	35	1017	8,6	35	829	8,6	35	980
R111	10,2	75	383	10,2	75	383	10,2	81	653
R113	5,3	25	625	6,8	25	618	6,8	25	652
R114	5,8	10	241	5,8	10	241	5,8	41	329
R115	5,0	36	808	8,5	36	778	8,5	36	1008
R116	4,6	726	1029	4,6	726	1029	4,6	756	1080
R120	6,4	10	133	6,4	10	133	6,4	10	150
R131	9,1	10	125	9,1	10	125	9,1	10	150
R133	8,2	15	147	8,2	15	147	8,2	15	211
R137				9,4	171	171	10,0	225	225
R145	5,6	156	156	5,6	156	156	5,6	225	225
R155	8,2	180	180	8,2	180	180	8,2	219	219
R166	3,7	61	61	3,7	61	61	3,7	75	75
R167	4,5	554	571	4,5	545	562	4,5	751	780
R173	8,5	51	51	10,5	46	46	10,5	72	72
R184	9,2	172	992	9,2	172	992	9,2	178	1153
R186	9,3	308	365	9,3	308	365	9,3	393	455

Código ensaio	ALTURA			DAP			SOBREVIVÊNCIA		
	Id	Genotipos	Registros	Id	Genotipos	Registros	Id	Genotipos	Registros
R198	4,1	178	893	6,2	177	870	6,2	182	974
R199				6,2	353	354	6,2	414	415
R210	7,0	156	311	7,0	156	311	7,0	167	367
R211	10,2	36	435	10,2	36	435			
R212				11,3	2461	2461	10,0	3198	3198
R214	3,7	57	189	6,7	57	178	6,7	59	223
R215	3,6	256	375	3,6	256	375	3,6	301	531
R216	6,8	132	448	6,8	132	448	6,8	137	800
R217	6,8	77	243	6,8	77	243	6,8	80	473
R219	8,6	130	429	8,6	130	430	8,6	139	546
R220	8,1	49	256	8,1	49	256	8,1	51	283
R222	5,2	717	1721	9,3	564	1027	9,3	797	3245
R223	12,1	924	1798	12,1	924	1798	12,1	1087	2058
R236	10,3	179	425	10,3	179	427	10,3	213	690
R239	10,1	385	1331	10,1	385	1331	10,1	417	1585
R246	11,2	224	604	11,2	224	604	11,2	247	688
R253	11,1	273	1202	11,1	273	1202	11,1	275	1245
R254	10,9	280	1055	10,9	280	1055	10,9	287	1229
R268	8,5	73	313	8,5	73	313	8,5	76	522
R269	4,5	315	1132	6,3	315	1126	6,3	315	1202
R272	11,9	78	618	11,9	78	618	11,9	78	685
R274	10,6	222	490	10,6	222	490	10,6	231	526
R282	8,8	62	372	8,8	62	372	8,8	65	400
R283	8,8	137	318	8,8	137	318	8,8	142	340
R284	7,0	122	350	7,0	122	350	7,0	132	516
R285	7,3	111	382	11,2	110	369	11,2	126	487
R286	11,0	209	286	11,0	209	286	11,0	241	346
R287	7,2	132	376	7,2	131	375	7,2	136	405
R289	10,1	94	389	10,1	94	387	10,1	97	436
R291	7,1	191	594	7,1	191	594	7,1	208	650
R295	2,3	140	399				2,3	144	421
R296	7,2	15	191	7,2	15	191	7,2	16	213
R297	8,3	24	299	8,3	24	299	8,3	25	358
R298	8,1	215	624	8,1	215	624	8,1	223	651
R299	8,9	113	311	8,9	113	311	8,9	125	356
R300	3,3	304	528	6,2	289	494	6,2	308	543
R301	8,9	193	434	8,9	193	434	8,9	201	456
R302	2,8	111	468	2,8	111	468	2,8	116	528
R305	4,6	123	570	4,6	123	570	4,6	124	615
R309	4,6	92	424	7,3	90	409	7,3	93	460

Código ensaio	ALTURA			DAP			SOBREVIVÊNCIA		
	Id	Genotipos	Registos	Id	Genotipos	Registos	Id	Genotipos	Registos
R316	6,2	117	391	6,2	117	391	6,2	122	433
R320	6,0	189	669	6,0	188	668	6,0	205	761
R324	6,2	115	492	6,2	115	492	6,2	117	559
R330	3,4	43	365	3,4	43	360	3,4	44	476
R339	4,7	92	825	6,0	79	607	6,0	97	955
R340	2,0	149	718	6,0	138	660	6,0	153	783
R344	3,5	183	1027	3,5	183	1027	3,5	185	1456
R345	2,0	188	1056				2,0	196	1131
R348	2,6	224	439				2,6	249	482
R349	2,8	201	442				2,8	238	498
R351				4,3	60	536	4,3	62	609
R352	5,7	55	297	5,7	55	297	5,7	57	383
R353	3,0	91	441	5,6	99	417	5,6	113	508
R354	2,7	77	754	5,2	74	677	5,2	78	823
R356	4,8	79	707	4,8	79	707	4,8	82	820
R360	4,3	251	298	4,3	251	298	4,3	355	437
R361	4,1	312	446	4,1	312	446	4,1	420	582
R363	4,3	65	550	4,3	65	550	4,3	65	647
R366	4,2	65	541	4,2	65	542	4,2	67	656
A1	11,7	656	656	11,7	674	674	11,7	1004	1004
A3	11,6	164	684	11,6	170	695	11,6	214	982
A15	11,0	172	802	11,0	175	839	11,0	199	1182
A17	5,3	202	1074	5,3	202	1079	5,3	274	1608
A26	5,8	3618	3704	5,8	3639	3725	5,8	3942	4033
A37	10,7	205	862	10,7	214	881	10,7	231	1044
A39	10,6	222	922	10,6	225	932	10,6	233	998
A43	11,2	2539	2607	11,2	2616	2684	11,2	3749	3841
A44	10,6	218	908	10,6	220	931	10,6	247	1140
A57	10,0	120	736	10,0	122	754	10,0	123	802
A65	4,2	160	1157	4,2	161	1167	4,2	209	1766
A68	3,9	233	540	3,9	272	606	3,9	714	1702
A93	5,1	133	639	5,1	144	755	5,1	177	1522
A126	14,9	180	1118	14,9	187	1352	14,9	220	2190
A127	12,1	124	421	12,1	143	543	12,1	169	1658
A128	7,8	91	879	7,8	91	894	7,8	96	1057
A129	7,8	56	307	7,8	56	311	7,8	58	336
A133				9,1	8	136	9,1	8	161
A135	11,9	2285	2285	11,9	2280	2280	11,9	2910	2910
A139	11,8	1839	1839	11,8	1837	1837	11,8	2910	2910
A143	11,8	2817	2817	11,8	2816	2816	11,8	3120	3120

