



ISADORA BIANCHIN

FAMÍLIAS CLONAIS EM *Eucalyptus*

LAVRAS-MG

2022

ISADORA BIANCHIN

FAMÍLIAS CLONAIIS EM *Eucalyptus*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação do Mestrado Profissional em Genética e Melhoramento de Plantas Profissional, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Evandro Novaes

Orientador

Dra. Izabel Christina Gava de Souza

Coorientadora

LAVRAS-MG

2022

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Bianchin, Isadora.

Famílias Clonais em *Eucalyptus* / Isadora Bianchin. - 2022.

60 p. : il.

Orientador(a): Evandro Novaes.

Coorientador(a): Izabel Christina Gava de Souza.

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de
Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Eucalipto. 2. Melhoramento Genético. 3. Plantio multiclonal.
I. Novaes, Evandro. II. Gava de Souza, Izabel Christina. III. Título.

ISADORA BIANCHIN

FAMÍLIAS CLONAIIS EM *Eucalyptus*

CLONAL FAMILIES IN *Eucalyptus*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação do Mestrado Profissional em Genética e Melhoramento de Plantas Profissional, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 9 de agosto de 2022.

Prof. Dr. Magno Antonio Patto Ramalho UFLA

Dr. Thiago Romanos Benatti Suzano S.A.

Prof. Dr. Evandro Novaes

Orientador

Dra. Izabel Christina Gava de Souza

Coorientadora

LAVRAS-MG

2022

Dedico aos meus pais, Orisa e Altemir, e à
minha irmã Sofia, pelo amor e apoio
incondicionais.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por iluminar meus caminhos.

Aos meus pais, Altemir e Orisa, e à minha irmã Sofia, pelo amor, apoio e incentivo incondicionais. Obrigada por acreditarem em mim e nos meus objetivos.

Ao Evaristo pelo amor, compreensão e companheirismo.

À Suzano S.A, e em especial aos meus gestores Leandro e Alexandre, pelo suporte, confiança e pela oportunidade de realizar esse trabalho.

Ao Bruno Lima pelo apoio e incentivo no início da minha jornada no mestrado.

A todos os colegas da Gerência de Genética e Melhoramento Florestal e aos amigos e colegas da Bahia. À equipe do laboratório de Biologia Molecular e ao time de campo da Bahia, pelo apoio e empenho nas atividades do projeto.

Às minhas colegas e amigas Gabi, Carol e Ju, pela amizade, companheirismo, e por tornarem os dias mais leves e felizes. Ao meu colega José Luis, pela parceria diária e pelos ensinamentos. Aos colegas Thiago, Izabel e Gabi pelas valiosas contribuições, ensinamentos, paciência e interesse no projeto. Aos consultores Shinitiro Oda e Antônio Flores, pelo entusiasmo, colaboração e ensinamentos.

À Universidade Federal de Lavras, ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas e aos professores do mestrado profissional pelo conhecimento transmitido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pelo apoio ao Mestrado Profissional em Genética e Melhoramento de Plantas.

Aos colegas do mestrado profissional pela troca de conhecimentos e de experiências.

Ao meu orientador, Evandro Novaes, pela paciência, incentivo, ensinamentos e contribuições que enriqueceram o trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

O eucalipto (*Eucalyptus* spp.) é o gênero florestal mais cultivado no Brasil, com 7,5 milhões de hectares de plantio, e é a principal fonte de produtos derivados de florestas plantadas. O melhoramento genético e a técnica de clonagem contribuíram para o aumento da produtividade e para a competitividade da eucaliptocultura no país. No entanto, a baixa diversidade genética dos plantios monoclonais de eucalipto implica em riscos frente ao surgimento de novos desafios bióticos e abióticos. A estratégia de famílias clonais é uma alternativa para mitigar esses riscos, devido à maior diversidade genética dos plantios e, conseqüentemente, maior segurança. Além disso, as famílias clonais proporcionam incrementos em produtividade e aceleração do ciclo de melhoramento. O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade da estratégia de famílias clonais para o melhoramento e recomendação de materiais genéticos para a unidade Bahia da Suzano S.A. A família clonal utilizada neste estudo foi formada por 249 clones meios-irmãos, selecionados em uma mesma progênie de polinização aberta de *E. grandis*. Nos anos de 2014 e 2015, a família clonal foi plantada em diversos talhões operacionais, presentes nos diferentes ambientes de atuação da empresa na Bahia. Para este estudo, foram selecionados quatro locais, e em cada um deles foram demarcadas três parcelas de cem plantas e realizada a mensuração do diâmetro à altura do peito (DAP, cm) das árvores. Com o dado de DAP, as 30 melhores árvores de cada parcela foram selecionadas, e em seguida inventariadas para DAP, altura (ALT, m) e incremento médio anual (IMA, $m^3 \cdot ha^{-1} \cdot ano^{-1}$). A identidade genética das árvores selecionadas foi determinada por meio de 92 polimorfismos de nucleotídeo único (SNP). As famílias clonais iniciais apresentaram produtividade competitiva em relação às testemunhas operacionais monoclonais, e a seleção das 30% melhores árvores no plantio ofertou ganhos significativos em IMA, conquanto assegurando diversidade genética. A genotipagem de SNP permitiu identificar a presença de 42 a 56 clones dentre as árvores selecionadas em cada um dos quatro locais. A coincidência entre os clones selecionados em cada sítio foi baixa, e não houve correlação significativa entre as suas performances em IMA nos respectivos locais, indicando a existência de interação genótipos por ambientes entre as áreas. A seleção dos 15 melhores clones em cada local proporciona a formação de famílias clonais melhoradas para recomendação de plantio em escala operacional, com ganhos em produtividade e diversidade genética. Os resultados corroboram que a estratégia de famílias clonais é promissora, pois oferece redução de tempo na *pipeline* de melhoramento genético, ganhos em produtividade e maior segurança, devido à maior diversidade genética dos plantios.

Palavras-chave: *Eucalyptus grandis*. Melhoramento genético. Plantio monoclonal. Plantio multiclonal.

ABSTRACT

Eucalypts (*Eucalyptus spp.*) is the most cultivated forest genus in Brazil, with 7.5 million acres, and is the main source of products derived from planted forest. Genetic improvement and the cloning technique contributed to the increase in productivity and to the competitiveness of eucalyptus culture in Brazil. However, the low genetic diversity of monoclonal eucalyptus plantations implies risks in the face of new biotic and abiotic challenges. The strategy of clonal families is an alternative to mitigate these risks, due to the greater genetic diversity of the plantations and, consequently, greater safety. In addition to that, clonal families provide increases in productivity and can accelerate the breeding cycle. The objective of this work was to evaluate the feasibility of the clonal family strategy for the improvement and recommendation of genetic materials for Suzano S.A. at Bahia. The clonal family employed in this study consisted of 249 half-sib clones, selected from the same open-pollinated progeny of *E. grandis*. In 2014 and 2015, the clonal family was planted in several operational planting areas, present in different environments of the company in Bahia. For this study, four sites were selected, and in each of them three plots of one hundred plants were established and the diameter at breast height (DBH, cm) of the trees was measured. With the DBH data, the 30 best trees in each plot were selected, and then inventoried for DBH, height (H, m) and mean annual increment (MAI, $\text{m}^3 \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{year}^{-1}$). The genetic identity of the selected trees was determined using 92 single nucleotide polymorphisms (SNP). The initial clonal families presented competitive productivity compared to the monoclonal operational controls, and the selection of the 30% best trees in the plantation offered significant gains in MAI, while ensuring genetic diversity. SNP genotyping allowed the identification of 42 to 56 clones among the trees selected at each of the four sites. The coincidence between the clones selected at each site was low, and there was no significant correlation between their performances in MAI at the respective locations, indicating the existence of genotype-by-environment interaction between the areas. The selection of the 15 best clones in each location provides the formation of improved clonal families for recommendation on an operational scale, with gains in productivity and genetic diversity. The results corroborate that the strategy of clonal families is promising, as it offers a reduction of time on the genetic improvement pipeline, gains in productivity and greater safety, due to the greater genetic diversity of the plantations.

Keywords: *Eucalyptus grandis*. Genetic improvement. Monoclonal plantations. Multiclonal plantations.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre a <i>pipeline</i> convencional para obtenção e recomendação de materiais genéticos e a <i>pipeline</i> utilizando a metodologia de famílias clonais. .	25
Tabela 2 - Informações geográficas, data de plantio e espaçamento entre árvores dos talhões operacionais utilizados no estudo.	29
Tabela 3 - Informações climáticas dos talhões operacionais utilizados no estudo.....	30
Tabela 4 - Dados médios da performance da família clonal inicial (FC) e da testemunha operacional (TE) nos quatro locais, à nível de parcela e geral: diâmetro à altura do peito (DAP), intervalo de confiança (IC), coeficiente de variação (CV%) e sobrevivência.	34
Tabela 5 - Média e ganhos em DAP com a seleção das 30% melhores árvores de cada parcela da família clonal, em comparação com a família clonal inicial e com a testemunha operacional, nos quatro locais.....	37
Tabela 6 - Número de clones presentes nas 30% melhores árvores da família clonal em cada local, no total e por parcela.....	39
Tabela 7 - Frequência de participação dos clones nos locais A, B, C e D.	40
Tabela 8 - Coeficiente de correlação linear de Spearman para o desempenho silvicultural em IMA dos clones entre os locais.....	46
Tabela 9 - Número de clones, estimativa média de IMA ($m^3.ha^{-1}.ano^{-1}$) e ganho com diferentes níveis de seleção na família clonal inicial, nos quatro locais.	50
Tabela 10 - Estimativa média de IMA ($m^3.ha^{-1}.ano^{-1}$) e de ganho para as famílias clonais melhoradas a partir da seleção dos 15 melhores clones em cada local.....	51
Tabela 11 - MAF (<i>minor allele frequency</i>), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade observada (H_o), e índice de fixação de Wright (F) para os marcadores SNPs empregados na genotipagem dos clones da família clonal.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Área de ocorrência de <i>E. grandis</i> na Austrália, com a procedência de Atherton destacada em vermelho.....	16
Figura 2 - Comparação entre a <i>pipeline</i> convencional para obtenção e recomendação de materiais genéticos e a <i>pipeline</i> utilizando a metodologia de famílias clonais. ...	26
Figura 3 - Mapa com a localização dos talhões operacionais utilizados no estudo.....	29
Figura 4 - Amostragem de tecido do câmbio para extração de DNA.....	31
Figura 5 - Distribuição de DAP (cm) para a família clonal inicial (FC), em comparação com a testemunha operacional (TE) em cada local.	35
Figura 6 – Distribuição dos dados de DAP (cm) para as 30% melhores árvores em cada parcela da família clonal (FC_30), em comparação com a família clonal inicial (FC) e a testemunha operacional (TE), por local.	38
Figura 7 - Diagrama de Venn com o número de clones coincidentes entre as 30% melhores árvores identificadas na família clonal plantada em cada local.....	45
Figura 8 - Gráficos da performance média em IMA ($m^3 \cdot ha^{-1} \cdot ano^{-1}$) dos clones para os locais par-a-par (AxB, AxC, AxD, BxC, BxD e CxD), evidenciando as trocas de ordenamento dos clones nos diferentes locais.	47
Figura 9 - Diagrama de Venn com as coincidências dos 15 clones selecionados para formar as famílias clonais melhoradas em cada local.....	52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Importância da eucaliptocultura no Brasil	14
2.2	<i>Eucalyptus grandis</i> W. Hill ex Maiden	15
2.3	Melhoramento Genético do eucalipto	17
2.4	Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético do eucalipto... 19	
2.5	Plantios monoclonais <i>versus</i> multiclonais.....	21
2.6	Famílias Clonais de <i>Eucalyptus</i>	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	Materiais genéticos	28
3.2	Localização das áreas de plantio da família clonal.....	29
3.3	Coleta de dados	30
3.4	Identificação clonal das árvores selecionadas nos quatro locais	31
3.5	Coincidência e correlação entre os clones selecionados em cada local	32
3.6	Análise da diversidade genética dos clones da família clonal.....	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	Desempenho da família clonal inicial e comparação com a testemunha operacional monoclonal	34
4.2	Ganhos em produtividade com a seleção dentro da família clonal inicial	37
4.3	Caracterização do perfil genético dos clones presentes nas árvores selecionadas. 39	
4.4	Coincidência e correlação entre os clones selecionados em cada local	45
4.5	Determinação do número de clones para formação da família clonal melhorada 48	
4.6	Diversidade genética dentre os clones presentes na família clonal	52
5	CONCLUSÕES	54
	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

As florestas plantadas de eucalipto (*Eucalyptus* spp.) ocupam aproximadamente 7,5 milhões de hectares do território brasileiro, e são a base para o fornecimento de diversos produtos essenciais. A eucaliptocultura contribui significativamente para a geração de emprego e renda no país, representando cerca de 1% do Produto Interno Bruto nacional e uma receita bruta anual de 116,6 bilhões de reais. O Brasil tem notável superioridade no setor, sendo o maior produtor e exportador mundial de celulose de eucalipto, e o detentor das florestas mais produtivas, com incremento médio anual de $36,8 \text{ m}^3 \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{ano}^{-1}$ (IBA, 2021).

O melhoramento genético é um dos principais responsáveis pelos avanços da eucaliptocultura. Por meio da seleção de procedências, espécies e genótipos mais adaptados e produtivos, bem como o uso de metodologias como a hibridação e a clonagem, o melhoramento tem propiciado o contínuo desenvolvimento de materiais genéticos superiores. Um dos grandes marcos no setor foi a transição dos plantios seminais para o cultivo clonal, a partir da década de 80. A operacionalização da clonagem proporcionou ganhos de até 25% na produtividade do eucalipto (REIS, 2019; REZENDE; DE RESENDE; ASSIS, 2014). Desde então, os cultivos monoclonais são o principal modelo de plantio operacional.

No entanto, nos últimos anos, a produtividade dos cultivos monoclonais de eucalipto tem se mantido relativamente estável, a despeito dos contínuos investimentos em pesquisa e desenvolvimento tecnológico. Alguns dos motivos para essa estabilização na média de produtividade são as irregularidades climáticas, a expansão da eucaliptocultura para novas áreas, com condições edafoclimáticas menos favoráveis, e os desafios bióticos e abióticos (IBA, 2021). Além disso, por apresentarem menor diversidade genética, os plantios monoclonais implicam em maiores riscos frente a novos problemas, como o aparecimento de pragas e doenças e mudanças climáticas inesperadas. Com isso, é importante considerar novas estratégias de seleção e de plantio de cultivares com maior diversidade (GRIFFIN, 2014; KENENI, BEKELE, IMTIAZ, 2012; LOUWAARS, 2018).

Nesse âmbito, uma alternativa promissora é a adoção da estratégia de famílias clonais, que consiste no plantio de um conjunto de clones aparentados, selecionados dentro de uma mesma progênie superior, que apresentam semelhança no ritmo de crescimento, adaptação e produtividade. Segundo Griffin (2014), esta estratégia permite a manutenção da variabilidade genética nos plantios, e ao mesmo tempo assegura uniformidade e produtividade. Em um ambiente incerto, esse tipo de cultivo aumenta as chances de produtividade estável ao longo

dos anos. Souza (2016) relatou plantios de famílias clonais com ganhos de até 20,7% em IMA em relação aos plantios seminais.

Além da garantia de produtividade e da minimização de riscos, as famílias clonais também podem aumentar os ganhos por unidade de tempo, já que a sua recomendação pode ser feita mais rapidamente que a recomendação de monoclonos. Os indivíduos que compõem a família clonal são selecionados na fase de testes de progênie (primeira fase do programa de melhoramento), e podem ser recomendados para plantio semioperacional sem passar pelas fases de testes clonais e testes clonais ampliados. Este avanço de fases dentro do programa de melhoramento é suportado pela maior variabilidade genética da família clonal (o que garante maior estabilidade na produtividade e minimização dos riscos) e pela sua formação a partir de materiais testados e melhorados. Além disso, é possível posteriormente realizar o melhoramento (“purificação”) da família clonal inicial e também, se desejado, selecionar os melhores clones de forma individualizada para avanço na *pipeline* de melhoramento e subsequente recomendação monoclonal.

