



Directrizes para regeneração Milho

Suketoshi Taba¹ e S. Twumasi-Afriyie²

¹ International Maize and Wheat Improvement Centre (CIMMYT), México

² CIMMYT, Etiópia



Introdução

Milho (*Zea mays* L. subsp. *mays*) é uma cultura monóica anual de polinização cruzada originária do sul do México, possivelmente um parente próximo do teosinte. As espigas que formam sementes crescem lateralmente entre os nós medianos da planta. As flores masculinas (bandeiras) nascem no topo da planta. Há mais de 250 raças e variedades locais de milho na América Latina. Algumas das raças Latino-americanas de média altitude têm um período de crescimento de mais de 10 meses, enquanto outras

de maturação precoce levam menos de 3 meses entre a sementeira e a colheita. Algumas raças têm 4 a 5 metros de altura, tornando difícil a polinização artificial. Os melhoradores de milhos tradicionais classificaram os vários ecótipos de milho de acordo com a sua adaptação ambiental: tropicais (<1200 m), média altitude (1200–1900 m), e de montanha (1900–2600 m) para os que crescem entre latitudes 26° norte e 26° sul; e temperados para os cultivares que crescem em latitudes superiores a 26° norte e abaixo de 26° sul.

Os diversos fenótipos de raças e variedades locais de milho e as suas adaptações substancialmente diversas criam muitas vezes dificuldades para a sua regeneração. Os acessos de germoplasma são geneticamente heterozigóticos (populações panmíticas) ou homozigóticos (linhas puras). As recomendações práticas e procedimentos para a regeneração de germoplasma de milho foram compilados baseados em experiências e análises de estudos teóricos sobre tamanhos de amostragem e cruzamentos.

Escolha do local e época de sementeira

Condições climáticas

- Sempre que possível, escolher um ambiente correspondente às condições do lugar original de colheita.
- Em condições de sequeiro, 500 – 700mm de precipitação são suficientes (dependendo do tipo de germoplasma e da textura do solo); com precipitações mais baixas é necessária irrigação suplementar.
- O germoplasma de milho de zonas temperadas está adaptado a condições de dias longos, de $\geq 13,4$ horas de luz. O milho de zonas tropicais geralmente precisa de dias mais curtos para a floração, em latitudes temperadas.
- A regeneração de raças locais de milho adaptadas a condições frias com mais de 10 meses de período de crescimento, como as de média altitude dos Andes, América Central e sul do México, requerem a colaboração de bancos de germoplasma locais.
- O milho pode crescer entre uma gama de temperaturas de 5 – 45°C, mas geralmente cresce melhor entre 25 – 35°C. Extremos de temperaturas elevadas, especialmente quando combinadas com baixa humidade, podem reduzir a viabilidade do pólen e ser a causa de baixo rendimento.

Preparação para a regeneração

Quando regenerar

- Quando o número de sementes viáveis por acesso for < 1500 em colecções activas ou de base de populações panmíticas e < 250 em populações de linhas puras.
- Quando a viabilidade das sementes atingir menos de 85% da percentagem de germinação inicial, na colecção activa, determinado pelo monitoramento da viabilidade (ver FAO/IPGRI 1994; ISTA 2008 para mais detalhes).

Pré-tratamentos

- É recomendável aplicar fungicidas e insecticidas nas sementes para proteger a sua emergência e crescimento no campo.

Precauções

- Nas populações panmíticas, manter um tamanho de população grande e efectivo (> 100 espigas ou mais de quatro vezes o tamanho inicial da amostra, o que for menor) através dos ciclos de regeneração, para evitar desvios genéticos, consanguinidade e a subsequente perda de alelos (Cossa 1987; Cossa et al. 1994; Wang et al. 2004).
- Inspeccionar cuidadosamente as plantas produtoras de sementes em relação a pragas e doenças, de acordo com os regulamentos de quarentena, antes e depois da regeneração para a obtenção de sementes de qualidade para uso e intercâmbio de germoplasma (Mezzalama et al. 2001).
- Tomar precauções extras se houver algum risco de contaminação com OGM (Organismos Geneticamente Modificados).
- Inspeccionar os lotes de sementes em relação à presença de OGM depois da regeneração e eliminar quaisquer lotes contaminados (Mezzalama et al. 2008).

Método de regeneração

Regenerar o milho por meio de polinização controlada.

Polinização artificial

Este método é o mais usado para a regeneração e multiplicação de acessos de germoplasma de milho. Pode ser feito planta por planta ou por polinização cruzada em cadeia. A polinização em cadeia é recomendada para a regeneração de elevado número de acessos.