Código ensaio	ALTURA			DAP			SOBREVIVÊNCIA		
	Id	Genotipos	Registros	Id	Genotipos	Registros	Id	Genotipos	Registros
A145	7,7	1236	1498	7,7	1266	1538	7,7	2598	3120
A146	10,0	1012	1141	10,0	1931	2195	10,0	2533	2910
A147	9,1	1924	2500	9,1	1953	2535	9,1	2424	3120
A155	6,3	2860	2860	6,3	2877	2877	6,3	3540	3540
A158	6,4	3272	3272	6,4	3295	3295	6,4	3540	3540
A170	10,1	5234	5234	10,1	5317	5317	10,1	7729	7729
A173	12,0	5	116	12,0	5	125	12,0	5	155
A175	16,7	46	215	16,7	47	226	16,7	64	336
A181	11,9	5623	5623	11,9	5639	5639	11,9	7779	7779
A186	7,7	4218	4218	7,7	4222	4222	7,7	6085	6085
A193	9,8	5168	5168	9,8	5257	5257	9,8	6038	6038
A205	9,8	7111	7111	9,8	7455	7455	9,8	9590	9590
A215	8,1	38	259	8,1	39	266	8,1	40	307
A221	8,2	36	265	8,2	45	325	8,2	67	517
A230							14,2	1300	1300
A247	11,0	1413	1413	11,0	1431	1431	11,0	1701	1701
A255	8,8	62	481	8,8	62	485	8,8	69	572
A266	11,6	745	745	11,6	764	764	11,6	944	944
A277	14,2	257	891	14,2	268	927	14,2	380	1682
A287	11,0	286	1274	11,0	287	1305	11,0	326	1941
A294	6,3	5269	5269	6,3	5384	5384	6,3	7949	7949
A296	10,8	103	689	10,8	104	693	10,8	107	756
A297	10,8	103	681	10,8	103	682	10,8	107	756
A300	11,6	180	836	11,6	182	847	11,6	201	937
A708	4,0	498	1346	4,0	535	1449	4,0	647	1728
A709	2,9	389	1096				2,9	647	1728
A716	3,3	180	808	3,3	180	811	3,3	301	1704
A717	3,3	87	734	3,3	90	799	3,3	94	864
A722	6,9	400	1179	6,9	514	1369	6,9	722	1872
A753	2,1	432	594				2,1	1262	2349

## TECNICELPA, Outubro 2018, Aveiro

Texto

Apresentação

## THE GAINS ACHIEVED FROM EUCALYPTUS GLOBULUS TREE IMPROVEMENT PROGRAMS IN PORTUGAL. A JOINT GENETIC ANALYSIS OF RAIZ AND ALTRI TRIALS

**Nuno Borralho<sup>1</sup>\*, João Pedro Pina<sup>3</sup>, José Araujo<sup>1</sup>, Luis Leal<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> RAIZ – Instituto de Investigação da Floresta e Papel, Quinta de São Francisco, Apartado 15, 3801-501 Eixo, Portugal

<sup>2</sup> Altri Florestal, S.A., Quinta do Furadouro, 2510-582 Olho Marinho, Portugal

<sup>3</sup> Cistus, Floresta e Ambiente Lda, Consultoria Florestal, R. Dom Tomás de Almeida, Lt 5A  
2510-090 Óbidos

\* nuno.borralho@thenavigatorcompany.com

### SUMMARY

Since the very first steps taken to improve the genetic quality of eucalypts in Portugal, exactly 50 years ago, much has been achieved in terms of the genetic quality of seeds and clones used by the industry, as a result of careful breeding, testing and selection work, carried out over these years, independently, by RAIZ (ex Portucel and Soporcet) and ALTRI (ex Celbi and Stora Enso)

Both breeding populations are now entering their third cycle, covering hundreds of test sites and ranking over 200,000 individual trees, each one measured for growth, survival and wood quality. Genetic theory and extensive operational evidence have shown both in Portugal and around the world, that genetic improvement programs, whether based on elite clones or families, are expected to result in significant gains in productivity. Improving the genetic stock of newly established plantations is a key element to increase the country's supply of wood.

In order to improve estimates of gains and quantify the potential for further improvements of RAIZ and ALTRI breeding programs, a recent joint genetic analysis across both programs was recently completed for growth and survival. Such analysis represents a significant step towards a more robust evaluation of the genetic merit of elite selections in the two programs, enabling a straightforward comparison between the merits of clones and seeds across the two populations, as well as a few clones from ENCE's program.

The two breeding populations have been founded by over 1,600 base parents (from where all subsequent generations have emerged), some having been selected as plus trees in local stands in Portugal and others introduced in the late 80s from several native provenances in Australia and elsewhere. This constitutes a solid foundation for ensuring long term genetic progress and diversity.

The genetic analysis now carried out was based on Best Linear Unbiased Prediction methods, and fitted a dataset covering over 600,000 measurements of diameter, height and survival, across more than 250 sites with ages ranging from 5 thru 14. Additive, family and clonal genetic merits were able to be estimated for individual tree volume and survival. The results showed that genetic merit of very best individuals (top 100 in 150,000) in the two breeding populations reached around 60 to 80%, with a few individuals nearly doubling productivity when compared with unimproved seedlings. This is a substantial gain compared with the merit of current operational clones and full-sib families, which is estimated at around 30 to 40%.

The implications of these results to the choice of best deployment strategies, including the relative merits of clones and seedlings, and the opportunities to increase the availability of improved plants to third parties reforestation efforts will be discussed.