Desta forma, o uso de famílias clonais é uma estratégia promissora, embora ainda pouco explorada, para o melhoramento e recomendação de materiais genéticos, com maior diversidade genética, garantia de produtividade e maior segurança frente a adversidades bióticas e abióticas. Diante disso, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial de uma família clonal de *E. grandis* para o melhoramento e recomendação de clones na unidade Bahia. Espera-se identificar os ganhos em produtividade e a variabilidade genética que podem ser obtidos por meio da seleção aplicada na família clonal, em diferentes intensidades de seleção e sob diferentes condições ambientais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância da eucaliptocultura no Brasil

O gênero *Eucalyptus* pertence à família *Myrtaceae* e é composto por mais de 900 espécies, majoritariamente arbóreas florestais, nativas da Austrália e de suas ilhas adjacentes. A diversidade, adaptabilidade a diferentes ambientes (especialmente em regiões tropicais e subtropicais), rápido crescimento e propriedades superiores da madeira impulsionaram a rápida adoção do gênero *Eucalyptus* e contribuíram para a ampla distribuição geográfica do seu cultivo. Atualmente, o eucalipto é plantado em mais de 100 países, em área superior a 20 milhões de hectares (BRANCALION et al., 2019), e é uma das principais fontes de produtos derivados de florestas plantadas. Os plantios de eucalipto são utilizados para a produção de celulose e papel, geração de produtos de madeira sólida para construção civil e indústria moveleira, obtenção de lenha e carvão vegetal para a geração de energia térmica e elétrica, e produção de óleos essenciais (MORA; GARCIA, 2000). Além disso, diversas companhias do setor de eucaliptocultura têm investido na obtenção de bioprodutos derivados do eucalipto (como lignina, nanofibras, nanocelulose e nanocristais) para as cadeias alimentícia, farmacêutica e de vestuário (IBA, 2021).

Dessa forma, a eucaliptocultura contribui expressivamente para o fornecimento de produtos essenciais e para a geração de emprego e renda. Além disso, por ser uma fonte renovável, o eucalipto ajuda na remoção e estoque de carbono e na mitigação das pressões humanas sobre as florestas nativas (MYBURG et al., 2014). Dessa forma, é notável a importância do gênero *Eucalyptus* para a economia, inovação, sociedade e sustentabilidade, no Brasil e em outros países.

O cultivo de *Eucalyptus* no Brasil teve início no século XIX, com a introdução de espécies para fins paisagísticos. Décadas depois, em 1904, Edmundo Navarro de Andrade - considerado o pai da eucaliptocultura no Brasil - iniciou estudos na busca de espécies e procedências com maior potencial madeireiro para o fornecimento de carvão, postes e dormentes de ferrovias. Suas investigações demonstraram o potencial de desenvolvimento do gênero *Eucalyptus* e suas múltiplas aplicações, pavimentando o crescimento da eucaliptocultura no Brasil. Nas décadas seguintes, o setor foi impulsionado pelo uso do eucalipto como biomassa combustível (lenha e carvão) e pela fabricação de celulose e papel (FOELKEL, 2005).

Atualmente, o Brasil possui 7,47 milhões de hectares plantados com *Eucalyptus*, distribuídos em 18 estados, o que corresponde a 78% do total de área florestal cultivada no país. Dentre os diversos destinos desses plantios, o segmento de papel e celulose é o principal, com 61,4% da área florestal plantada no Brasil. O país é o maior exportador mundial de celulose (6 bilhões de dólares exportados em 2020) e o maior produtor mundial de celulose de fibra curta, com aproximadamente 18,2 milhões de toneladas anuais. Além disso, os plantios nacionais de eucalipto são os mais produtivos do mundo, com incremento médio anual (IMA) de aproximadamente $36,8 \text{ m}^3 \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{ano}^{-1}$ (IBA, 2021).

O sucesso e a competitividade da silvicultura brasileira devem-se principalmente ao aperfeiçoamento das técnicas de manejo (preparo de solo, adubação, controle de pragas e doenças), às técnicas de clonagem e propagação vegetativa e ao melhoramento genético. Esse último é responsável pela seleção de procedências, espécies e clones mais adaptados e produtivos e pelo contínuo desenvolvimento de genótipos superiores.

No entanto, apesar da preeminência da eucaliptocultura brasileira, ainda existem obstáculos a serem transpostos e melhorias a serem atingidas. Nesse sentido, destaque pode ser dado às seguintes necessidades: aumentar a produtividade e a qualidade da madeira para os variados produtos; obter genótipos adaptados aos mais diversos ambientes de plantio e tolerantes aos diferentes estresses bióticos e abióticos; e frear o aumento nos custos de produção de madeira (CAPO, 2015).

Estes desafios, somados à expressiva demanda pelos produtos derivados das florestas de eucalipto, tornam imprescindível o desenvolvimento de novas variedades, superiores às atualmente existentes, e a busca por novas estratégias de seleção.

2.2 *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden

A espécie *Eucalyptus grandis* ocorre naturalmente na Austrália, ao norte (próximo a latitudes de 25° e 33°S) e nas regiões centrais (latitude 21°S) do estado de Nova Gales do Sul (NSW), e ao norte de Queensland (QLD) (16° a 19° S) (FIGURA 1). A altitude de suas regiões de ocorrência varia desde o nível do mar até 600m de altitude na maioria das populações, e de 500 a 1.000m nas áreas do norte. O clima de sua adaptação é predominantemente quente e úmido. Para as populações do Norte, no mês mais quente, a temperatura máxima oscila entre 29 e 32°C, e, no mesmo mais frio, as mínimas variam entre 10 e 17°C. Para as demais populações, as temperaturas variam de 24 a 30°C, e de 3 a 8°C, respectivamente. A precipitação varia amplamente nas áreas costeiras, de 1.000 a 3.500mm, e nas áreas centrais de 1.000 a 1.750mm, ocorrendo predominantemente no período do verão. A

espécie é encontrada em vários tipos de solo, mas apresenta mais aptidão em solos profundos e bem drenados, com moderada fertilidade, não tolerando ambientes alagados (FONSECA et al., 2010).

Em média, *E. grandis* apresenta densidade básica de 490 kg/m³, teor médio de lignina de 29%, rendimento médio de celulose de 51% e elevada taxa de crescimento, tendo boa adaptação a climas subtropicais (FONSECA et al., 2010).

Figura 1 - Área de ocorrência de *E. grandis* na Austrália, com a procedência de Atherton destacada em vermelho.



Fonte: GARCIA et al., 2014.

No Brasil, o *E. grandis* foi introduzido por Edmundo Navarro de Andrade há pelo menos 100 anos, na estação experimental de Rio Claro, SP. A partir de 1970, a utilização e o melhoramento da espécie foram intensificados por diversas instituições, por meio da seleção de procedências e seleção recorrente recíproca (SILVA et al., 2019). Devido ao seu potencial adaptativo e produtivo, *E. grandis* é uma das espécies mais exploradas no melhoramento genético no Brasil, incluindo na Suzano S.A., sendo amplamente utilizado tanto como clone quanto como genitor, como espécie pura ou em híbridos (principalmente com *E. urophylla*).

A introdução de *E. grandis* de várias procedências nos estados do Espírito Santo e da Bahia, realizada pelas empresas Aracruz Celulose e Bahia Sul, revelou que materiais genéticos oriundos de Atherton (QLD – AUS) (FIGURA 1, destaque em vermelho) de menor altitude tiveram maior adaptação e produtividade na região. Esses materiais também apresentaram maior tolerância a doenças importantes como gomose, cancro e seca de

ponteiros do eucalipto do Vale do Rio Doce (SPEVRD), quando comparados aos materiais de origem NSW.

2.3 Melhoramento Genético do eucalipto

O melhoramento de plantas é considerado uma das atividades mais antigas realizadas pelo homem, que há pelo menos dez mil anos seleciona e propaga as plantas mais úteis e mais produtivas para o seu benefício (HALLAUER, 2011). O melhoramento genético pode ser definido como a ciência, a arte e o gerenciamento de recursos para melhorar as plantas em benefício humano (BERNARDO, 2002), ou ainda como a aplicação de técnicas para explorar o potencial das plantas e melhorar o padrão genético das mesmas em relação aos seus usos econômicos (HALLAUER, 2011), aumentando a frequência de alelos favoráveis para as características de interesse (PIRES et al., 2011).

No caso do melhoramento genético florestal, as principais características desejadas são o aumento da produtividade de madeira (IMA, em $m^3 \cdot ha^{-1} \cdot ano^{-1}$) e/ou de celulose (IMACel, em $t \cdot ha^{-1} \cdot ano^{-1}$), no caso da indústria de celulose, a melhoria da qualidade da madeira para diferentes usos, a adaptação a condições edafoclimáticas variadas e a resistência às principais pragas e doenças incidentes nas regiões de plantio (PIRES et al, 2011). Para atingir esses objetivos, a(s) estratégia(s) de melhoramento utilizada(s) deve(m) ser bem definida(s) e planejada(s) em curto e longo prazo (ASSIS; ABAD; AGUIAR, 2015; FONSECA et al., 2010). Essa(s) estratégia(s) deve(m) prever a definição das espécies e procedências mais adaptadas aos locais de plantio, a seleção das árvores que possuam combinações das características desejadas, e a manutenção de uma população base com variabilidade genética adequada para garantir os ganhos nas gerações futuras (ZOBEL, TABERT, 1984).

Pode-se considerar que o melhoramento do eucalipto no Brasil teve seu início com Edmundo Navarro de Andrade, em 1904, com a introdução e identificação de espécies promissoras para diferentes ambientes e finalidades (ASSIS, 2014). A partir daí, os primeiros programas de melhoramento foram fundamentados na seleção de indivíduos superiores, na condução de áreas para produção de sementes e na hibridação interespecífica (FERREIRA; SANTOS, 1997). Os objetivos principais dessas ações eram aumentar a uniformidade das plantações seminais de eucalipto, reduzir a mortalidade e melhorar a produção e a forma do fuste das árvores (ASSIS; ABAD; AGUIAR, 2015; FERREIRA, 1993). A partir da década de 1960, o melhoramento genético do eucalipto foi impulsionado pelos incentivos fiscais ao reflorestamento no país (ASSIS; ABAD; AGUIAR, 2015; PIRES et al., 2011). No período de 1960 a 1980, foram realizados testes de espécies e procedências e, subsequentemente,

intensificaram-se os testes de progênie e os programas de seleção recorrente intrapopulacional (SRI).

Um marco muito importante na evolução do melhoramento do eucalipto no Brasil foi a transição dos plantios seminais para os plantios clonais, com o advento da técnica de clonagem na década de 1970 e intensificação do seu uso a partir de 1980 (CAMPINHOS; IKEMORI, 1983). A clonagem trouxe ganhos excepcionais para os programas, permitindo a fixação de suas características através da multiplicação vegetativa das árvores superiores, resistentes a doenças, e dos híbridos interespecíficos com vigor híbrido (heterose) (ASSIS, 1996; 2000). Assim, a hibridação associada à clonagem passou a ser o método utilizado na maioria dos programas de melhoramento no Brasil, e os plantios monoclonais passaram a ser utilizados em escala operacional.

Ademais, a partir dos anos 2000, iniciaram-se os programas de seleção recorrente recíproca (SRR) entre populações de espécies divergentes, principalmente *E. grandis* x *E. urophylla* (ASSIS; ABAD; AGUIAR, 2015; FONSECA et al., 2010).

Atualmente, as estratégias de melhoramento florestal baseiam-se na seleção de genitores e na combinação dos mesmos via cruzamentos controlados direcionados dentro dos programas de seleção, podendo ser SRR e, também, SRI em população híbrida sintética, oriunda do cruzamento entre clones elites, com incorporação de novos clones elite a cada geração (ASSIS; ABAD; AGUIAR, 2015; RESENDE; BARBOSA, 2005; FONSECA et al., 2010;).

As progênies obtidas a partir dos cruzamentos são avaliadas em testes de progênies e testes clonais, que constituem as etapas básicas do programa de melhoramento. Após a avaliação e seleção na primeira etapa de testes clonais, é comum a instalação de novos testes clonais com os clones selecionados, utilizando-se parcelas maiores, para simular a auto competição dos plantios monoclonais, e em maior número de locais (ensaios comumente denominados “testes clonais ampliados”). A partir daí, é possível selecionar e recombinar genótipos para dar continuidade aos ciclos de seleção, e recomendar clones para plantio em escala operacional (PIRES et al., 2011).

As sucessivas etapas de avaliação e seleção são importantes para confirmar a superioridade e adaptabilidade dos materiais genéticos, em diversas situações ambientais que possibilitem a seleção para resistência às pragas e doenças (ALFENAS et al., 2004). Dado essas diversas etapas, a obtenção de clones para plantio operacional pode dispende cerca de 15 anos.

Além disso, as estratégias de melhoramento florestal devem considerar os efeitos da interação genótipos por ambientes (GxA), que implica na resposta diferencial dos clones

frente às variações ambientais. É essencial entender a estratificação dos ambientes e selecionar clones com alta produtividade e com adaptação aos locais de recomendação (CHAVES, 2021).

Por fim, uma tendência crescente é a incorporação de ferramentas genômicas aos programas de melhoramento clássico (FONSECA et al., 2010; GRATTAPAGLIA; RESENDE, 2010). Um exemplo, já corriqueiro, é o uso de marcadores moleculares (em baixa ou média densidade) para análises de identidade genética e de parentesco. Também, os marcadores genéticos podem ser utilizados para estimar diversidade e distâncias genéticas, visando caracterizar e aprofundar o conhecimento sobre os materiais genéticos de interesse, tanto no nível individual como populacional. Por fim, há ainda o emprego da seleção genômica ampla (SGA) e dos estudos de associação genômica ampla (GWAS, *genome wide association studies*), que podem direcionar e acelerar a obtenção de materiais genéticos de interesse através da seleção assistida por essas ferramentas moleculares.

2.4 Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético do eucalipto

Marcadores moleculares são quaisquer sequências de DNA que apresentam polimorfismo, que podem ser detectadas utilizando técnicas moleculares e que são capazes de fornecer informações a respeito do genótipo (BORÉM; MIRANDA, 2009; SARASWATHY; TAMALINGAN, 2011). Tais marcadores surgem de diferentes tipos de mutações no DNA, como substituições, inserções, deleções e repetições em *tandem*. Os marcadores moleculares vem sendo amplamente empregados em detrimento de outros tipos de marcadores (como os morfológicos e bioquímicos) pois são praticamente ilimitados em número e não são afetados por fatores ambientais ou pelo estágio de desenvolvimento da planta.

Dentre os diversos tipos de marcadores moleculares existentes, destacam-se historicamente: o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e principalmente SSR (*Simple Sequence Repeat*, também conhecidos como ‘microssatélites’) e SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). Os marcadores SSR são sequências de DNA repetitivo, de dois a seis nucleotídeos, com extensão de até 100 pares de base. Os SSR possuem herança codominante (permitem diferenciar indivíduos homocigotos e heterocigotos) e são altamente polimórficos (possuem vasto número de alelos por loco). Além disso, são abundantes no genoma e possuem relativo baixo custo e facilidade de aplicação. Sendo assim, são um dos marcadores mais empregados até hoje, especialmente em aplicações

que exigem uma baixa amostragem da variabilidade genética, como análises de diversidade genética, identidade e parentesco (INGHELANDT et al., 2010).

Mais recentemente, os marcadores SNP tem se destacado frente aos microssatélites, especialmente em aplicações que exigem ampla cobertura genômica como a SGA e o GWAS. SNP são posições de um único par de bases no genoma nas quais existem diferentes alelos nos indivíduos de uma dada população, sendo o alelo menos abundante presente em uma frequência de pelo menos 1% (JEHAN; LAKHANPAUL, 2006). As principais vantagens dos marcadores SNP frente aos SSR são sua maior abundância no genoma, possibilidade de automatização das genotipagens (dispensa a utilização de géis e de eletroforese), rapidez das análises, custo competitivo e maior reprodutibilidade dos resultados. No entanto, os SNP são marcadores bialélicos e, portanto, menos informativos, de modo que um número consideravelmente maior de SNP é necessário para ter um poder discriminatório equivalente ao dos SSR (INGHELANDT et al., 2010).

Para o gênero *Eucalyptus*, milhares de marcadores SNP estão disponíveis por meio da ferramenta EuChip60K, um microarranjo (também chamado de chip) de genotipagem de alta qualidade, que permite a análise de aproximadamente sessenta mil marcadores distribuídos ao longo de todo o genoma (SILVA-JUNIOR; FARIA; GRATTAPAGLIA, 2015). O chip é aplicável para nove diferentes espécies de *Eucalyptus*, incluindo as mais empregadas no melhoramento genético, como *E. grandis*, *E. urophylla* e seus híbridos (SILVA-JUNIOR; FARIA; GRATTAPAGLIA, 2015). A tecnologia está disponível para uso através das plataformas Illumina Infinium® e Affymetrix Axiom®, e já vem sendo empregada para estudos de GWAS e SGA (BALLESTA et al., 2019; LIMA et al., 2019; VALENZUELA et al., 2021, MHOSWA et al., 2022). Além disso, já foram desenvolvidas tecnologias de genotipagem em média e baixa densidade (dezenas ou centenas de marcadores SNP) (Illumina-BeadExpress, ABI/BioTrove-OpenArray, LGC- KASPGenotyping), a partir dos marcadores presentes no EuChip60K, o que permite a genotipagem a um menor custo para aplicações como teste de identidade e paternidade.

Em eucalipto, estudos recentes demonstraram o emprego de marcadores moleculares, especialmente do tipo SNP, para diversas aplicações associadas ao melhoramento genético. Por meio de estudos de GWAS, foram identificados marcadores SNP associados à resistência à vespa-da-galha (MHOSWA et al., 2022), ao crescimento e qualidade da madeira (BALLESTA et al., 2019; LIMA et al., 2019; VALENZUELA et al., 2021) e ao florescimento (BALLESTA et al., 2020). Os marcadores já foram empregados também para avaliação da estrutura populacional, diversidade genética (BUSH; THUMMA, 2013; DILLON et al., 2014;

YANG et al., 2020), níveis de endogamia e reconstrução de parentesco (TELFER et al., 2015).

2.5 Plantios monoclonais *versus* multiclonais

Após o advento da técnica de clonagem na década de 80, os plantios monoclonais de eucalipto passaram a ser amplamente adotados, e atualmente são o principal modelo de produção florestal em escala comercial, tanto no Brasil quanto em países como China, África do Sul, Portugal, Espanha, Chile, Argentina e Uruguai (REZENDE et al., 2019). A clonagem trouxe ganhos excepcionais para os programas de melhoramento, pois viabilizou a multiplicação de híbridos interespecíficos com maior heterose e de árvores superiores e resistentes a doenças (ASSIS, 1996; 2000). Estima-se que os plantios clonais forneceram 25% de ganho em volume de madeira por hectare, em comparação com os plantios seminais nas mesmas condições de cultivo (ASSIS, 2014).

No entanto, após o grande sucesso inicial dos primeiros materiais genéticos selecionados e propagados vegetativamente, o ganho anual em produtividade tem diminuído com o passar do tempo (WU, 2019). Além disso, a ausência de variabilidade genética dentro do plantio comercial com um único clone implica em grande risco frente ao surgimento de novos problemas, como pragas e doenças emergentes e mudanças climáticas imprevistas (GRIFFIN, 2014; KENENI; IMTIAZ, 2012; LOUWAARS, 2018). Além disso, como o ciclo de melhoramento do eucalipto é longo (cerca de 15 anos até a recomendação de um novo clone operacional), os clones avaliados durante o programa por vezes são testados e selecionados em condições diferentes daquelas em que serão plantados, o que aumenta a incerteza quanto à sua performance.

Um exemplo da vulnerabilidade dos plantios monoclonais de eucalipto foram os impactos causados pelo distúrbio fisiológico, doença abiótica registrada pela primeira vez em 2007 no sul da Bahia e no Espírito Santo. A hipótese mais aceita para o aparecimento do distúrbio fisiológico foram as alterações climáticas ocorridas no período (alta precipitação seguida de seca prolongada). Os prejuízos foram enormes já que a grande maioria dos clones cultivados em escala comercial na época não eram tolerantes a essa doença. O distúrbio ocasiona sintomas como a perda de dominância apical, seca de ponteiro, necrose do tronco, encarquilhamento das folhas e superbrotações, o que provocou perdas de até 40% em produtividade e levou à mortalidade de grande parte dos plantios comerciais (comunicação pessoal). Desse modo, torna-se importante explorar estratégias de cultivo comercial alternativas aos plantios monoclonais.

O plantio de multilinhas, empregado em culturas como a soja, o trigo, o arroz e o feijão, é um exemplo de estratégia que oferta maior segurança, conquanto assegura um bom nível de produtividade (REZENDE et al., 2019). Nesse modelo de cultivo, são plantadas séries de linhagens geneticamente semelhantes, mas que diferem quanto a um caractere de interesse (e.g. resistência a doença). Diversos estudos demonstraram as vantagens das multilinhas frente a cultivares puras, no que diz respeito ao rendimento de grãos e à incidência de patógenos. Botelho et al. (2010) demonstraram que as multilinhas de feijão apresentaram rendimento de grãos semelhante ao das linhagens individuais mais produtivas, mesmo quando 28% de linhagens susceptíveis estavam presentes na mistura. Helland e Holland (2001) mostraram que multilinhas de aveia apresentaram rendimento superior e produção estável em comparação com monocultura de linhagens puras. Resultados igualmente favoráveis foram descritos para as culturas do trigo (FINCKH; MUNDT, 1992) e do arroz (ZHU et al., 2000).

Em eucalipto, um exemplo de sucesso é a estratégia de Compostos Clonais (CCs), adotada de forma pioneira no Brasil pela empresa Fibria Celulose (atual Suzano S.A.) em 2014. Os CCs foram testados em resposta aos danos causados pelo aparecimento do distúrbio fisiológico e à necessidade de uma alternativa para mitigação de riscos. Essa estratégia consiste no plantio de uma mistura de clones superiores, distintos geneticamente, mas semelhantes quanto ao padrão de crescimento e produtividade. Rezende et al (2019) demonstraram que plantios de CCs apresentam, em média, produtividades superiores aos plantios monoclonais (tanto em escalas experimentais quanto operacionais), boa uniformidade, menor vulnerabilidade genética e menor taxa de replantio por perdas causadas por estresses bióticos e abióticos. No sul da Bahia e no Espírito Santo, onde as condições ambientais são mais adversas em decorrência do distúrbio fisiológico, a média de produtividade (em IMA, $m^3 \cdot ha^{-1} \cdot ano^{-1}$) dos plantios de CC foi 7,7% superior à média dos plantios monoclonais. Ademais, há evidências de que os CCs são mais eficientes do que os monoclonos na mitigação da interação GxA (OLIVEIRA, 2020). Outra importante vantagem dessa estratégia é o dinamismo: se um ou mais clones não apresentarem um bom desempenho em um determinado momento, por qualquer motivo, estes podem ser identificados via genotipagem e removidos do composto.

Além disso, diversos estudos corroboram que a maioria dos clones de eucalipto performa melhor no modelo de alocompetição (e.g., CCs) do que em autocompetição (plantios monoclonais) (REZENDE et al., 2019). Forrester e Smith (2012) evidenciaram que plantios com mistura de duas espécies de eucalipto tiveram ganhos de produtividade de até 30% em comparação aos plantios de espécie única, e que a competição interespecífica foi menos intensa do que a competição intraespecífica. Boyden, Binkley e Stape (2008)

demonstraram que a variação genética reduz as interações competitivas entre as árvores vizinhas e favorecem a produtividade. Assim, além da menor vulnerabilidade associada a maior diversidade genética, os plantios multiclonais de eucalipto permitem ganhos de produtividade devido à capacidade dos clones “alo-competidores” de promover complementaridade, estabilidade fenotípica e melhor utilização dos recursos ambientais.

2.6 Famílias Clonais de *Eucalyptus*

Outra alternativa potencial – e ainda pouco explorada - de plantio multiclonal em eucalipto são as famílias clonais. Esta estratégia consiste no plantio de um conjunto de clones aparentados, selecionados dentro de uma mesma progênie superior, e que apresentam semelhança no ritmo de crescimento, adaptação e produtividade.

A formação de uma família clonal se dá pela identificação de uma progênie potencial e pela seleção das árvores superiores desta progênie, considerando características de interesse como forma, incremento volumétrico e resistência a pragas e doenças. A progênie que dá origem à família clonal pode advir da polinização controlada entre genitores testados no programa de melhoramento ou de polinização aberta (sementes coletadas em árvores superiores em pomares). Dessa forma, os clones que compõem a família clonal podem ser irmãos completos ou meios irmãos, respectivamente. É importante que a progênie em questão tenha produtividade média elevada e equivalente à produtividade de clones operacionais. Ainda, a seleção dentro de uma mesma progênie, em detrimento de seleção massal em plantios seminais sem estrutura de famílias, é importante para estimar o valor genético da família controlando os efeitos ambientais.

As árvores selecionadas na progênie são abatidas, e as brotações são coletadas e inseridas no minijardim clonal (MJC) no viveiro. A partir do MJC são produzidas mudas para plantio em escala semioperacional, isto é, plantio de talhões operacionais em área correspondente a até 3% da área anual de cultivo de cada ambiente. Ou seja, nessa estratégia as matrizes selecionadas podem ser recomendadas para plantio multiclonal em escala semioperacional sem passar pelas fases de testes clonais e testes clonais ampliados, o que permite um ganho expressivo de tempo na *pipeline* de melhoramento genético (TABELA 1; FIGURA 2). O avanço de fases dentro do programa de melhoramento é suportado pela maior variabilidade genética da família clonal (a qual garante maior estabilidade na produtividade e minimização dos riscos) e pela sua formação a partir de genitores previamente testados.

Posteriormente, pode-se realizar a purificação da população nos plantios semioperacionais, para obtenção e recomendação de uma família clonal melhorada em escala operacional.

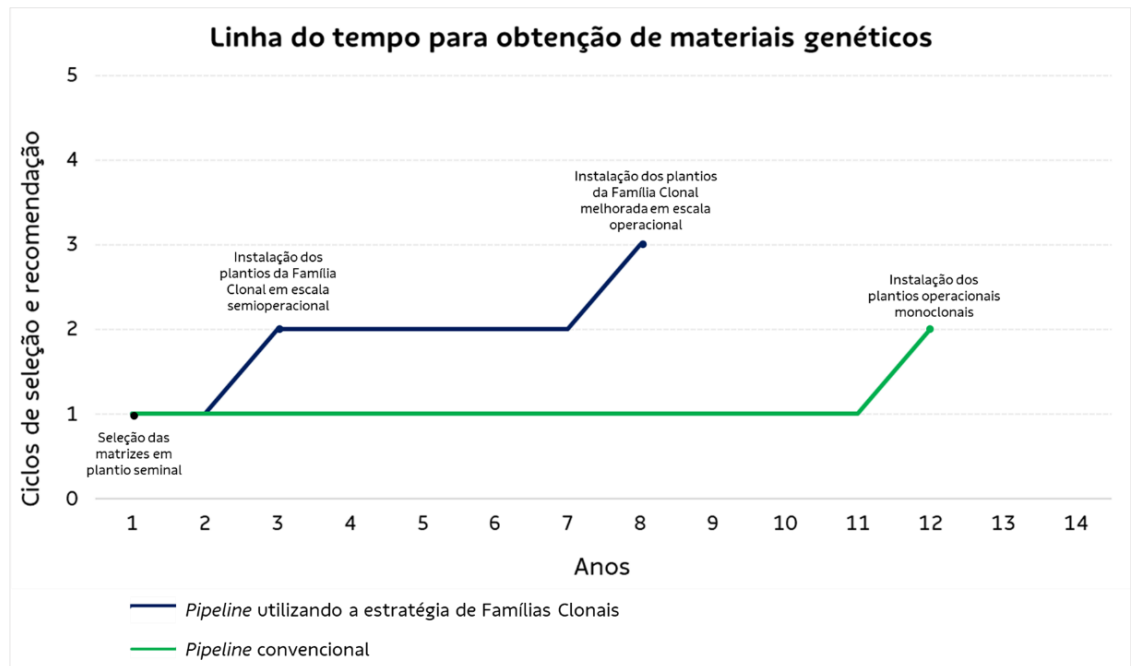
Ainda, se desejado, pode-se realizar a seleção de clones (de forma individualizada) dentro dos plantios multiclonais, para avanço na *pipeline* de Melhoramento visando recomendação em escala monoclonal.

Tabela 1 - Comparação entre a *pipeline* convencional para obtenção e recomendação de materiais genéticos e a *pipeline* utilizando a metodologia de famílias clonais.

	Ano								
Metodologia	1	2	3	6	7	8	11	12	
<i>Pipeline convencional para recomendação de clones</i>	Seleção das matrizes, resgate e introdução no minijardim clonal (MJC)	Produção de mudas e instalação de Testes Clonais (TCL)	TCL em andamento	Seleção dos melhores clones nos TCL, resgate e introdução no MJC	Produção de mudas e instalação de Testes Clonais Ampliados (TCA)	TCA em andamento	Seleção dos melhores clones nos TCA para recomendação de plantio monoclonal em escala operacional, resgate e introdução no MJC	Produção de mudas e instalação dos plantios operacionais	
<i>Pipeline para recomendação de famílias clonais</i>	Seleção das matrizes, resgate e introdução no minijardim clonal (MJC)	Produção de mudas para ampliação do MJC	Produção de mudas e instalação dos plantios em escala semioperacional	Seleção das melhores árvores dentro da população clonal inicial, genotipagem, resgate e introdução dos clones no MJC (purificação)	Produção de mudas para ampliação do MJC	Produção de mudas e instalação de plantios operacionais com a Família Clonal melhorada			

Fonte: Adaptado de Souza, 2016.

Figura 2 - Comparação entre a *pipeline* convencional para obtenção e recomendação de materiais genéticos e a *pipeline* utilizando a metodologia de famílias clonais.



Fonte: Adaptado de Souza, 2016.

Souza (2016) apresentou os resultados de produtividade e diversidade de uma família clonal de *E. grandis* formada a partir de 57 clones selecionados em uma progênie de polinização controlada, proveniente do cruzamento entre dois clones elite da Suzano S.A. Os materiais genéticos foram selecionados no plantio seminal para os critérios de forma, produtividade e densidade básica, e misturados para a instalação de talhões operacionais em diferentes ambientes. O ganho médio destes plantios, em comparação com a população seminal inicial, foi de 20,7%. Posteriormente, foi realizado ainda a seleção, ou purificação, da família clonal inicial. Dentro dos talhões operacionais, foram demarcadas três parcelas de 100 plantas, mensuradas e identificadas as melhores árvores, utilizando intensidades de seleção de 40, 30, 20 e 10%. As árvores selecionadas foram genotipadas para a determinação de suas identidades genéticas, e os ganhos com a seleção em diferentes intensidades foram calculados, visando estimar e correlacionar a diversidade genética e a produtividade. Os resultados mostraram que as seleções de 30% e 40% são as mais indicadas, pois permitem conservar um bom número de clones e proporcionar ganhos expressivos em produtividade. Em média, utilizando as intensidades de 30 e 40% de seleção dentro das famílias clonais, os ganhos em IMA foram de 22% e 18% em relação à família clonal inicial.