**Keywords:** eucalypts, breeding, clones, seed orchards, genetic gains

### INTRODUCTION

Since the very first steps taken to improve the genetic quality of eucalypts in Portugal, exactly 50 years ago, much has been achieved in terms of the genetic quality of seeds and clones used by the

industry, as a result of careful breeding, testing and selection work carried out over the years, independently, by RAIZ (ex Portucel and Soporcet) and ALTRI (ex Celbi and Stora Enso). Both breeding populations have now entered their third cycle, covering hundreds of test sites and including over 150,000 trees, each one measured for growth, survival and often, wood quality. Genetic theory and extensive operational evidence have shown that such genetic improvement efforts, whether based on elite clones or families, can and have resulted in significant gains in productivity. All industry's recent afforestation projects have used improved genetic stocks. The challenge remains to extend the availability of these genetic stocks to all newly established plantations by private growers. This would be a key element to increase the country's eucalyptus wood supply.

A recent joint genetic analysis across the RAIZ and ALTRI programs, which up until now have been developed independently, was recently completed. This analysis represents a significant step towards a more robust evaluation of the genetic merit of elite selections in the two programs, enabling a straightforward comparison between clones and seeds and opening the possibility to identify a pool of unrelated elite material for future breeding and deployment.

The implications of these results to the choice of best strategies to produce and deliver improved plants, including clones and seedlings, either through controlled pollination or seed orchards, and the opportunities to increase the availability of improved plants to third parties reforestation efforts will be discussed.

## MATERIAL and METHODS

### *The RAIZ and ALTRI Base Populations*

The *Eucalyptus globulus* ancestors (or base parents), from which all existing progenies from both RAIZ and ALTRI programs can be traced back, have two broad origins: (i) from known mother trees selected in native stands in Australia (henceforth of assigned native races) and (ii) from plus trees selected in local stands in Portugal (of unknown ancestral origins). Table 1 summarizes the number of base parents from each origin. Beside the pedigreed material, the data includes a number of interesting bulked seedlots, from relevant sources, including material from overseas breeding programs, selected stands in Portugal as well as a few unimproved seedlots commercially available at the time.

### *Field trials*

The analysis incorporated a total of 269 trials (185 from RAIZ and 84 from ALTRI), with the oldest trials going back to 1966 and the most recent to 2014, with an average measurement age of 8 and 9,2 for RAIZ and ALTRI, respectively. As expected, trials are distributed across the whole range of climate and soil conditions for eucalyptus to grow (a perspective of the trial's distributions is given in Figure 1). The two companies followed similar silvicultural practices (soil cultivation, fertilization and weed control and spacing) and resulted in similar growth and survival rates. Overall, ALTRI's trials were bigger and more frequently based on seedlings from controlled crosses, whereas RAIZ trials were smaller and more often based on cuttings (Table 1).

**Table 1. General statistics of the dataset included in the ALTRI and RAIZ breeding programs**

	ALTRI	RAIZ
<b>Number of trials</b>	84	185
<b>Number of genotypes measured in trials</b>	153,599	90,982
<b>% of which are cuttings</b>	20%	70%
<b>% of which are fullsibs</b>	75%	45%
<b>Mean age of measurements</b>	9,2	8,0
<b>Mean survival</b>	80%	83%
<b>Number trees/trial</b>	1829	492

Experimental designs varied across trials although most have been established as randomized

complete blocks (RCB) where each family or clone is present in each replicate by one or more trees and incomplete blocks (IB) within replicates, where each replicate has been sub-divided in incomplete blocks where only a fraction of the treatments are included. All IB in the dataset used a specific circular design or alpha-design (viz [1]), where the number of blocks per replicate and allocation of families or clones within each block is optimized in order to improve the power to contrast treatments.

Since the two breeding programs have evolved almost independently for most of their history, the connectedness between the two datasets is somewhat limited. Ten clones (three from ENCE and seven from RAIZ collections) have been established in up to 10 of ALTRI's trials. These RAIZ clones are amongst the most frequently used across the RAIZ dataset (present in up to 82 different trials), henceforth constitute a particularly good set of connectors widely tested across the datasets.

### Measurements

All trials have been measured for diameter over bark and total height, and survival, as detailed in Table 2. Most trials have been measured at various ages, but only the most recent measurements were included in the analysis. Age of measurements ranged from 3 to 14 years, with an average of around 8 years for height, diameter and survival. In the analysis of survival, only trees which died from natural causes were considered. Trees missing soon after planting or replaced have been removed from the dataset. Similarly, trees which were excluded but still alive (e.g. abnormal, bended, damaged, multiple stems) were included in the survival dataset but not in the growth dataset.

### Data Transformation

Since growth measurements are a cumulative trait, spanning in age from 3 to 14 years, means are expected to increase with age and variances can be significantly heterogeneous. In order to remove this problem, data was normalized prior to analysis, dividing the actual measurements by their site phenotypic standard deviation. This way, all measurements can be assumed to follow a normal distribution with mean zero and variance of one.

Survival was fit as a binomial variable (each observation was either 0 or 1). In this case, the variable can still be considered to follow an underlying normal distribution. In the current analysis, the binomial analysis considered a link function to be a logit with its assumed constant residual variance of  $\pi^2/3=3.29$  (viz [2]). The survival estimates (denoted  $\hat{\eta}$ ) will be distributed normally although on the binomial scale. It has the important property of being independent of the site's mean survival, hence allowing a correct comparison across sites with different mortality rates. Survival estimates in a binomial scale can be easily back transformed to the more comfortable percentage scale, using the formula (Eq. (1)):

$$Sob = \frac{1}{1+e^{-(\eta+a)}} \quad (1)$$

Where  $\eta$  is the reference adopted for mean survival and  $a$  the BLUP both in the logit scale. For example, for an average survival of 80%,  $\eta=1.35$ .

### Statistical analysis

The statistical method used to estimate the genetic merit of all trees in the two breeding programs is called **BLUP** (*Best Linear Unbiased Prediction*). It takes into account the full range of fixed and random effects considered relevant in the analysis, as well as all the pedigree relationships across all trees in the dataset. The linear model that was fitted can be described, in matrix notation as Eq. 2:

$$y = \mathbf{X}s + \mathbf{Z}_b b + \mathbf{Z}_1 a + \mathbf{Z}_2 f + \mathbf{Z}_3 c + e \quad (2)$$

where  $y$  is the vector of measurements (i.e. normalized height and diameter as well as survival),  $s$  includes all fixed effects due to site and replicates within site (where  $E(s)=\mathbf{X}s$ ),  $b$  are the Random effects of incomplete blocks with replicates and  $a, f$  and  $c$  are the genetic effects due to additive, full-sib family and clonal within family, respectively and  $e$  the residuals. The  $\mathbf{X}$ ,  $\mathbf{Z}_b$ ,  $\mathbf{Z}_1$ ,  $\mathbf{Z}_2$  and  $\mathbf{Z}_3$  are

design matrices relating all observations to their corresponding factors in the model. Means and variances for the genetic random and residual effects are given by:

$$\begin{bmatrix} a \\ f \\ c \\ e \end{bmatrix} \sim N \left( \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}, \begin{bmatrix} \mathbf{A}\sigma_a^2 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \mathbf{I}\sigma_f^2 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \mathbf{I}\sigma_c^2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \mathbf{R} \end{bmatrix} \right) \quad (3)$$

Where  $\mathbf{A}$  is the relationship matrix among all individuals in the pedigree,  $\mathbf{I}$  is the identity matrix and  $\mathbf{R} = \mathbf{K}\sigma_e^2$  and  $\sigma_a^2$ ,  $\sigma_f^2$ ,  $\sigma_c^2$  and  $\sigma_e^2$  are the variance of additive, family and clonal genetic effects and residuals, respectively. Residual effects were modelled as  $\mathbf{R} = \mathbf{K}\sigma_e^2$ , where  $\mathbf{K}$  is a diagonal matrix with values calculated according to the measurement's age (viz [4]) as Eq. 4:

$$\frac{1+(t-1)\rho}{t} \quad (4)$$

With  $t$  being the age of measurement and  $\rho$  the repeatability of annual increments for height and diameter, assumed to be 0,40. This weight works as a penalty on the residual variance of younger measurements, relative to older ones. Software AsReml [3] was used to carry out the analysis.

The additive genetic effects ( $\hat{a}$ ) or *Expected Breeding Values* are one of the the most important genetic components to known in tree breeding. They represent the aggregate genetic merit of all alleles of an individual, and therefore are a measure of how valuable a tree is to pass on its genes to its progeny. It is the key parameter to select parents for the next generation of breeding. In the case of sibs belonging to the same cross, the analysis estimates the *family* effect ( $f$ ). This family effect corresponds to the deviation from all family members from the average of its parents breeding values and is a measure of dominance effects present ( $\hat{f} \approx \frac{1}{4}D$ ). It is often referred to as the *Specific The Combining Effect* of a cross, thus merit of a specific fullsib family can be given by  $\frac{(\hat{a}_i+\hat{a}_j)}{2} + \hat{f}_{ij}$ . A specific cross is expected to perform better than the average genetic merit of both its parents whenever its family effect is positive. Finally, in the case of trees which have been cloned and represented in te dataset by multiple ramets, the analysis was able to estimate the clonal deviation (denoted  $c$ ) from both the average of its parents breeding values and its family effects. This clonal genetic effect are due to dominance and epistatic effects which are only expressed in the individual ( $\hat{c} \approx \frac{3}{4}D + I$ ). The sum of all genetic effects ( $\mathbf{g} = \mathbf{a} + \mathbf{f} + \mathbf{c}$ ) corresponds to the total genetic merit of that clone. The genetic merit is the correct measure of the merits of propagating a given clone. If  $f$  and  $c$  are large, the expected clonal value of a tree is much better than the breeding value of that same tree when deployed as a parent.

### Variance components

Variances used in the linear model were based on previously reported genetic parameters for the species, some based on similar datasets (e.g. [5-9]) and other unpublished estimates based on subsets of this dataset. The variance components used in the BLUP analysis are listed in Table 2.

**Tabela 2. Variance components (V) for normalized diameter and height and for survival in the binomial scale, for all random factors in the model (viz incomplete blocks within replicates, additive, family and clonal genetic and residuals) and corresponding narrow and broad sense heritabilities used in the current BLUP analysis.**

Variable	Viblk	Va	Vf	Vc	Ve	$h^2$	H2
Height	0,19	0,25	0,03	0,05	0,72	0,24	0,31
Diameter	0,08	0,15	0,03	0,04	0,80	0,15	0,21
Survival	-	0,45	0,05	0,25	3,29	0,11	0,19

BLUP estimates for volume ( $\hat{a}_{VOL}$ ) were calculated from BLUP estimates of height and diameter based on standard selection index theory according to [10] equations as (Eqs 5 and 6):

$$\hat{a}_{VOL} = \mathbf{b}_1 \hat{a}_{Ht} + \mathbf{b}_2 \hat{a}_{Diam} \quad (5)$$

where **b** are the index coefficients estimates as:

$$\mathbf{b} = \mathbf{G}_{11}^{-1} \mathbf{G}_{12} \quad (6)$$

with  $\mathbf{G}_{11}$  being the matrix of genetic variance-covariance between measured variables (i.e. height and diameter), and  $\mathbf{G}_{12}$  the genetic covariances between these estimates and *Volume*. The genetic variance covariances used in the calculations of the b's are given in Table 3). Index coefficients for total genetic effects were 0,241 and 0,684 for height and diameter, respectively, and for additive genetic effects only were 0,226 and 0,676 for height and diameter, respectively.

**Table 3. Genetic variances and correlations amongst selection traits (diameter and height) and the target trait (volume) used in the estimation of index coefficients (see text for details)**

	Vg	Va	Corr with VOL	Corr between HT and DIAM
<b>Height</b>	0,27	0,20	0,75	0,85
<b>Diameter</b>	0,33	0,25	0,80	
<b>Volume</b>	0,3	0,2		