Desse modo, considerando que a metodologia assegura ganhos elevados com a seleção, garante a manutenção da diversidade genética, diminui o tempo da recomendação de cultivares para plantios operacionais e oferta maior segurança frente a pragas, doenças e

mudanças climáticas, concluiu-se que a estratégia de famílias clonais é uma excelente alternativa à seleção tradicional de clones. Por se tratar de uma metodologia ainda pouco explorada, são válidos novos estudos para aferir seu potencial para novas regiões de cultivo, em termos de produtividade e variabilidade genética.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais genéticos

Os clones presentes na família clonal utilizada neste trabalho foram selecionados em uma progênie de polinização aberta, da espécie *E. grandis*, de origem Atherton (QLD- AUS) e procedência Putiri (Aracruz, ES). A seleção foi realizada em um Teste de Progênies instalado no município de Caravelas, BA, em 2005.

O histórico da obtenção destes materiais iniciou-se em 1970, quando a empresa Aracruz Celulose adquiriu sementes de *E. grandis* oriundas de Atherton e instalou Testes de Progênies (TPR) na região de Putiri, no litoral de Aracruz, ES. Posteriormente, os TPR foram desbastados e transformados em Pomar de Sementes por Muda (PSM, 1ª geração). Em 1991, a empresa Bahia Sul Celulose (atual Suzano S.A.) comprou da Aracruz Celulose sementes coletadas em matrizes deste PSM e efetuou o plantio de talhões operacionais em dois locais distintos, no município de Caravelas, BA. Os talhões foram desbastados, formando Áreas de Produção de Sementes (APS) de 2ª geração. Uma das APS foi destinada para fins de conservação - estando ainda ativa na empresa - e a outra utilizada para a coleta de sementes, visando avanço da população no programa de melhoramento genético e adaptação à região (formação de raça local), seguindo estratégia de seleção recorrente intrapopulacional.

Em 2005, 30 progênies coletadas na APS foram avaliadas em um TPR com parcelas aumentadas, composto por aproximadamente 151 mil plantas, no município de Caravelas, BA. Em 2010, foi realizada a seleção no TPR, considerando critérios de produtividade, sanidade e forma de fuste, visando avanço de fase para Testes Clonais (TCL). Na melhor progênie do experimento, cuja média de IMA se equiparava à média dos clones operacionais plantados no mesmo local, foram selecionados cerca de 500 indivíduos (intensidade de seleção de aproximadamente 10%). Estes indivíduos foram então elencados para formar a família clonal utilizada neste estudo.

Cabe destacar que os materiais foram selecionados em local de alta incidência do distúrbio fisiológico do eucalipto e ferrugem - doenças altamente relevantes para as regionais Bahia e Espírito Santo - e apresentaram fenótipo resistente, reforçando o seu potencial para a região.

Os clones selecionados foram abatidos e a brotação foi coletada para introdução no minijardim clonal. Após perdas em função da capacidade de brotação e enraizamento, 249

clones foram introduzidos com sucesso no minijardim, e posteriormente propagados para plantio da família clonal em escala semioperacional nos anos subsequentes.

3.2 Localização das áreas de plantio da família clonal

Nos anos de 2014 e 2015, a família clonal foi plantada em escala semioperacional em diversos talhões operacionais na unidade Bahia. Para este estudo, foram selecionados quatro talhões, instalados em condições ambientais distintas e representativas da região.

Na tabela 2 são apresentadas as informações geográficas de cada um dos locais, e na figura 3 as localizações. Os talhões possuem área de 4,7 a 16,8 hectares, e estão localizados em regiões com altitudes de 76 a 144 metros, nos municípios de Caravelas e Mucuri. Em todos os locais o solo é do tipo argissolo com textura média.

Tabela 2 - Informações geográficas, data de plantio e espaçamento entre árvores dos talhões operacionais utilizados no estudo.

Local	Município	Data de plantio	Área do talhão (ha)	Latitude	Longitude	Altitude (m)	Espaçamento (m)
A	Mucuri, BA	10/03/2015	12,1	-18,2217	-39,8051	76	3x2,5
B	Caravelas, BA	14/04/2015	4,7	-17,5931	-39,502	82	3x2,5
C	Caravelas, BA	31/10/2014	11,3	-17,6917	-39,7929	110	3x3
D	Caravelas, BA	28/07/2015	16,8	-17,5723	-39,9132	144	3x2,5

Fonte: da autora (2022).

Figura 3 – Mapa com a localização dos talhões operacionais utilizados no estudo.



Fonte: da autora (2022).

A tabela 3 apresenta a descrição climática de cada local. Os dados foram obtidos para o período de avaliação (2014 ou 2015 a 2021), por meio de interpolação de dados de estações meteorológicas localizadas próximas às áreas de plantio. A precipitação anual média variou de 824 a 1151 mm, e a temperatura anual média variou 23,7 °C a 24,4 °C. O índice de aridez (que representa a razão entre a precipitação e a evapotranspiração) variou de 0,65 a 0,87 (UNESCO, 1979). Quanto menor o índice de aridez, mais seco é o ambiente.

Tabela 3 - Informações climáticas dos talhões operacionais utilizados no estudo.

Local	Temperatura mínima média (°C)	Temperatura média (°C)	Temperatura máxima média (°C)	Precipitação média anual (mm)	Evapotranspiração potencial anual (mm)	Índice de aridez
A	20,4	24,2	29,5	974	1356	0,72
B	20,7	24,4	29,1	1151	1328	0,87
C	20,1	23,8	29,0	967	1263	0,77
D	20,2	23,7	28,8	824	1259	0,65

Fonte: da autora (2022).

3.3 Coleta de dados

Em cada talhão da família clonal, foram demarcadas três parcelas quadradas de 100 plantas, alocadas sistematicamente dentro do plantio, totalizando 300 árvores por local. A circunferência à altura do peito (CAP, cm) das árvores foi mensurada com auxílio de uma fita diamétrica, e o diâmetro à altura do peito (DAP, cm) foi estimado através da fórmula: $DAP = CAP/\pi$. As medições foram feitas nos plantios aos 6 anos de idade, aproximadamente.

Com o dado de DAP, as árvores de cada parcela foram ordenadas de forma decrescente, e as 30 melhores árvores de cada parcela foram selecionadas, totalizando assim 90 árvores por local. Essas árvores foram genotipadas com 92 marcadores SNPs (ver seção 3.4) para identificação clonal, com o objetivo de realizar uma purificação na família clonal inicial. O nível de seleção de 30% foi adotado pois permite a obtenção de ganhos em produtividade concomitantemente à manutenção da variabilidade genética, conforme evidenciado por Souza (2016).

Para as 30% melhores árvores selecionadas, uma nova medição foi realizada aos 7 anos, para tomada dos dados de DAP e de altura (ALT, m), com auxílio de fita diamétrica e hipsômetro, respectivamente. A partir do DAP e da ALT foi calculado o volume individual (VOL, m³), utilizando a equação do inventário da empresa, ajustada para a unidade da Bahia. Com o número de árvores por hectare (N), calculado em função do espaçamento dos plantios,

foi possível estimar o incremento médio anual com casca (IMA, $m^3 \cdot ha^{-1} \cdot ano^{-1}$) através da fórmula: $IMA = \frac{VOL}{idade} \times N$.

Além do desempenho em IMA (principal variável de seleção), as árvores também foram avaliadas quanto à forma do fuste, sobrevivência e sanidade.

Para fins de comparação, em cada local foi selecionado um talhão com plantio de clone operacional (testemunha) adjacente ao talhão da família clonal. Nesses talhões monoclonais, foram demarcadas duas parcelas circulares de 20 plantas (parcelas no formato de inventário operacional) e mensurado o CAP das árvores, a partir do qual o DAP foi estimado. Vale destacar que os talhões com plantio de clone operacional e com plantio da família clonal tiveram os mesmos tratamentos silviculturais.

Para apresentar a performance em DAP da família clonal e das testemunhas em cada local, foram plotados gráficos *boxplot*, confeccionados no software R (R CORE TEAM, 2020), por meio do pacote ggplot2 (WICKHAM, 2016).

3.4 Identificação clonal das árvores selecionadas nos quatro locais

Para as 30% melhores árvores selecionadas em cada local, foi realizada coleta de amostra vegetal, para posterior extração de DNA e genotipagem. As amostras foram coletadas por meio de raspagem do tecido cambial com bisturi, após abertura de um painel na casca, conforme ilustrado na figura 4. O material coletado foi acondicionado em tampão CTAB 2% e o DNA foi extraído seguindo protocolo desenvolvido pela Suzano S.A., adaptado de Doyle e Doyle (1987).

Figura 4 - Amostragem de tecido do câmbio para extração de DNA.



Fonte: FuturaGene, Suzano S.A (2019).

A genotipagem foi realizada na empresa LGC Genomics (LGC, Teddington, UK), utilizando um painel com 92 marcadores moleculares do tipo SNP, por meio da metodologia KASP (*Kompetitive allele specific PCR*). A análise da qualidade dos dados de genotipagem e

do perfil genético das árvores selecionadas foi realizada pela empresa AgroPartners (Agropartners Consulting, Araçatuba, SP). Os perfis genéticos das árvores foram comparados entre si, e também comparados com o banco de genotipagens da empresa.

Os 92 SNPs utilizados no trabalho correspondem a um *subset* de marcadores SNPs disponível na plataforma EuChip60k, e foram previamente selecionados pela Suzano S.A para a construção de um painel de genotipagem de baixa densidade. Os SNPs deste subconjunto atendem aos critérios de qualidade (*GenTrain Score* > 0,9; *Call Rate* > 0,99; *Minor Allele Frequency* (MAF) > 0,02; P-value HWE > 0,05 e $R^2 < 0,15$) e estão distribuídos em todos os 11 cromossomos do genoma do eucalipto. O painel já havia sido anteriormente validado em diversos clones do germoplasma da empresa e sua alta capacidade discriminatória clonal foi comprovada.

Com base no perfil genético das árvores selecionadas, foram identificados os clones presentes na família clonal em cada local, na intensidade de seleção de 30%. Por meio dessa análise também foi possível anotar o número de vezes que um determinado clone aparece entre as 30% melhores árvores selecionadas em cada um dos quatro locais.

3.5 Coincidência e correlação entre os clones selecionados em cada local

Visando verificar o número de clones diferentes genotipados em cada local, bem como o número de clones coincidentes entre as 30% melhores árvores de cada local, foi construído um Diagrama de Venn, utilizando a plataforma Venny 2.1 (OLIVEROS, 2015).

A fim de avaliar a correlação linear entre o ordenamento no desempenho silvicultural dos clones coincidentes entre os locais, foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman. A correlação de Spearman pode ser descrita pela seguinte equação (DIAS; BARROS, 2009):

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum_i d_i^2}{(n^3 - n)}$$

Onde $d_i = R(x_i) - R(y_i)$ é a diferença entre os *rankings* de cada observação, e n é o número de observações (pares de x e y).

O coeficiente de correlação de Spearman foi obtido por meio do *software* R, utilizando a função `cor.test` do pacote `stats` (R CORE TEAM, 2020).

3.6 Análise da diversidade genética dos clones da família clonal

Para avaliar a diversidade genética dos clones presentes nas 30% melhores árvores em cada local, foram estimadas as médias de MAF (*minor allele frequency*), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e) e índice de fixação de Wright (F) para os marcadores SNP utilizados nas genotipagens. Para cada locus com alelos A_1 e A_2 , as métricas foram calculadas por meio das equações descritas abaixo:

$$MAF = \min(p, q)$$

$$H_o = \frac{nH}{N}$$

$$H_e = 1 - p^2 - q^2$$

$$F = \frac{(H_e - H_o)}{H_e}$$

Em que:

p é a frequência do alelo A_1 ;

q é a frequência do alelo A_2 ;

nH é o número de genótipos heterozigotos (A_1A_2 ou A_2A_1) em um determinado locus;

N é o número total de indivíduos.

As análises foram realizadas no software R (R CORE TEAM, 2020), utilizando o pacote `snpReady` (GRANATO; FRITSCHÉ-NETO, 2018). Foram analisados apenas os marcadores que apresentaram MAF maior que 0,05 e *Call Rate* maior que 0,7.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desempenho da família clonal inicial e comparação com a testemunha operacional monoclonal

A tabela 4 apresenta o resultado do desempenho silvicultural da família clonal (FC) e da testemunha operacional (TE) em cada local. São apresentadas as médias de porcentagem de sobrevivência (SOB, %) e diâmetro à altura do peito (DAP, cm), à nível geral e de parcelas. Também foram estimados o intervalo de confiança (IC, cm) e coeficiente de variação (CV, %) para os dados de DAP.

Na figura 5 é apresentado um gráfico *boxplot* comparando a performance em DAP para a família clonal e para a testemunha em cada local.

Tabela 4 - Dados médios da performance da família clonal inicial (FC) e da testemunha operacional (TE) nos quatro locais, à nível de parcela e geral: diâmetro à altura do peito (DAP), intervalo de confiança (IC), coeficiente de variação (CV%) e sobrevivência. (continua)

Local	Idade de medição	Material genético	Parcela	DAP	IC	CV%	SOB
A	5,9	FC	1	15,8	[15,0 - 16,7]	25	85
		FC	2	15,9	[15,2 - 16,6]	23	95
		FC	3	16,4	[15,6 - 17,2]	24	94
		FC	Total	16,0	[15,6 - 16,5]	24	91
		TE	1	14,6	[13,4 - 15,8]	18	100
		TE	2	14,3	[13,4 - 15,1]	14	100
		TE	Total	14,4	[13,7 - 15,2]	16	100
B	5,9	FC	1	15,7	[14,9 - 16,4]	24	94
		FC	2	15,8	[15,1 - 16,6]	22	89
		FC	3	17,0	[16,2 - 17,8]	24	97
		FC	Total	16,2	[15,7 - 16,6]	23	93
		TE	1	16,1	[15,0 - 17,2]	16	100
		TE	2	15,8	[15,1 - 16,6]	11	100
		TE	Total	16,0	[15,3 - 16,6]	14	100
C	6,3	FC	1	15,1	[14,6 - 15,7]	17	86
		FC	2	15,2	[14,7 - 15,8]	18	88
		FC	3	15,4	[14,9 - 16,0]	16	83
		FC	Total	15,3	[14,9 - 15,6]	17	86
		TE	1	16,0	[15,4 - 16,5]	8	100
		TE	2	15,8	[15,3 - 16,3]	7	100
		TE	Total	15,9	[15,5 - 16,2]	7	100

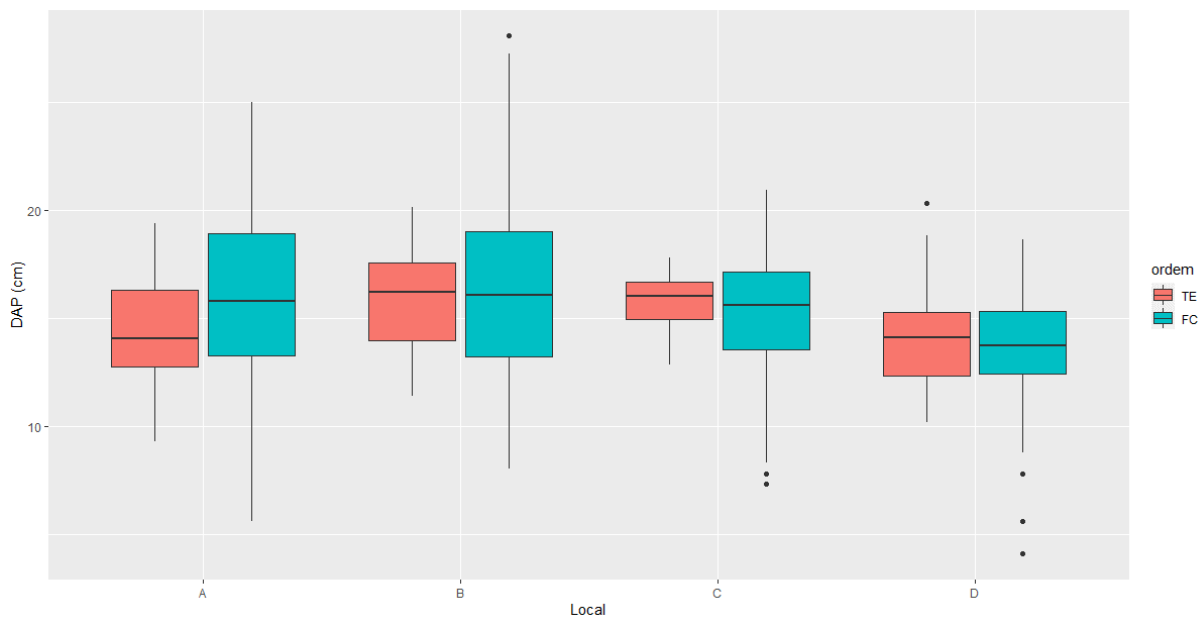
(conclusão)

Local	Idade de medição	Material genético	Parcela	DAP	IC	CV%	SOB
D	5,6	FC	1	14,0	[13,5 - 14,4]	13	78
		FC	2	13,9	[13,3 - 14,4]	17	71
		FC	3	13,6	[13,1 - 14,1]	17	73
		FC	Total	13,8	[13,5 - 14,1]	16	74
		TE	1	13,8	[13,0 - 14,5]	12	100
		TE	2	14,3	[13,1 - 15,5]	20	100
		TE	Total	14,0	[13,3 - 14,8]	17	100

DAP: diâmetro à altura do peito (cm); IC: intervalo de confiança a 95% de significância (cm); CV: coeficiente de variação (%); SOB: sobrevivência (%)

Fonte: da autora (2022).