## RESULTS AND DISCUSSION

### *The genetic basis*

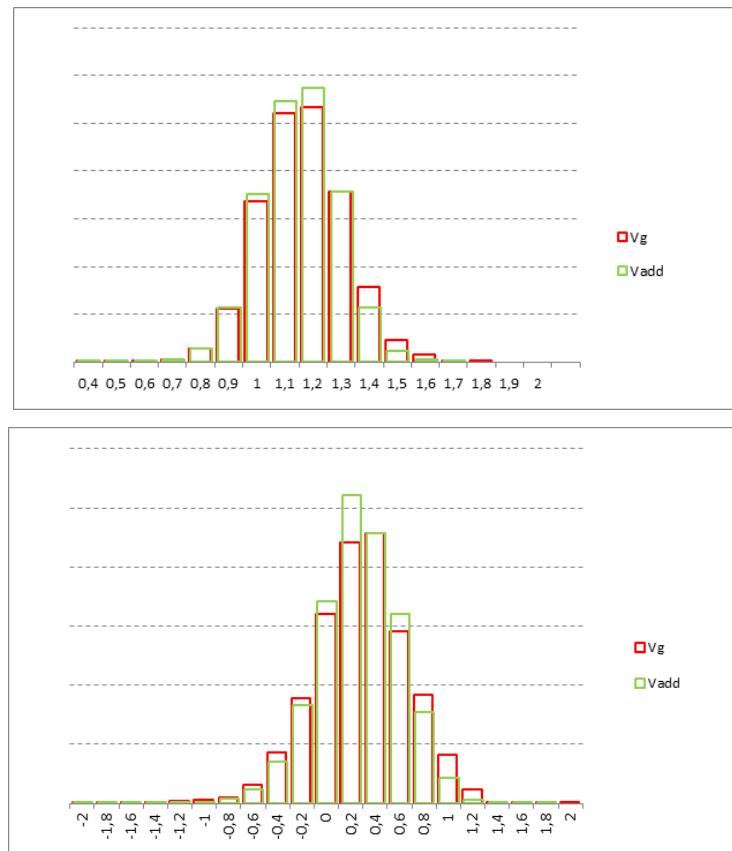
The genetic foundations of both programs have been based on over 1,600 parents. Of these, about 700 were plus trees which have been selected in Portugal between 1965 and 1990 (616 from RAIZ program and 92 from ALTRI's). Later studies (viz [11,12]), have shown that almost all these local plus trees can be traced back to a single Australian origin (viz Southern Tasmanian race). However, both programs have incorporated other families from original Australian collections (as detailed in [13]). This ensured all major *E. globulus* native races have been included and bred into advanced generations. In total there has been 551 Australian base parents in the initial ALTRI's population, and 348 in RAIZ's. A smaller but significant number of other germplasms have also been introduced at different stages of the programs, including ad hoc collections (ex pollen or seed) from programs in Australia, Chile, Spain and USA. A detailed discussion on the amount of genetic diversity captured and sustained over the generations by the two programs is beyond the scope of this paper. It should be stated however that both programs are still in their infancy, with a very broad genetic foundation and have been successful in maintaining a wide range of germplasm available in the field to ensure a wide range of selection options, and sustained progress in the future.

A first interesting outcome of this analysis is the possibility to carry out an *ex ante* comparison of how effective have been the plus tree selection programs carried out by RAIZ (ex Portucel and Soporcel) and ALTRI (ex Celbi) in the 80s and 90s, as compared with later infusion of unselected Australian seedlots from CSIRO and other local collectors. The result (summarized in Table 4) show that on average genetic merit of the portuguese plus trees was only 1 to 4 % better than mostly unimproved ancestors from Australian collections, with ALTRI's selections marginally better than RAIZ's. This suggests low selection efficiencies in these early selections, not a surprising result given most plus tree have been selected in commercial stands, often of poor silviculture and considerable environmental heterogeneity. In contrast introduced Australian collections covered a broader range of races, some known to be better than the putative Southern Tasmania origin which dominated the Portuguese land race. Nevertheless, some of these plus trees turned out to be very good in genetic merit, some still ranking in the top 1000 and a few still in operational use.

**Table 4. BLUP estimates for volume (% above average) and Survival (in binomial scale, i.e. in units of standard deviation) for the various base parent groups**

Source	Average V_%	Average S_bin
<b>ALTRI Local Plus Trees</b>	1,03	0,19
<b>RAIZ Local Plus Trees</b>	1,01	0,08
<b>ALTRI Australia</b>	1,00	0,00
<b>RAIZ Australia</b>	0,98	-0,03

The most important result from the joint BLUP analysis is the possibility to compare directly the genetic merit of more than 150,000 genotypes and the 1,700 fullsib families and 1,342 open pollinated families present, providing an opportunity to compare and select across a broader range of candidates and sites. This distribution is illustrated in Figures 1 and 2.

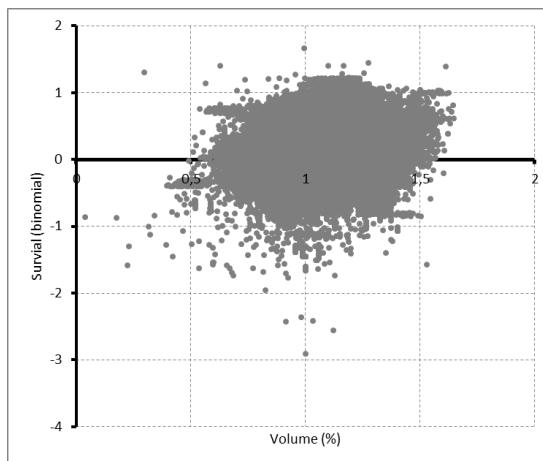


**Figure 1 Distribution of Breeding (Vadd in green) and Clonal Values (Vg in red) for volume (in % above base population, upper graph) and Survival (in a binomial scale, lower graph) for all trees in RAIZ and ALTRI's programs.**

For volume, the range of BLUP values varied between 0,4 (or 40% of the unimproved mean) and 1,8 (or 80% above). In other words, best individuals in the dataset had volume estimates which nearly double the productivity over unimproved seedlings. Best surviving material had BLUP estimates of up to 1,5 standard deviations. If unimproved mean survival is set to 80%, this represents overall survivals of 94%, an improvement in 14 percentage points. A wider distribution of genetic merit occur for the total genetic effects (red histograms in Figure 1), compared with the distribution of Expected Breeding Values (green). As apparent in Figures 1 and 2, genetic merit of most individuals in the current breeding populations are above the unimproved mean (which would be when V or

S=1). This overall shift to the right in these histograms is an illustration of the gains been achieved in the last cycles of breeding.

Of the 150,000 genotypes tested, only around 4,000 had multiple ramets (i.e. were propagated as clones), hence allowing an estimate of their clonal genetic merit. Some of these clones have been derived from second and third generation families, i.e. they are best performing clones from crosses between best parents. Not surprisingly, the very best BLUPs in the ranking are from these clones. Such superiority is expected not only as the result of accumulated gains across generations, but also because clones can capture all genetic effects (additive, family and clonal), whereas unreplicated seedlings, from seed orchards of best crosses are only able to capture additive genetic merit. Still, many of the most promising trees in the program (about 50% of the top 100 trees) are coming from these unreplicated progenies which have not been cloned. Despite the poor rooting of many of these outstanding individuals, there is very high expectations that some of these clones will surpass the merit of current operational materials.