Figura 5 - Distribuição de DAP (cm) para a família clonal inicial (FC), em comparação com a testemunha operacional (TE) em cada local.



Fonte: da autora (2022).

Pode-se observar que a performance da família clonal foi melhor no local B, tanto em relação à média de DAP (16,2cm) quanto à sobrevivência (93%), enquanto o pior desempenho ocorreu no local D (média de DAP 13,8cm e sobrevivência 74%). Para as testemunhas operacionais, a maior e menor média de DAP também foram observadas para os locais B e D, respectivamente. Esse resultado está em linha com a performance observada para os plantios operacionais da empresa nesses locais. O local B possui a maior média anual de precipitação e o maior índice de aridez, sendo, portanto, um ambiente mais úmido e mais favorável. Já o local D possui o menor índice de aridez, além de histórico de ocorrência de déficit hídrico.

Vale destacar que os sites A e B estão localizados nas regiões com maior incidência de distúrbio fisiológico (maior proximidade ao litoral e menores altitudes). O bom desempenho da família clonal nesses locais corrobora o fenótipo resistente dos clones que compõem o plantio, o que já havia sido observado na seleção feita no plantio seminal para composição da família clonal.

Nos locais A, B e C, a variação dos dados de DAP para os clones testemunha foi menor do que para a família clonal, conforme evidenciado pelos valores de CV e pela dispersão dos dados de DAP no *boxplot*. Esse resultado está dentro do esperado, pois no plantio monoclonal não há variação genética entre as árvores, isto é, toda a variação observada deve-se ao ambiente. Já no plantio da família clonal, além da variação ambiental, há a variação genética entre os diversos clones presentes no plantio. No local D, no entanto, a variação dos dados de DAP foi similar para a testemunha operacional e para a família clonal. Por ser um ambiente mais desafiador, o local D pode ser menos efetivo em diferenciar os clones com maior potencial. Ou seja, neste local a performance dos clones tende em direção à média.

Nos locais A e B, a média de DAP da família clonal foi superior à da testemunha (16,0cm *versus* 14,4cm no local A e 16,2cm *versus* 16,0cm no local B). Já nos locais C e D, a produtividade da testemunha monoclonal foi superior. O número de clones que compõem a família clonal inicial (249 clones) é muito elevado, e por conseguinte a heterogeneidade dos plantios também é alta, o que afeta a produtividade. No futuro, para a formação de novas famílias clonais a partir da seleção em plantios seminais, podem ser aplicadas intensidades de seleção maiores, visando a obtenção de um conjunto menor de clones, com maiores ganhos. Contudo, o conjunto de clones selecionado deve ser suficientemente grande para permitir novas seleções e purificações no futuro, visto que cada clone selecionado no plantio seminal está representado por uma única repetição, em um único local. Assim, sua performance pode não se manter nos plantios futuros em novos locais e ambientes. Além disso, uma maior diversidade de clones pode minimizar os efeitos da interação GxA.

Em suma, observa-se que a família clonal apresenta valores competitivos de DAP em relação às testemunhas nos quatro locais, além de possuir elevada variação de DAP entre as árvores, especialmente nos locais A e B. Esses resultados subsidiam a aplicação de seleção dos melhores clones dentro da família clonal para obtenção de uma família clonal melhorada, com ganhos em produtividade.

4.2 Ganhos em produtividade com a seleção dentro da família clonal inicial

Com o objetivo de realizar uma purificação para aumentar a produtividade da família clonal, nos quatro locais foram selecionadas as 30 árvores com o maior DAP em cada uma das três parcelas, totalizando assim 90 árvores por local. O nível de seleção de 30% foi adotado pois permite a obtenção de ganhos em produtividade concomitantemente à manutenção da variabilidade genética, conforme evidenciado por Souza (2016).

Conforme apresentado na tabela 5, a seleção das 30% melhores árvores de cada parcela proporcionou incremento expressivo na média de DAP da família clonal em cada local, variando de 15,8 cm (local D) a 20,5 cm (local B), o que representou ganhos de 14% a 27% em relação à família clonal inicial.

Em comparação com a testemunha operacional de cada local, os ganhos em DAP com a seleção aplicada à família clonal variaram de 13% a 41%. É importante ressaltar que esses ganhos provavelmente estão superestimados, pois parte da superioridade das melhores árvores possui natureza ambiental e, portanto, não será transmitida para futuros plantios com essas árvores selecionadas. A real produtividade e os ganhos poderão ser aferidos apenas quando as árvores selecionadas forem testadas em alo-competição umas com as outras em novos plantios (plantios da família clonal melhorada). Ainda assim, os resultados indicam que há muita margem para ganhos em produtividade com a utilização de uma família clonal melhorada, além dos ganhos esperados em uniformidade.

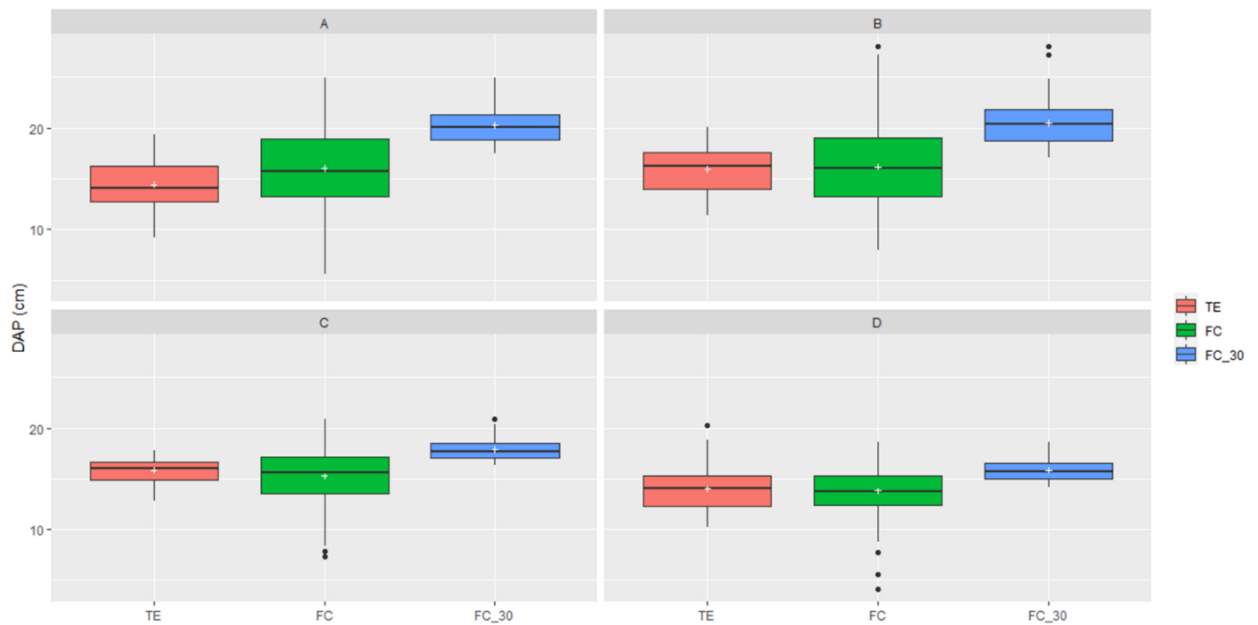
Tabela 5 - Média e ganhos em DAP com a seleção das 30% melhores árvores de cada parcela da família clonal, em comparação com a família clonal inicial e com a testemunha operacional, nos quatro locais.

Local	Média de DAP das 30% melhores árvores da família clonal	Média de DAP da família clonal inicial	Média de DAP da testemunha operacional	Ganho em relação à família clonal inicial	Ganho em relação à testemunha operacional
A	20,3	16,0	14,4	27%	41%
B	20,5	16,2	16,0	27%	28%
C	17,9	15,3	15,9	17%	13%
D	15,8	13,8	14,0	14%	13%

Fonte: da autora (2022).

A seleção também implicou em uma diminuição significativa da variação dos dados de DAP, em comparação com a dispersão observada anteriormente na família clonal inicial, o que já era esperado em função da redução da variabilidade genética (FIGURA 6).

Figura 6 – Distribuição dos dados de DAP (cm) para as 30% melhores árvores em cada parcela da família clonal (FC_30), em comparação com a família clonal inicial (FC) e a testemunha operacional (TE), por local.



O símbolo em branco em cada *boxplot* representa a média de DAP.

Fonte: da autora (2022).

Ademais, conforme apresentado na figura 2 do referencial teórico, a obtenção e a recomendação de famílias clonais melhoradas podem ocorrer mais rapidamente do que a de monoclonas, proporcionando um ganho de até quatro anos na *pipeline* de melhoramento genético. Diante do exposto, é possível constatar o potencial e a viabilidade da estratégia de famílias clonais para a obtenção e recomendação de cultivares, assegurando ganhos em produtividade e tempo.

Antes de prosseguir com o abate das árvores selecionadas na família clonal inicial, e com a instalação no minijardim e propagação vegetativa para realizar os plantios operacionais, é importante determinar a identidade genética das árvores, por meio do uso de marcadores moleculares. Essa análise permite determinar o número de clones diferentes presentes na seleção, elucidar a variabilidade genética das árvores selecionadas e comparar a identidade dos clones selecionados nos diferentes locais. A partir disso, será possível deliberar entre a formação de uma única família clonal melhorada para todos os locais (caso haja coincidência significativa entre os clones), ou a formação de famílias clonais específicas para cada local. Além disso, será possível simular o impacto na variabilidade genética e nos ganhos em produtividade quando maiores intensidades de seleção forem aplicadas na família clonal.

4.3 Caracterização do perfil genético dos clones presentes nas árvores selecionadas

Por meio da genotipagem das 90 árvores selecionadas em cada local (intensidade de 30%), com o conjunto de 92 marcadores SNPs, o número de clones distintos presente em cada local foi identificado (TABELA 6).

Tabela 6 - Número de clones presentes nas 30% melhores árvores da família clonal em cada local, no total e por parcela.

Local	Parcela 1	Parcela 2	Parcela 3	Total
A	17	20	16	43
B	24	18	17	45
C	24	25	26	57
D	18	20	25	53
-	-	-	-	123*

*O número total de clones não corresponde à soma do número de clones em cada local, pois há clones coincidentes entre os locais.

Fonte: da autora (2022).

Das 360 árvores genotipadas no total, duas não foram aprovadas no controle de qualidade (*Call Rate* < 70%) (uma árvore da parcela dois do local A e uma árvore da parcela dois do local D). Consequentemente, essas amostras não tiveram sua identidade genética determinada. Para as 358 amostras restantes, foram identificados 123 clones diferentes. Dois destes clones, representados por três árvores, tiveram identidade genética correspondente à de testemunhas operacionais, provavelmente devido à atividade de replantio para eliminar as falhas no início da implantação florestal. Esses são os clones C016, presente em duas árvores no local C, e C019, representado por uma árvore no local A. Assim, foram identificados 121 clones da família clonal dentre as árvores selecionadas. Em cada local, dentro das 90 árvores selecionadas, o número de clones variou de 43 (local A) a 57 (local C).

O maior número de clones identificado nos locais C e D pode estar associado com a menor variação de DAP observada nesses locais, conforme evidenciado nas figuras 5 e 6 (menor dispersão dos dados de DAP da família clonal inicial em relação à mediana). Por serem ambientes mais desafiadores, estes são menos efetivos em diferenciar os clones com maior potencial. Ou seja, de modo geral a performance dos clones tende em direção à média, e consequentemente menos clones são eliminados com a aplicação de seleção, e o número final de clones selecionados é maior. De modo contrário, os ambientes A e B possuem a maior média e a maior dispersão em direção à média, sendo assim mais favoráveis para a discriminação e seleção dos clones com maior potencial.

Na tabela 7 é apresentada a lista dos clones e as suas respectivas frequências em cada um dos quatro locais.

Tabela 7 - Frequência de participação dos clones nos locais A, B, C e D. (continua)

Clone	Local A		Local B		Local C		Local D	
	Nº de árvores	Nº de árvores (%)	Nº de árvores	Nº de árvores (%)	Nº de árvores	Nº de árvores (%)	Nº de árvores	Nº de árvores (%)
C001	1	1%			2	2%	2	2%
C002					2	2%		
C003					1	1%		
C004	1	1%			2	2%	1	1%
C005					2	2%		
C006					1	1%		
C007	7	8%	4	4%				
C008	2	2%	3	3%			1	1%
C009	1	1%						
C010	2	2%	1	1%				
C011					3	3%		
C012					2	2%		
C013					1	1%		
C014	1	1%			1	1%	1	1%
C015			1	1%	1	1%	5	6%
C016					2	2%		
C017					1	1%		
C018			2	2%	2	2%		
C019	1	1%						
C020	1	1%						
C021	2	2%						
C022	2	2%	3	3%			2	2%
C023							2	2%
C024	3	3%					1	1%
C025	3	3%	1	1%	6	7%	2	2%
C026	1	1%					2	2%
C027							2	2%
C028	4	4%						
C029	1	1%			1	1%		
C030	1	1%	5	6%			1	1%
C031	2	2%						
C032					1	1%		
C033	3	3%	1	1%				
C034					1	1%	2	2%
C035			1	1%			1	1%
C036			1	1%	1	1%	1	1%
C037	1	1%			2	2%		
C038	1	1%			1	1%	1	1%

C039							1	1%
C040	2	2%						
C041					1	1%		

(continua)

Clone	Local A		Local B		Local C		Local D	
	Nº de árvores	Nº de árvores (%)	Nº de árvores	Nº de árvores (%)	Nº de árvores	Nº de árvores (%)	Nº de árvores	Nº de árvores (%)
C042	1	1%						
C043			1	1%				
C044	1	1%						
C045	1	1%						
C046	7	8%	6	7%	4	4%	3	3%
C047	1	1%						
C048							2	2%
C049	5	6%	9	10%			1	1%
C050	2	2%			1	1%	1	1%
C051	1	1%	1	1%	1	1%		
C052			1	1%				
C053	1	1%						
C054							1	1%
C055	4	4%	8	9%			2	2%
C056	1	1%						
C057	6	7%					1	1%
C058	3	3%						
C059							2	2%
C060							3	3%
C061			4	4%			1	1%
C062	1	1%	1	1%	1	1%		
C063					2	2%	2	2%
C064	2	2%	1	1%	3	3%		
C065					1	1%	1	1%
C066					1	1%	2	2%
C067							1	1%
C068							3	3%
C069							1	1%
C070					3	3%		
C071							1	1%
C072			1	1%			1	1%
C073							1	1%
C074	1	1%			2	2%		
C075			2	2%			1	1%
C076			1	1%				
C077			1	1%				
C078			1	1%				

C079			1	1%			
C080			1	1%			
C081	1	1%					
C082	1	1%				1	1%
C083			1	1%		1	1%

(conclusão)

Clone	Local A		Local B		Local C		Local D	
	Nº de árvores	Nº de árvores (%)	Nº de árvores	Nº de árvores (%)	Nº de árvores	Nº de árvores (%)	Nº de árvores	Nº de árvores (%)
C084			1	1%	2	2%		
C085			1	1%				
C086			1	1%				
C087			1	1%				
C088					1	1%		
C089	2	2%	1	1%	1	1%		
C090			1	1%	2	2%	3	3%
C091							2	2%
C092			4	4%	1	1%	2	2%
C093			1	1%				
C094			2	2%	1	1%	1	1%
C095			2	2%				
C096					1	1%		
C097			2	2%				
C098					1	1%		
C099							6	7%
C100					2	2%		
C101					1	1%		
C102			2	2%	2	2%		
C103			2	2%			1	1%
C104	3	3%						
C105					1	1%		
C106					1	1%		
C107			2	2%	1	1%		
C108	1	1%					5	6%
C109					1	1%	1	1%
C110			1	1%			1	1%
C111							1	1%
C112					1	1%		
C113					1	1%		
C114			1	1%	5	6%	1	1%
C115					1	1%		
C116					1	1%	1	1%
C117					2	2%	1	1%
C118					1	1%		
C119					1	1%		
C120					1	1%		

C121		1	1%	1	1%	
C122		1	1%			
C123						2
						2%

Fonte: da autora (2022).

Considerando os quatro locais, a participação dos clones variou de 1% (apenas uma árvore) até 10% (9 árvores) (clone C049, local B). A maioria dos clones estava presente nos locais com somente uma única árvore: 53%, 62%, 63% e 58% dos clones nos locais A, B, C e D, respectivamente.

A presença de apenas uma árvore selecionada para um dado clone pode dificultar a conclusão a respeito do seu mérito genético. Existe a possibilidade desta árvore ter sido beneficiada por fatores ambientais (como falhas ou plantas vizinhas inferiores), enquanto outras árvores do mesmo clone não tiveram a mesma vantagem e conseqüentemente não apresentaram desempenho superior. Nessas condições, a performance do clone em plantios futuros pode não se repetir. Outrossim, há mais segurança na seleção de clones que são representados por várias árvores superiores no plantio, pois a estimativa de produtividade é mais precisa utilizando-se a média de várias árvores.

Além disso, é possível que alguns clones tenham sido sub-representados nos talhões, em decorrência de diferenças no número de mudas obtidas por clone para o plantio. Apesar de terem sido plantados com a mesma representatividade de cepas no minijardim clonal e coletados em aproximadamente igual quantidade de estacas para a produção de mudas, os clones podem ter apresentado diferenças de enraizamento, e conseqüentemente diferenças no número final de mudas produzidas. Outra possibilidade para a baixa frequência de alguns clones está relacionada com a amostragem realizada nos talhões operacionais (três parcelas de 100 plantas), que pode não ter sido suficiente para abarcar todos os clones presentes na família clonal (N = 249) de forma representativa.

Para verificar a possibilidade de influência ambiental na produtividade dos clones representados por uma única árvore, foi feita uma comparação da média do número de falhas laterais e diagonais para os clones com apenas uma árvore selecionada e para os clones presentes em maior frequência. Essa análise mostrou que não houve diferença significativa no número médio de falhas desses dois conjuntos de clones (dados não mostrados). Além disso, Santos et al (2021) apontam que o incremento de produtividade em uma árvore beneficiada pela presença de falhas ou plantas dominadas na vizinhança não é significativo, e não impacta na acurácia ou no ordenamento das árvores selecionadas.

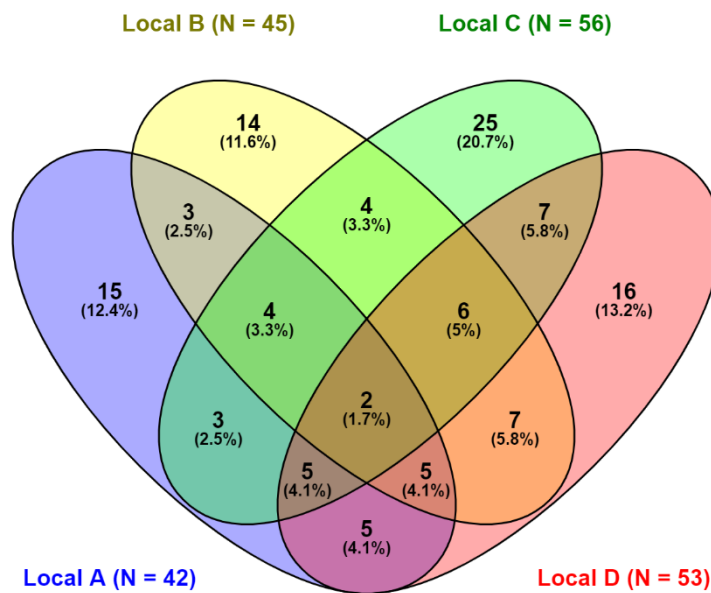
Sendo assim, a hipótese mais provável para explicar a grande quantidade de clones com uma única árvore é aquela associada a variações aleatórias na multiplicação dos clones

para produção das mudas, e ao tamanho das parcelas amostradas para avaliação das árvores. Dessa forma, para fins de seleção e formação da família clonal melhorada, é prudente não desprezar os clones pouco representativos, e sim avaliar sua performance em plantios futuros. Além disso, em seleções futuras utilizando a estratégia de famílias clonais, podem ser adotadas parcelas maiores para a avaliação da família clonal inicial em talhões operacionais, especialmente em situações onde esta tenha sido formada com um número elevado de clones, como na família aqui estudada ($N = 249$). Uma sugestão seria ajustar o número de plantas totais a serem amostradas visando abranger pelo menos 5 repetições de cada clone presente na família clonal inicial. Assim, para uma família clonal com x clones, o número total de plantas amostradas nas parcelas deve ser $N = x \times 5$.

4.4 Coincidência e correlação entre os clones selecionados em cada local

A fim de comparar os clones selecionados nas 30% melhores árvores de cada local e determinar a coincidência entre eles, foi construído o diagrama de Venn (FIGURA 7). Para estas análises, foram desconsiderados os dois clones testemunha identificados nos locais A e C, e mantidos apenas os 121 clones que pertencem à família clonal.

Figura 7 - Diagrama de Venn com o número de clones coincidentes entre as 30% melhores árvores identificadas na família clonal plantada em cada local.



Fonte: da autora (2022).

No geral, a coincidência de clones entre os locais foi baixa. Apenas dois clones (C025 e C046) foram identificados em comum nos quatro locais. Vinte e dois clones foram identificados em pelo menos três locais, 51 em pelo menos dois locais, enquanto a maioria (70 ou 58%) foram identificados em um único local. Entre os locais AxBxC, seis clones são comuns, entre AxBxD e AxCxD, sete clones são comuns, e entre BxCxD, a coincidência é de oito clones. O ambiente com maior número de clones específicos (únicos) foi o local C, com 25 clones. Analisando os locais par-a-par, a maior coincidência de clones ocorre entre os sítios BxD e CxD, que compartilham 20 clones, e a menor corresponde aos locais Ax B e Ax C, que compartilham 14 clones.

Visto que a família clonal instalada nos quatro locais foi a mesma, isto é, foi formada pelo mesmo conjunto de 249 clones, uma das hipóteses para explicar a baixa coincidência dos melhores clones entre os locais é o desbalanceamento no número de repetições dos clones e a

presença de apenas uma repetição para a maioria dos clones (conforme evidenciado no item 4.3). Isso pode ocasionar uma super ou sobre estimativa dos dados de produtividade dos clones e consequente alteração no *ranking* em cada local.

Ainda, outra hipótese é a existência de interação genótipos por ambientes (interação GxA) entre as áreas de plantio. A fim de entender a magnitude da interação GxA, foi realizada a análise da correlação entre o desempenho silvicultural em IMA dos clones nos diferentes locais, utilizando o método de Spearman. A correlação de Spearman é um método não paramétrico, isto é, não exige normalidade dos dados, e leva em consideração o ordenamento dos genótipos nos locais, e não os valores absolutos observados. Dessa forma, considerando o desbalanceamento dos dados e a diferença na magnitude dos valores de IMA entre os locais, esse método mostra-se adequado para a análise de correlação (SANTOS, 2014). Os valores de correlação de Spearman são afetados pela intensidade da interação entre os locais: valores maiores indicam maior coincidência no ordenamento dos clones nos diferentes ambientes, o que por sua vez denota uma menor magnitude da interação GxA entre os locais. De modo contrário, estimativas baixas desse parâmetro evidenciam baixa coincidência no *ranking* dos clones entre os locais, indicando que a interação GxA é significativa (RAMALHO; FERREIRA; OLIVEIRA, 2012).

Conforme apresentado na tabela 8, as estimativas da correlação de Spearman entre a performance em IMA dos clones nos locais par-a-par apresentaram valores baixos, variando de 0,01 (locais BxC) até 0,48 (locais AxD). Em nenhum dos casos a correlação foi estatisticamente significativa ao nível de significância de 95%. Esses resultados corroboram a existência de interação GxA entre os locais de estudo.

Tabela 8 - Coeficiente de correlação linear de Spearman para o desempenho silvicultural em IMA dos clones entre os locais.

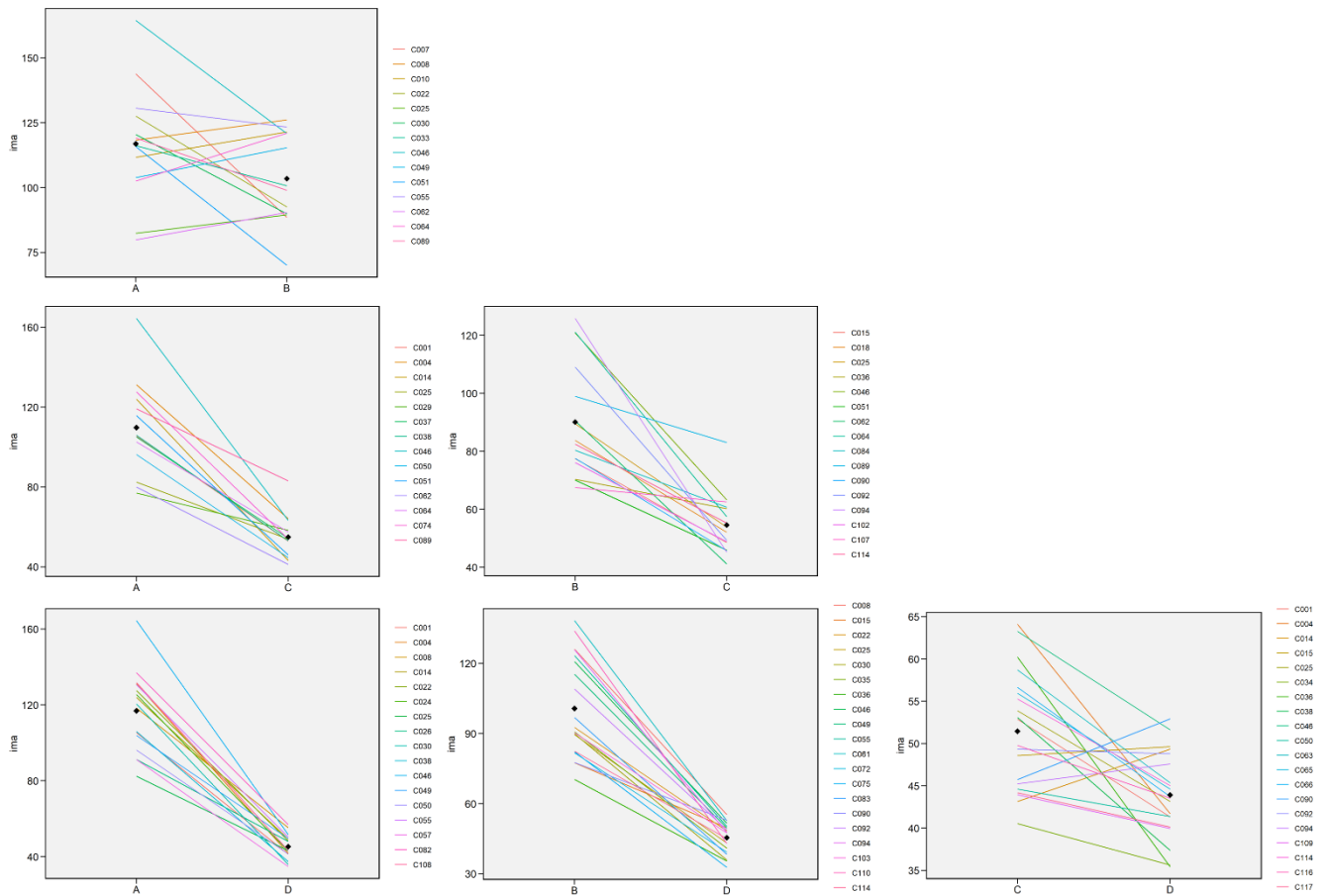
	A	B	C	D
A	1	0,08 ^{ns}	0,30 ^{ns}	0,48 ^{ns}
B		1	0,01 ^{ns}	0,43 ^{ns}
C			1	0,08 ^{ns}
D				1

ns = não significativo à 95%.

Fonte: da autora (2022).

Visando ilustrar a diferença na performance dos clones entre os locais par-a-par e reforçar os resultados obtidos pela análise de correlação de Spearman, na figura 8 são apresentados gráficos de linhas da performance dos clones coincidentes para os locais par a par.

Figura 8 - Gráficos da performance média em IMA ($\text{m}^3 \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{ano}^{-1}$) dos clones para os locais par-a-par (AxB, Ax C, Ax D, BxC, BxD e CxD), evidenciando as trocas de ordenamento dos clones nos diferentes locais.



Fonte: da autora (2022).

Para os locais Ax B, dentre os 14 clones coincidentes, destaca-se a alteração da performance do clone C007 (2º colocado no local A; 13º colocado no local B) e C008 (7º colocado no local A; 1º colocado no local B). Nenhum dos clones apresenta o mesmo ranqueamento entre os locais. No entanto, os clones C046 e C055 apresentaram performance superior nos dois locais (estão entre os 5 melhores em cada sítio), enquanto os clones C025 e C062 apresentam performance inferior em ambos.

Na comparação entre os locais A e C, os clones C014 e C029 apresentaram alteração mais significativa no *ranking*, saindo da 4ª posição no local A para a 13ª posição no local C, e da 14ª no local A para 4ª no local C, respectivamente. Os clones C004, C046 e C089 destacam-se por performar bem nos dois locais, sendo que o C004 apresenta a mesma posição (2º do *ranking*) em ambos os sites.

Para Ax D, também foi possível observar alterações significativas no desempenho dos clones, destacando-se os materiais C004, C008, C025 e C049. Novamente o clone C046

performou bem em ambos os locais, assim como os clones C082 e C055. Já o clone C057 teve o pior desempenho considerando os dois locais.

Entre os locais B e C, os clones C046 e C089 destacam-se pela boa performance, enquanto o clone C051 apresenta o pior desempenho. As inversões mais significativas de *ranking* são observadas para os clones C094, que cai da primeira para a penúltima posição de B para C, e para o clone C107, que possui o 3º maior IMA no local C, e o menor IMA no local B.

Já entre os locais B e D, os materiais C036 e C075 possuem o pior desempenho considerando os dois sites, enquanto os clones C061 e C008 apresentaram comportamento superior e estável entre os locais. Novamente ocorrem inversões significativas na performance, com ênfase para os clones C090 e C110, que possuem resultados opostos entre os sites.