**Figure 2. Distribution of Expected Breeding Values for volume (as % over program's base parents) and survival (in units of standard deviation, in a binomial scale) for all trees in ALTRI and RAIZ breeding populations.**

#### ***Merit of key genetic materials***

Key genetic materials currently in use by THE NAVIGATOR COMPANY and ALTRI include RAIZ and ALTRI operational clones and ALTRI's controlled pollinated families. There are also a number of bulked seedlots from existing seed orchards and seed collected in registered stands in Portugal (commercially classified as *Semente Selecionados*), as well as the option to deploy some clones from ENCE breeding program. Table 5 compares the genetic merit, for growth and survival, of these key materials.

**Table 5 Genetic merit for volume (as % over program's base parents) and survival (in units of standard deviation, in a binomial scale) for key *E. globulus* genetic materials currently available to ALTRI and THE NAVIGATOR COMPANY plant production. Approximate numbers of different clones or families available are also given (N).**

	<b>N</b>	<b>VOL_%</b>	<b>SURV_bin</b>
<b>Operational Clones</b>			
<b>RAIZ</b>	6	1,46	0,62
<b>ALTRI</b>	4	1,26	0,66
<b>ALTRI Controlled Crosses</b>			
<b>D95</b>	20	1,21	0,45
<b>3D</b>	20	1,41	0,34

<b>RAIZ SO</b>	1	1,31	0,32
<b>RAIZ Commercial 'Selected' Seedlots</b>	1	1,03	-0,20
<b>ALTRI Ex BOGALHEIRA SO 'Selected' Seedlots'</b>	1	1,10	0,50
<b>ENCE Clones</b>	5	1,31	0,56

Of the materials listed in Table 5, RAIZ clones (with an average  $V=46\%$  and  $S=0,62$  above mean) and ALTRI's second generation controlled crosses, also called 3D families (with  $V=41\%$  and  $S=0,34$ ) are the most valuable. However, some other sources are also interesting. The recently established RAIZ Orchard, the older ALTRI crosses and the ALTRI and ENCE clones had gains of around  $V=20$  or 30% and an overall survival above average. The use of seed from „selected“ stands does not provide significant gains, although seed collected from ex-Bogalheira plantations resulted in somewhat better gains ( $V=10\%$ ) than plain commercial selected seedlots ( $V=3\%$ ).

The overall superiority of clones over controlled or bulked seedlots is not surprising since the former can capture not only additive genetic merits of their parents, but specific non-additive combinations unique to each clone, effects which can in some cases be substantial. However, in this particular case differences between best families (ex ALTRI) and best clones (ex RAIZ) were small. It all depends on the selection effort applied and the degree of improvement behind clones and parents. Clones from first generation breeding can be easily matched by best families or orchards seed from second generations parents for example. Many putative clones will be hard to propagate, restricting considerably the pool of candidate clones deployable and degrading the selection intensity that can be applied on clones.

### ***Meeting the future market requirement in quality and quantity.***

Although RAIZ clones and ALTRI's elite families are at the moment the best genetic material available, they alone are not able to supply all the plants needed by the market. Current clonal and elite crosses capacity (combining ALTRI and THE NAVIGATOR COMPANY) is around 10 million, whereas estimated market requirements will be around 20 to 30 million plants/year (viz [14]). This means that other alternative sources, based on more easy to produce seed and raise seedlings or cuttings should be pursued.

Currently, a considerable proportion of certified plants sold are from what is classified as *selected origins*. This seed is collected from certified stands often unknown or poorly selected origins. The current analysis suggests these materials return modest gains (estimated in approx 1 to 10%), considerably less than what would be expected from new seed orchards comprising best selections from RAIZ or ALTRI programs. The small scale RAIZ Seed Orchard, which started production in 2014, returns considerable more gains ( $V=31\%$ ) and newer orchards, established using the best available materials, will easily top this figure. An orchard with best materials selected in ALTRI and RAIZ programs would be expected to return gains of around  $V=50\%$  and  $S=0.8$  (viz Figure 2).

### ***Gains expected from breeding programs in the future***

The two breeding lines are now entering their third cycle of breeding. Of the Top 100 trees in the program, 91% are progeny from 1.5 or 2nd generation controlled crosses (i.e. they belong to crosses among pedigreed parents previously selected in progeny trials). Only 6% are still coming from the original list of plus tree selections or some of their open pollinated progeny. These top individuals have an average genetic merit of  $V=1,6$  or 60% above average, a significant step forward in relation with current operational clones and families. Some of these trees are already old enough to be selected and grafted and soon will start to be used for advanced generation crossings, providing the foundation for new better clones and families.

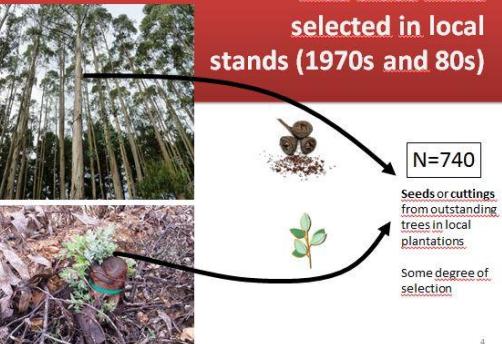
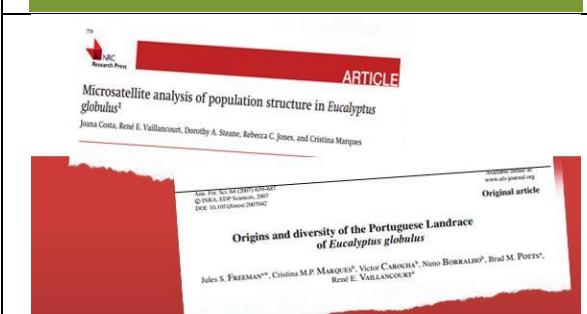
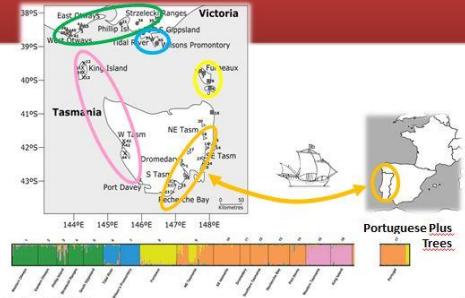
The potential for such genetic progress should be carefully weighted against the maintenance of appropriate levels of genetic diversity. Some of these elite individuals are related (sharing one or

more ancestors with other top materials) but there is still considerable genetic variation in the mix of elite parents. For example, the top ranked 1000 trees are progenies from up to 71 different parents (16 from ALTRI and 55 from RAIZ program). Given the broad genetics base of these 71 parents, coming from multiple races, there is still plenty of room to continue to cross unrelated material and generate new cycles of breeding with no built up of inbreeding. With only three generations of breeding, we expect to have considerable genetic variation to exploit in the foreseing future.