Por fim, na comparação entre os sites C e D, as maiores discrepâncias na média de IMA ocorreram para os clones C014 e C036, que performam bem nos locais C e D, respectivamente, e cuja variação em relação ao outro local é de 17 e 15 posições no *ranking*. O único clone que apresentou desempenho superior nos dois locais foi o C046.

Com base nestes resultados, foi possível observar que o clone C046 se sobressaiu em relação aos demais, pois foi o único material que apresentou boa performance em todos os locais, demonstrando assim potencial em relação à adaptação, estabilidade e produtividade. O clone C025, que também está presente em todos os locais, apresentou resultados intermediários a inferiores entre os sites. Determinados clones apresentaram boa performance em mais de um local, como C004, C008, C025, C049, C055, C061, C069, C082 e C089. No entanto, a ocorrência de grandes trocas de ordenamento na performance de alguns clones entre todas as comparações de locais par-a-par indica que a interação GxA é do tipo complexa (COSTA NETO, 2017).

Dessa forma, considerando-se i) a baixa coincidência dos clones selecionados entre os locais, ii) a baixa correlação entre a performance média dos clones e iii) a existência de interação GxA do tipo complexa entre as áreas, os resultados indicam a necessidade de formar famílias clonais melhoradas específicas para cada ambiente, selecionando os clones de forma a garantir maior adaptabilidade e produtividade para cada site.

4.5 Determinação do número de clones para formação da família clonal melhorada

Antes de recomendar as famílias clonais melhoradas para plantio operacional, uma ponderação importante é determinar o número de clones que devem as compor. O intuito é identificar o conjunto de clones que forneça os maiores ganhos em produtividade, conquanto assegurando a manutenção da diversidade genética.

Oliveira (2020) discutiu a respeito do número adequado de clones para a formação de plantios de compostos clonais, considerando variação de cinco a 20 clones, e ponderou que a quantia de 10 clones é ideal, pois nessas condições a produtividade é alta e, caso algum clone futuramente apresente performance inferior nos novos locais de plantio, seu impacto na média do composto clonal não será tão significativo. Com menos clones (por exemplo, cinco), a média do composto é maior, porém a diversidade genética é menor e o risco de impactos na performance futura é maior. Wu (2019) aponta que o número ideal para plantios multiclonais está entre 5 a 30 clones, que seriam suficientes para garantir a mesma “segurança” que seria obtida com uma população infinitamente grande. A inclusão de mais clones não contribui significativamente para a redução de risco, e pode ocasionar maior heterogeneidade do plantio. Souza (2016) indicou a formação de uma família clonal melhorada composta por 17 clones.

Neste estudo, a intensidade de seleção de 30% aplicada às árvores da família clonal inicial resultou na identificação de 42 a 56 clones por local, e os ganhos em relação à família inicial e à testemunha operacional foram muito expressivos (itens 4.2 e 4.3). Assim, este nível de seleção pode ser considerado adequado como ponto de partida, permitindo posteriormente a escolha dos melhores clones para cada local. Simulando o emprego de intensidades de seleção (IS) maiores, de 20, 10 e 5%, o número de clones cai para 8 a 15 clones na IS de 5%, e os ganhos em relação à seleção inicial seriam incrementados significativamente (TABELA 9). Embora a IS de 5% também tenha se mostrado adequado nesse estudo, a intensidade inicial de 30% é mais pertinente pensando na utilização futura dessa estratégia de seleção em novas populações de famílias clonais, cujo número de clones presentes pode variar. Se necessário, após a identificação dos clones presentes nas 30% melhores árvores selecionadas e determinação das suas médias de produtividade, um conjunto menor de clones pode ser selecionado, sempre avaliando o equilíbrio entre a maximização dos ganhos e a minimização dos riscos. Ou seja, há bastante flexibilidade e versatilidade para a seleção do melhor conjunto de clones utilizando essa estratégia.

Tabela 9 - Número de clones, estimativa média de IMA ($\text{m}^3.\text{ha}^{-1}.\text{ano}^{-1}$) e ganho com diferentes níveis de seleção na família clonal inicial, nos quatro locais.

Local	Intensidade de seleção (IS)	Nº de clones	Média de IMA ($\text{m}^3.\text{ha}^{-1}.\text{ano}^{-1}$)	Ganho em relação à IS de 30%
A	30%	42	116,5	-
	20%	33	130,2	12%
	10%	18	145,8	25%
	5%	8	162,6	40%
B	30%	45	102,6	-
	20%	31	115,3	12%
	10%	15	133,1	30%
	5%	11	144,3	41%
C	30%	56	54,1	-
	20%	42	57,1	6%
	10%	26	62,6	16%
	5%	15	64,6	19%
D	30%	53	44,0	-
	20%	40	47,3	8%
	10%	23	51,3	17%
	5%	12	55,0	25%

Fonte: da autora (2022).

Frente ao exposto, pensando na obtenção de ganhos em produtividade concomitantemente à manutenção da variabilidade genética, optou-se pela seleção dos 15 melhores clones identificados em cada local para a formação de novas famílias clonais melhoradas. Essas famílias deverão ser recomendadas para plantio em locais com condições ambientais semelhantes aos locais de estudo a partir das quais foram selecionadas.

O número de 15 clones permite a realização de purificações no futuro, caso seja necessário eliminar algum(ns) clone(s) que não mantenha(m) sua boa performance nos plantios subsequentes. Vale ressaltar também que os clones ainda precisarão ser avaliados para outras características importantes para o programa de melhoramento, como qualidade da madeira (densidade básica (kg/m^3) e rendimento de celulose (%)), para posterior estimativa do seu incremento médio anual de celulose (IMACel , $\text{t}.\text{ha}^{-1}.\text{ano}^{-1}$) e ganhos em IMACel em comparação com as testemunhas operacionais monoclonais. Os clones também serão fenotipados para pragas e doenças importantes para a região, como o fungo *Ceratocystis fimbriata* e a vespa-da-galha *Leptocybe invasa*. Caso algum dos materiais genéticos não apresente resultados satisfatórios para essas características, poderá ser retirado da família clonal melhorada. Se porventura o número final de clones reduzir expressivamente após a

seleção para esses critérios adicionais, outros clones superiores podem ser inseridos para substituí-los (e.g., 16º a 20º melhores clones em cada local).

A média estimada de IMA para os 15 melhores clones de cada local variou de 50,8 m³.ha⁻¹.ano⁻¹ (local D) a 134,9 m³.ha⁻¹.ano⁻¹ (local A), e foram estimados ganhos de 15 a 24% em IMA frente à seleção prévia das 30% melhores árvores da família clonal inicial (TABELA 10).

Cabe reforçar que a média de produtividade e a média de ganho calculados para as famílias clonais melhoradas são apenas estimativas, e que os valores reais para esses parâmetros só poderão ser determinados quando as árvores selecionadas forem plantadas em alo-competição umas com as outras, sem a presença das árvores inferiores que compunham os plantios iniciais.

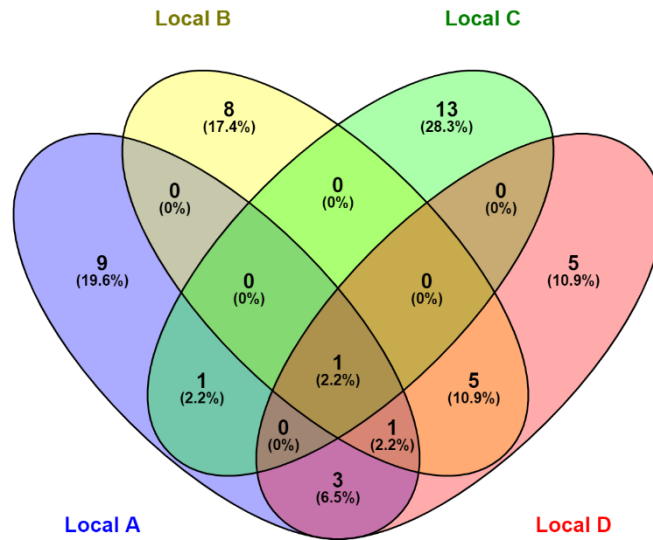
Tabela 10 - Estimativa média de IMA (m³.ha⁻¹.ano⁻¹) e de ganho para as famílias clonais melhoradas a partir da seleção dos 15 melhores clones em cada local.

Local	Nº de clones na família clonal melhorada	Média de IMA	Ganho em IMA em relação à IS de 30%	Ganho em DAP em relação à família clonal inicial	Ganho em DAP em relação à testemunha operacional
A	15	134,9	16%	33%	48%
B	15	127,2	24%	38%	40%
C	15	64,0	18%	23%	19%
D	15	50,8	15%	21%	19%

Fonte: da autora (2022).

Em concordância com os resultados apresentados até então, a coincidência dos 15 melhores clones selecionados entre os locais é baixa (FIGURA 9). O único clone comum entre as quatro famílias clonais finais é o C046, cujo potencial em termos de produtividade e adaptabilidade já havia sido previamente identificado.

Figura 9 - Diagrama de Venn com as coincidências dos 15 clones selecionados para formar as famílias clonais melhoradas em cada local.



Fonte: da autora (2022).

Por fim, se desejado, além da seleção para compor as famílias clonais melhoradas, os melhores clones podem também avançar de forma individual no programa de melhoramento, com o objetivo de futuramente serem recomendados para plantios operacionais monoclonais. Para tal, os clones devem seguir para a fase de experimentação em testes clonais ampliados (última fase da *pipeline* de melhoramento). É importante salientar que mesmo o melhor de cada local e os clones mais produtivos e estáveis entre os locais, como o C046, devem passar por essa etapa de experimentação, pois precisam ser avaliados no modelo de autocompetição. Dessa forma, podemos considerar que os plantios da família clonal inicial funcionam como a etapa de experimentação em teste clonal, e que em seguida os monoclonos devem seguir o método de seleção clonal tradicional.

4.6 Diversidade genética dentre os clones presentes na família clonal

Uma das importantes vantagens da estratégia de famílias clonais é a maior diversidade genética dos plantios, o que oferta maior segurança frente a problemas bióticos e abióticos. Visando validar esse preceito, foi realizado o estudo da diversidade genética dos clones da família clonal, por meio das estimativas de MAF (*minor allele frequency*), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade observada (H_o) e índice de fixação de Wright (F) para os 92 marcadores SNPs empregados na genotipagem dos clones da família clonal. Na tabela 11 são apresentados os valores médio, mínimo e máximo de cada uma das estimativas para os marcadores.

Tabela 11 - MAF (*minor allele frequency*), heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho), e índice de fixação de Wright (F) para os marcadores SNPs empregados na genotipagem dos clones da família clonal.

Métrica	Valor médio	Valor mínimo	Valor máximo
MAF	0,32	0,07	0,50
He	0,41	0,12	0,50
Ho	0,48	0,37	0,61
F	-0,18	-0,5	0,11

Fonte: da autora (2022).

A heterozigosidade observada (Ho) corresponde à fração de indivíduos na população que são heterozigotos para um dado locus, e é um parâmetro bastante empregado em melhoramento por estar associada à presença de variabilidade genética. Já a heterozigosidade esperada (He) é a fração de heterozigotos esperada em uma população que se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para os 121 clones presentes na família clonal, a métrica de heterozigosidade observada foi superior à heterozigosidade esperada em média ($0,48 > 0,41$). O índice de fixação de Wright (F), que representa uma medida do grau de diferença entre as heterozigosidades esperada e observada foi negativo (média de $-0,18$), corroborando que a heterozigosidade observada foi superior à esperada.

A MAF representa a frequência do alelo menos comum de cada SNP em uma determinada população. Para o conjunto de clones da família clonal, quatro dos 92 marcadores apresentaram MAF inferior a 0,05. Para os demais 88 marcadores, a MAF variou de 0,07 a 0,5, sendo em média 0,32, confirmando que os marcadores são polimórficos.

Dessa forma, com base no conjunto de marcadores utilizados, há indicativo da existência de heterozigosidade e diversidade genética dentro da família clonal em estudo, apesar da existência de relacionamento entre os clones (meios irmãos, provenientes do mesmo genitor feminino).

Há na literatura outros trabalhos reportando a utilização de painéis de marcadores SNPs de baixa densidade, com 59 e 75 SNPs, para o estudo da diversidade em populações de eucalipto (BUSH; THUMMA, 2013; DILLON et al., 2014). Mas é importante ressaltar que para a obtenção de métricas mais precisas para esses parâmetros, bem como para a determinação do grau de relacionamento e construção da matriz de parentesco entre os clones, é necessária a utilização de um maior número de marcadores SNPs, com vasta cobertura do genoma.

5 CONCLUSÕES

Para os quatro locais empregados no estudo, as famílias clonais iniciais apresentaram valores de DAP (cm) competitivos em comparação com os clones operacionais, além de elevada variação de DAP entre as árvores. Esses resultados corroboram o potencial da estratégia de famílias clonais para acelerar a recomendação de materiais genéticos para plantio em escala semioperacional, com ganhos em produtividade e variabilidade genética.

A demarcação de parcelas para avaliação dos plantios iniciais, seguida da identificação e seleção das 30% melhores árvores resultou em ganhos em DAP de até 27% em relação à família clonal inicial e 41% em relação à testemunha monoclonal, validando a possibilidade de formação de novas famílias clonais melhoradas a partir das famílias iniciais (purificação da família clonal inicial). O número de plantas amostradas para avaliação nos plantios da família clonal inicial deve ser suficiente para abranger todos os clones que compõem a família em questão.

O número de clones identificados nas 30% melhores árvores em cada local variou de 42 a 56. A coincidência dos clones entre os locais foi baixa, e não houve correlação significativa entre as suas performances em IMA ($\text{m}^3 \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{ano}^{-1}$). Com isso, recomendou-se a formação de famílias clonais melhoradas específicas para cada ambiente.

A intensidade de seleção de 30% foi suficiente para abranger um grande número de clones e, concomitantemente, assegurar ganhos significativos de produtividade, mostrando-se assim adequada como ponto de partida para seleções futuras em novas famílias clonais. Posteriormente, novas seleções podem ser realizadas, diminuindo um pouco mais o número de clones visando um equilíbrio entre manutenção da variabilidade e maximização dos ganhos. A seleção dos 15 melhores clones em cada local proporcionou ganhos de até 24% adicionais aos ganhos obtidos com a seleção no nível de 30%.

Cabe ressaltar que as famílias clonais iniciais devem ser formadas a partir da seleção em progênies superiores, cuja média de produtividade seja maior que a de plantios monoclonais operacionais. Além disso, a intensidade de seleção nas progênies deve assegurar ganhos e manter um número suficiente de clones para subsidiar seleções futuras.