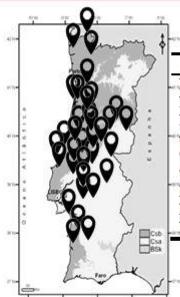
## REFERENCES

1. J.A. John, and E.R. Williams. Cyclic and computer generated designs, Chapman and Hall, London (1995).
2. P. McCullagh, and J. Nelder. Generalized Linear Models, Second Edition. Chapman and Hall/CRC Monographs on Statistics and Applied Probability Series, Chapman & Hall. (1989)
3. A.R. Gilmour, B.J. Gogel, B.R. Cullis, S.J. Welham, R. Thompson. ASReml user guide release 1.0. VSN International Ltd, Hemel Hempstead, UK (2002).
4. X. Wei and N.M.G. Borrallo. A simple model to describe age trends in heritability in short rotation tree species. Proc. QFRI-IUFRO Conf., Caloundra, Australia. 27 Oct-1 Nov 1996. QFRI, Gympie (Australia) on Tree Improvement for sustainable tropical forestry, Editors Dieters, M.J., Matheson, A.C., Kikles, D.G., Harwood, C.E. and Walker, S.M. Pp 178-181. (1996)
5. N. M. G. Borrallo, P. P. Cotterill, P. J. Kanowski. Genetic Parameters and Gains Expected from Selection for Dry Weight in *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus* in Portugal, *Forest Science*, 38 (1): 80–94 (1992).
6. J.A. Araújo, N.M.G. Borrallo, and G. Dehon. The importance and type of non-additive genetic effects for growth in *Eucalyptus globulus*. *Tree Genetics and Genomes*, 8: 327 (2011).
7. J.A. Araújo, R. Sousa, L. Lemos and N.M.G. Borrallo. Estimates of genetic parameters and prediction of breeding values for growth in *Eucalyptus globulus* combining clonal and full-sib information. *Silvae genetica*, 45: 223-226. (1996).
8. J. Costa-e-Silva, N.M.G. Borrallo, J.A. Araújo, R.E. Vaillancourt and B.M. Potts. Genetic parameters for growth, wood density and pulp yield in *Eucalyptus globulus*. *Tree Genetics & Genomes* (2009) 5:291–305
9. J. Costa e Silva, N.M.G. Borrallo, and B.M. Potts, Additive and non-additive genetic parameters from clonally replicated and seedling progenies of *Eucalyptus globulus*. *Theor Appl Genet* (2004) 108: 1113
10. M. Schneeberger, S.A. Barwick, G.H. Crow, and K. Hammond. Economic indices using breeding values predicted by BLUP. *J Animal Breeding and Genetics*, 109: 180-187. (1992).
11. J.S. Freeman, C.M. Marques, V. Carocha, N.M.G. Borrallo, B.M. Potts and R.E. Vaillancourt. Origins and diversity of the Portuguese Landrace of *Eucalyptus globulus*. *Ann For Sci* 64:639–647. (2007)
12. J. Costa, R.E. Vaillancourt, D.A. Steane, R.C. Jones, and C. Marques. Microsatellite analysis of population structure in *Eucalyptus globulus*. *Genome* 60: 770–777 (2017).
13. N.M.G. Borrallo, M.H. Almeida and B.M. Potts, O melhoramento do eucalipto em Portugal., In AM Alves and JS Pereira and JMN Silva (eds.), Eucaliptal em Portugal: Impactes Ambientais e Investigação Científica , ISAPress, Lisboa, pp. 61-110. (2007)
14. M.H. Almeida, C. Araújo, J.A. Araújo, F. Costa-e-Silva I. Neves, V. Paiva, A. Santiago, and D. Ribeiro, Melhoramento Genético do Eucalipto: que Impacto na Realidade? Congresso Florestal Nacional, 5º, Viseu. (2005).

# APRESENTAÇÃO

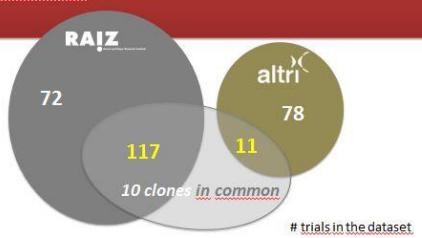
 <p><b>THE GAINS ACHIEVED FROM EUCALYPTUS TREE IMPROVEMENT PROGRAMS BY ALTRI AND RAIZ</b></p> <p>Nuno Borralho<sup>1</sup>, João Pedro Pina<sup>3</sup>, José Araujo<sup>1</sup>, Luis Leal<sup>2</sup></p> <p><sup>1</sup>RAIZ  <sup>2</sup>ALTRI Florestal  <sup>3</sup>Consultor</p>	 <p><b>Scope of the talk</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Brief history of the <i>Eucalyptus</i> breeding efforts</li> <li>2. Joint analysis of RAIZ and ALTRI datasets</li> <li>3. Key results and implications for the future</li> </ol>
 <p><b>The RAIZ and ALTRI breeding programs</b></p>	 <p><b>Plus trees were selected in local stands (1970s and 80s)</b></p> <p>N=740    Seeds or cuttings from outstanding trees in local plantations    Some degree of selection</p>
 <p><b>ARTICLE</b>    Microsatellite analysis of population structure in <i>Eucalyptus globulus</i><sup>1</sup>    Joana Costa, René E. Viallancourt, Dorothy A. Stone, Rebecca C. Jones, and Cristina Marques</p> <p><sup>1</sup>See full article at <a href="http://www.alr-journal.org">www.alr-journal.org</a>    Accepted article    Accepted 24/03/2007    DOI: 10.1051/alr:2007042</p>	 <p><b>As a result, nearly all plus trees are from SE Tasmania</b></p> <p>Costa et al., 2018</p>
 <p><b>Wide-range seed collections from Australia (late 80s)</b></p> <p>Recherche Bay, Tasmania (2017)    Recherche Bay, Tasmania (1790s)</p> <p>Seeds from known mothers in native stands    No selection    N=600</p>	 <p><b>The joint analysis</b></p>

## The data used in the joint analysis:



	ALTRI	RAIZ
Number of trials	88	189
Number of trees measured	216,145	117,312
Number of genotypes measured in trials	166,339	38,918
% of which are cuttings	<1%	10%
% of which are fullsibs	80%	50%
Mean age of measurements	9.2	8.0
Mean survival	80%	83%
Number trees/trial	1890	620

Connectiveness between the two populations (across all trials) is reasonable



10

## Measurements and target traits

### MEASUREMENTS

- Tree volume (based on diameter and height at ages 2 to 17)
- Mortality due to natural causes

### BREEDING OBJECTIVE (for this study)

- Individual Tree Volume (as % above or below unimproved base population)
- Survival as a binomial trait (as standard deviations above or below unimproved base population)

Combine the two as Volume/ha

## About the analysis

- Measurements were adjusted prior to analysis (by the trial's std dev) to ensure fair comparison amongst trees growing in different places and ages
- A robust statistical method (unbiased and accurate) taking all information into account (pedigree, design, age): **MIXED MODEL/BLUP**

11

Conferência IUFRO sobre Silvicultura e Melhoramento de Eucaliptos

### THE RAIZ *Eucalyptus globulus* BREEDING PROGRAM: A BLUP ROLLING-FRONT STRATEGY WITH A MIXED CLANAL AND SEEDLING DEPLOYMENT SCHEME

Araújo, J.A.<sup>1</sup>, Lemos, L.<sup>1</sup>, Ramos, A.<sup>1</sup>, Ferreira, J.G.<sup>1</sup> and Borralho, N.M.G.2  
<sup>1</sup>RAIZ, Instituto de Investigação da Floresta e Papel, Herdade da Torre Bela, PO Box 15, 2065 Alcoentre, Portugal  
<sup>2</sup>Cooperative Research Centre for Temperate Hardwood Forestry, PO Box 252-12, Hobart 7001 TAS, Australia

BLUP is being used by RAIZ since 1996. It was one of the first tree breeding programs in the world to use it

Today, both RAIZ and ALTRI use BLUP as their method of choice

## Key results and deployment options



12



## What's the baseline

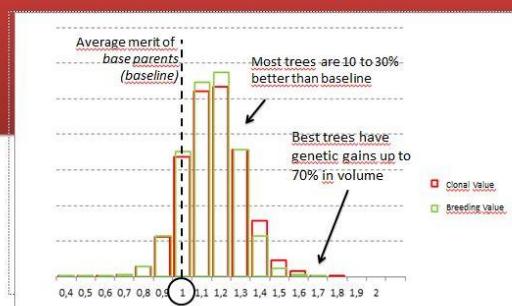
Source	Average V %	Average S bin
ALTRI Local Plus Trees	1,03	0,19
RAIZ Local Plus Trees	1,01	0,08
ALTRI Australia	1,00	0,00
RAIZ Australia	0,98	-0,03

The 1700 base parents (portuguese plus trees and Australian collections) can be considered unimproved (BLUP  $\approx$  1.00)

They are considered the baseline for future estimates of genetic progress for growth and survival

13

## Distribution of the 200,000+ genotypes from ALTRI and RAIZ programs



14

### Option #1: CLONES

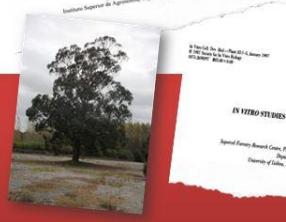
- Select best clones based on many trials.
- Test in nursery if they can be propagated.
- Confirm clonal merit in small scale pilot studies.
- Start large scale production.



17

### DEVELOPING CLONES FROM EUCALYPTUS GLOBULUS AND HYBRID SEEDLINGS BY STEM CUTTINGS PROPAGATION

P. J. WILSONS  
Departamento de Forestal, Universidade de Lisboa, P-1749 Lisboa, Portugal



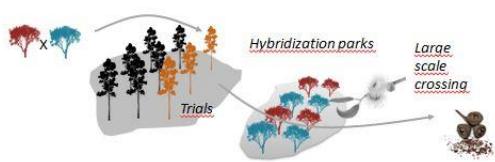
### I title



Portugal has been a pioneer in cloning *Eucalyptus globulus* (Altri since 1979, RAIZ/NVG since 1990s)

### Option #2: CONTROLLED CROSSES

- Select best families based on many trials.
- Graft and establish special parks to produce controlled pollinated seed in large scale.
- Wait until onset of flowering.
- Start large scale production.



19

### Developing large scale pollinations techniques started in 1988 by Altri



20

### Option #3: SEED ORCHARDS

- Select future parents based on many trials.
- Graft and establish a new seed orchards
- Wait until onset of flowering.
- Collect open pollinated seed production.



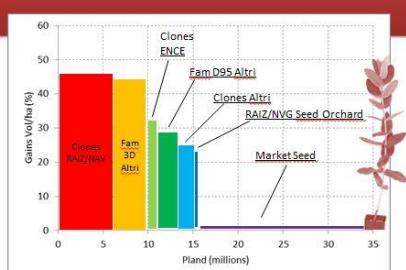
21

### Average genetic gains from different sources, based on the current joint BLUP analysis

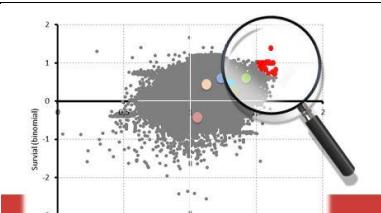
	N	VOL/ha
<b>Operational Clones</b>		
RAIZ/NVG	7	1,44
<b>#1 ALTRI</b>	5	1,26
ENCE	6	1,31
<b>Seed Orchards</b>		
<b>#2 ALTRI ContPoll</b>	D95	10 1,28
	3D	12 1,43
<b>#3 RAIZ/NVG OP</b>		1 1,24
<b>Commercial Seedlots (market seed)</b>		1 0,97

22

**Falling short of meeting market requirements:**  
Large gap between current supply of improved clones and families and demand.



23



There is still plenty of genetic potential to improve *Eucalyptus globulus* in the future