Em suma, a estratégia mostrou-se promissora para proporcionar celeridade na recomendação de materiais genéticos, com ganhos em produtividade, maior diversidade genética e segurança.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A.C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2004.
- ASSIS, T. F.; ABAD, J. I. M.; AGUIAR, A. M. Melhoramento Genético do Eucalipto. In: Schumacher, M. V. & Viera, M. (Ed). **Silvicultura do Eucalipto no Brasil**. Santa Maria - RS: Editora UFSM, 2015.
- ASSIS, T.F. Melhoramento genético de *Eucalyptus*: desafios e perspectivas. 2014. Disponível em: <
https://www.researchgate.net/publication/311453642_Melhoramento_genetico_de_Eucalyptus_desafios_e_perspectivas>. Acesso em: 14 fev. 2021.
- ASSIS, T.F. Melhoramento genético do eucalipto. **Informe agropecuário**. Belo Horizonte, v. 18, n. 185, p. 63-71, 1996.
- ASSIS, T.F. Production and use of *Eucalyptus* hybrids for industrial purposes. QFRI/CRC-SPF Symposium, Noosa, In: DUNGEY, H.S.; DIETERS, M.J.; NIKLES, D.G. comp. **Proceedings of Hybrid Breeding and Genetics of Forest trees**, 2000. p. 63-74.
- BALLESTA, P. et al. Genomic predictions using low-density SNP markers, pedigree and GWAS information: a case study with the non-model species *Eucalyptus cladocalyx*. **Plants**, v. 9, n. 1, p. 99, 2020.
- BALLESTA, P. et al. SNP and Haplotype-Based Genomic Selection of Quantitative Traits in *Eucalyptus globulus*. **Plants**, v. 8, n. 9, p. 331, 2019.
- BERNARDO, R. **Breeding for quantitative traits in plants**. Minnesota: Stemma, 2002, 369 p.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. **Melhoramento de Plantas**. Viçosa: UFV, 2009. 529p.
- BOTELHO, F. B. S. et al. Multiline as a Strategy to Reduce Damage Caused by *Colletotrichum lindemuthianum* in Common Bean. **Journal of Phytoathology**, v. 159, p. 175-180, 2010.
- BOYDEN, S.; BINKLEY, D.; STAPE, J.L. Competition among *Eucalyptus* trees depends on genetic variation and resource supply. **Ecology**, v. 89, p. 2850-2859, 2008.
- BRANCALION, H. S. P. et al. Exotic eucalypts: From demonized trees to allies of tropical forest restoration? **Journal of Applied Ecology**, p. 55-66, 2019.
- BUSH, D.; THUMMA, B. Characterising a *Eucalyptus cladocalyx* breeding population using SNP markers. **Tree Genetics & Genomes**, p. 741-152, 2013.
- CAMPINHOS JR., E.; IKEMORI, Y. K. Produção massal de *Eucalyptus* spp através da estaquia. **Silvicultura**, n. 32, p. 770-775, 1983.
- CAPO, P. A indústria de papel e celulose no Brasil: A silvicultura no Brasil. **Guia ABTCP de Fornecedores & Fabricantes de Celulose e Papel**, v. 17, p. 22-23, 2015.

CHAVES, G. B. **Interação genótipos por ambientes em clones de *Eucalyptus spp.* na transição entre os biomas Cerrado e Amazônia.** 2021. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2021.

COSTA NETO, G. M. F. **Integrando covariáveis ambientais e mapas temáticos na análise da interação “genótipo x ambiente” em arroz de terras altas.** 2017. 125 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.

DIAS, L.A. S.; BARROS, W.S. **Biometria Experimental.** Viçosa: UFV, 2009. 408p.

DILLON, S. et al. Characterisation of Adaptive Genetic Diversity in Environmentally Contrasted Populations of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. (River Red Gum). **PlosOne**, v.9, p. 1-15, 2014.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical bulletin**, v.19, p. 11-15, 1987.

FERREIRA, M. A contribuição do Setor de Sementes do IPEF/LCF para a silvicultura intensiva brasileira. **IPEF**, Piracicaba, n.46, p.08-31, 1993.

FERREIRA, M.; SANTOS, P.E.T. Melhoramento genético florestal dos Eucaliptos no Brasil: breve histórico e perspectivas. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, Salvador, 1997. **Proceedings**. Colombo: Embrapa/CNPF, 1997. v.1, p.14-34.

FINCKH, M. R.; MUNDT, C. C. Strip rust, yield, and plant competition in wheat cultivar mixtures. **Ecology and Epidemiology**, v. 82, p. 905-913, 1992.

FOELKEL, C.E.B. Eucalipto no Brasil, história de pioneirismo. **Revista Visão Agrícola**, v. 4, p. 65-69, 2005.

FONSECA, S. M. et al. **Manual prático de melhoramento genético do eucalipto.** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2010.

FORRESTER, D. I.; SMITH, R. G. B. Faster growth of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus pilularis* in mixed-species stands than monocultures. **Forest ecology and management**, v. 286, p. 81-86, 2012.

GARCIA, L. G. et al. Modelagem da aptidão climática do *Eucalyptus grandis* frente aos cenários de mudanças climáticas no Brasil. **Scientia Florestalis**, v. 42, p. 503-511, 2014.

GRANATO, I. FRITSCHÉ-NETO, R. **snpReady: Preparing Genotypic Datasets in Order to Run Genomic Analysis.** R package version 0.9.6. <https://CRAN.R-project.org/package=snpReady>.

GRATTTAPAGLIA D, RESENDE M.D.V. Genomic selection in forest tree breeding. **Tree Genetics and Genomes**, v. 7, p. 241-255, 2010.

GRIFFIN, A.R. Clones or improved seedlings of *Eucalyptus*? Not a simple choice. **International Forestry Review**, v. 16, n. 2, p. 216-224, 2014.

HALLAUER, A. R. Evolution of plant breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 11, p. 197-206, 2011.

HELLAND, S. J.; HOLLAND, J. B. Blend response and stability and cultivar blending ability in oat. **Crop Science**, v. 41, p. 1689–1696, 2001.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES (IBA). Relatório 2021: ano base 2020. 2021. Disponível em: < <https://www.iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorioiba2021-compactado.pdf>>. Acesso em: 17 abr. 2022.

INGHELANDT, V.D. et al. Population structure and genetic diversity in a commercial maize breeding program assessed with SSR and SNP markers. **Theoretical and applied genetics**, v. 120, p. 1289-1299, 2010.

JEHAN, T., LAKHANPAUL, S. Single nucleotide polymorphism (SNP) – Methods and applications in plant genetics: a review. **Indian Journal of Biotechnology**, v.5, p. 435-469, 2006.

KENENI, G., BEKELE, E., IMTIAZ, M.K., 2012. Genetic vulnerability of modern crop cultivars: cause mechanism and remedies. **International Journal of plant Research**, v. 2, p. 67–79, 2012.

LIMA, B. M. et al. Quantitative genetic parameters for growth and wood properties in Eucalyptus “urograndis” hybrid using near-infrared phenotyping and genome-wide SNP-based relationships. **PLOS One**, v. 14, n. 6, p. e0218747, 2019.

LOUWAARS, N. P. Plant breeding and diversity: A troubled relationship? **Euphytica**, 2018.

MHOSWA, L. et al. Genome-wide association study identifies SNP markers and putative candidate genes for terpene traits important for *Leptocybe invasa* resistance in *Eucalyptus grandis*. **G3**, v.12, p. 1-14, 2022.

MORA, A.; GARCIA, C. A cultura do eucalipto no Brasil. **SBS – Sociedade Brasileira de Silvicultura**, p. 62-75, 2000.

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

OLIVEIRA, A. F. C. F. **Compostos clonais como estratégia para mitigar a interação dos clones x ambientes na cultura do eucalipto**. 2020. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2020.

OLIVEROS, J.C. (2015). Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. Disponível em: < [diagrams. https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html](https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html) >. Acesso em: 17 abr. 2022.

PIRES, I. E. et al. **Genética Florestal**. Viçosa, MG: Arka, 2011. 318 p.

RAMALHO, M. A. P.; FERREIRA, D. F.; OLIVEIRA, A. C. **Experimentação em genética e melhoramento de plantas**. 3. ed. Lavras: Ed. UFLA, 2012. 323 p.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>, 2020.

REIS, M. S. **Interação genótipo x ambiente para a produtividade de clones híbridos de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis***. 2019. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, 2019.

RESENDE, M.D.V; BARBOSA, M.H.P. Melhoramento genético de plantas de propagação assexuada. Colombo: **Embrapa Informação Tecnológica**, 2005. 130 p.

REZENDE, G. D. S. P; DE RESENDE, M. D. V.; DE ASSIS, T. F. Eucalyptus breeding for clonal forestry. In: **Challenges and Opportunities for the World's Forests in the 21st Century**. Springer, Dordrecht, 2014. p. 393-424.

REZENDE, G. D. S. P. et al. Clonal composites: An alternative to improve the sustainability of production in eucalypt forests. **Forest Ecology and Management**, v. 449, p. 117445, 2019.

SANTOS, C. F. dos. **Uso de diferentes metodologias estatísticas no melhoramento do amendoim forrageiro**. 2014. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2014.

SANTOS, H. G. et al. Strategies for the analysis of single-tree plot experiments in Eucalyptus plantations. **Journal of Forestry Research**, v. 32, n. 6, p. 2437-2445, 2021.

SARASWATHY, N.; TAMALINGAN, P. **Concepts and techniques in genomics and proteomics**. Elsevier, 2011.

SILVA-JUNIOR, O. B.; FARIA, D. A.; GRATTAPAGLIA, D. A flexible multi-species genome-wide 60K SNP chip developed from pooled resequencing of 240 Eucalyptus tree genomes across 12 species. **New phytologist**, v. 206, n. 4, p. 1527-1540, 2015.

SILVA, P. H. M. et al. Selection of Eucalyptus grandis families across contrasting environmental conditions. **Crop breeding and applied biotechnology**, v. 19, p. 47-54, 2019.

SOUZA, I. C. G. **Seleção e Melhoramento em Populações Clonais de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden**. 2016. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Genética) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

TELFER, E. J. et al. Parentage Reconstruction in Eucalyptus nitens Using SNPs and Microsatellite Markers: A Comparative Analysis of Marker Data Power and Robustness. **PlosOne**, p. 1-18, 2015.

UNESCO. Map of the world distribution of arid regions. MAB Tech. Note 7. Paris: UNESCO, 1979

VALENZUELA C. E. et al. Haplotype- and SNP-Based GWAS for Growth and Wood Quality Traits in Eucalyptus cladocalyx Trees under Arid Conditions. **Plants**, v. 10, p. 148, 2021.

WICKHAM, H. **GGPLOT2: elegance graphics for data analysis**. 2nd ed. New York: SpringerVerlag, 2016. 259 p.

WU, H. X. Benefits and risks of using clones in forestry—a review. **Scandinavian Journal of Forest Research**, v. 34, n. 5, p. 352-359, 2019.

YANG, H. et al. Genome-wide assessment of population structure and genetic diversity of *Eucalyptus urophylla* based on a multi-species single-nucleotide polymorphism chip analysis. **Tree Genetics & Genomes**, v.16, p. 1-11, 2020.

ZHU, Y. et al. Genetic diversity and disease control in rice. **Nature**, v. 406, p. 718-722, 2000.

ZOBEL, B.; TALBERT, J. **Applied forest tree improvement**. New York: J. Wiley & Sons, 1984.

PRODUTO TÉCNICO ATRELADO

ELABORAÇÃO DA RECOMENDAÇÃO CLONAL PARA PLANTIO OPERACIONAL NAS UNIDADES SUZANO BAHIA E ESPÍRITO SANTO

Isadora Bianchin

Evandro Novaes

Introdução

A área de Genética e Melhoramento Florestal da Suzano S.A. tem como principal objetivo desenvolver e recomendar cultivares superiores de eucalipto para plantio operacional, visando proporcionar ganhos contínuos em produtividade florestal e qualidade da madeira para produção de celulose. Os cultivares recomendados devem apresentar elevada produtividade em IMA (incremento médio anual, $m^3 \cdot ha^{-1} \cdot ano^{-1}$) e IMACel (incremento médio anual de celulose, $tsa \cdot ha^{-1} \cdot ano^{-1}$), adaptabilidade aos diferentes ambientes de plantio da empresa, tolerância às principais pragas e doenças da região de cultivo, e qualidade da madeira para atender às necessidades fabris.

A elaboração da recomendação de cultivares da Suzano é realizada durante um evento anual, promovido em parceria entre as áreas de Melhoramento Genético, Manejo Florestal e Operações Florestais (Silvicultura). O evento, realizado em todas as unidades de negócio florestal (UNF) da empresa, tem como principal objetivo revisar a performance dos clones e compostos clonais operacionais, semioperacionais e de pesquisa, nos diferentes ambientes, e elaborar a proposta de recomendação clonal para os plantios do ano seguinte. Essa proposta consiste na definição de quais clones devem ser plantados em cada ambiente da UNF, e qual o percentual máximo de área permitido para o plantio de cada clone. Busca-se, com isso, maximizar a produtividade, em IMA e IMACel, e garantir a segurança das florestas.

Neste relatório, estão descritos os resultados da visita de campo e das reuniões técnicas para definição da recomendação de cultivares nos diferentes ambientes da Suzano, nas UNF Bahia e Espírito Santo.

Desenvolvimento

Em 2021, o evento para definição da recomendação clonal das UNF BA e ES foi realizado entre os meses de maio a setembro. Devido à pandemia da COVID-19, a maior parte dos encontros ocorreu de forma virtual, por meio da plataforma Microsoft Teams. Ao final, uma visita técnica presencial também foi realizada. Diversos representantes das áreas de Melhoramento, Silvicultura, Negócios Florestais, Manejo e Planejamento Florestal participaram dos encontros.

Para as reuniões virtuais, foi realizado um pré-trabalho de análise e consolidação de todas as informações dos cultivares operacionais (monoclonos e compostos clonais) e dos novos cultivares candidatos à recomendação. Esse trabalho compreendeu a revisão dos dados de produtividade (provenientes das bases de inventário florestal contínuo da empresa e dos experimentos de melhoramento), qualidade da madeira (provenientes das análises laboratoriais) e fenótipo para as pragas e doenças mais relevantes da unidade (advindos de fenotipagens em condições controladas e de campo), além do levantamento da área plantada atual de cada cultivar. Essas informações foram apresentadas e discutidas durante os encontros, e, a partir disso, a recomendação de plantio para o ano seguinte foi definida.

A partir da recomendação clonal estabelecida, a alocação dos clones nas áreas de plantio foi simulada por meio da ferramenta Tetrys. O Tetrys é um sistema desenvolvido pela Suzano, por meio da parceria entre as áreas de Melhoramento e *Digital*, e tem como objetivo alocar (distribuir) os clones que melhor se adequem às condições edafoclimáticas de cada unidade de plantio (UP). Valendo-se de ferramentas de *analytics*, *big data* e inteligência artificial, o Tetrys utiliza como *input* a recomendação clonal, as informações fenotípicas de cada material genético, o plano de plantio e as informações edafoclimáticas das áreas, e fornece como *output* a melhor solução de alocação clone-UP para o ano seguinte. Por meio dessa ferramenta, é possível automatizar o processo de alocação, e simular as produtividades que serão obtidas. Em 2021, a simulação da alocação de plantio das UNF BA e ES para 2022 resultou em um ganho esperado de 1,4% em IMACel e 1% em IMA, em comparação com a alocação clonal vigente.

Posteriormente, nos dias 21 e 22 de setembro, foi realizado o evento de campo na unidade BA. Foram visitados dois plantios operacionais e seis experimentos de Melhoramento, sendo três testes clonais e três testes clonais ampliados. Nos plantios

operacionais, o objetivo foi validar a performance dos principais clones, no ambiente mais representativos de plantio para o ano seguinte. Já nos experimentos de melhoramento, foram apresentados os novos clones que ingressarão na recomendação de plantio, além de outros clones potenciais para recomendação no futuro. Novamente, participaram da visita representantes de várias áreas da empresa, desde a pesquisa até operações florestais.

Para acompanhar e guiar a visita, foi elaborado um livro de campo. O material continha informações detalhadas sobre as condições edafoclimáticas dos locais visitados, e dados relevantes dos clones que estavam sendo apresentados e discutidos (produtividade, fenótipo para pragas e doenças, qualidade da madeira e área plantada). Para os experimentos, também foram apresentados os resultados das análises genético-estatísticas, o ranqueamento dos clones, e informações gerais, como delineamento e croqui experimental.



Figura 1. Fotos da visita de campo realizada nos dias 21 e 22 de setembro de 2021, na UNF-BA.

Considerações finais

O evento permitiu uma troca muito rica de informações e de conhecimento entre diversas áreas da empresa, e fomentou discussões essenciais para consolidar a recomendação de plantio do ano seguinte. Os encontros permitiram considerar diversos aspectos relevantes, desde a produtividade dos clones, até os riscos atrelados à cada um e as qualidades silvicultural e fabril. Foi possível definir o cenário mais assertivo de alocação clonal para 2022, com ganhos em produtividade em IMA e IMACel em comparação com a recomendação vigente. Ademais, a realização do evento de forma antecipada fornece aos viveiros

operacionais o tempo necessário para ajustar a produção de mudas para o ano seguinte, visando garantir a execução do planejamento de plantio estabelecido.