- Cruzamentos planta por planta (modo dióico) — usa cada planta como progenitor feminino ou como progenitor masculino. Requer duas vezes mais terreno que os cruzamentos em cadeia para produzir o mesmo número de espigas e duplica o tamanho efectivo da população (se forem colhidas 100 espigas, o número efectivo da população será de 200).
- Cruzamentos em cadeia (modo monóico) – usa cada planta como progenitor feminino e como progenitor masculino.

Procedimento

1. Cobrir a espiga de cada planta com um saco fechado (envelopes de papel cristal) antes da emergência dos estigmas (barbas) (foto 2)
 2. Colocar um saco de polinização (saco para pólen) para recolher o pólen na flor masculina (bandeira), no dia anterior à polinização (foto 3)
 3. Na manhã seguinte, dobrar e abanar ligeiramente a planta para recolher o pólen no saco de polinização (foto 4)
 4. Remover a cobertura (envelope de papel cristal) dos estigmas (barbas) da planta feminina e polinizá-las com o pólen do saco da bandeira
 5. Cobrir imediatamente as barbas com o envelope de papel cristal e as bandeiras com o saco para pólen de novo, até à colheita
- É necessária uma boa coordenação da emergência dos estigmas (barbas) e a floração (lançamento da bandeira).
 - Fazer a polinização antes de a temperatura ambiente atingir os 36°C.

Polinização natural ou aberta

- A polinização natural (i.e. fertilização da semente através de polinização aberta) pode ser usada se a regeneração for feita em campos de agricultores, baseada em contractos com agricultores que cultivem variedades locais de milho, especialmente adaptadas às suas condições ambientais. Nestas circunstâncias, usar parcelas isoladas nos campos dos agricultores.
- Recolher uma grande amostra de sementes (3 – 5 kg) das parcelas de regeneração de polinização aberta, nos campos dos agricultores, para conservação nas colecções base ou activas do banco de germoplasma.

Medidas preventivas contra a contaminação com OGM

- Quando se fizer a polinização artificial, prevenir a contaminação de OGM provenientes da migração de pólen vindo de fora do talhão de regeneração. Cobrir as espigas com envelopes fechados (envelopes de papel cristal) e a bandeira com sacos para pólen, fazendo em seguida uma rápida e cuidadosa polinização.
- Plantar uma bordadura (materiais bem adaptados, híbridos ou variedades) para evitar a presença não intencional de OGM, provenientes de fora ou de dentro do campo de regeneração, se houver algum risco de contaminação possível. Estas

plantas devem ser desbandeiradas e polinizadas naturalmente pelas misturas das fontes de pólen que migrarem para as parcelas de regeneração. Testar a maioria das sementes das linhas de bordadura, para a presença não intencional de OGM. (Mezzalama et al., 2008).

Indução floral

- Em condições temperadas, proteger com sombra os acessos de germoplasma de milho de origem tropical que forem sensíveis a dias longos, cerca de 8 horas por dia, durante 6 – 8 semanas depois da plantação, promove a floração e permite que números limitados desses acessos sejam polinizados e colhidos. (Mark Millard pers. comm.). Usar este método para regenerar anualmente alguns acessos de germoplasma adaptados à estação longa.

Disposição da plantação, densidade e espaçamento

- Desenhar as parcelas de regeneração como um ensaio não replicado, separado das parcelas de melhoramento ou de produção.
- Na medida do possível, agrupar os acessos de acordo com a maturação, altura das plantas e tipo de polinização (autofecundada ou cruzada) em diferentes blocos para facilitar o manejo e as operações de campo.
- Alternar acessos com grãos de cores diferentes para facilitar a detecção de polinizações cruzadas não desejadas.
- Ajustar o tamanho das parcelas e a densidade de plantas de acordo com o número total de acessos a regenerar. Por exemplo, para estabelecer 256 plantas por parcela (60m²), para colher mais de 100 espigas (em populações panmíticas), usar para cada acesso 16 linhas de 5 m de comprimento, com 75 cm entre linhas. Plantar duas sementes por covacho, para estabelecer 16 plantas por linha, depois do desbaste.
- O tamanho das parcelas e a densidade das plantas pode também ser ajustada de acordo com a maturidade e a altura das plantas dos diferentes acessos.
- Plantar as linhas puras em 8 – 10 linhas por acesso (21 plantas em linhas de 5m de comprimento) para ter 168 plantas e produzir sementes suficientes. Manter a pureza dos acessos, plantando a mesma semente dos parentes originais (8 – 10 espigas auto-polinizadas) nas regenerações subsequentes, em vez de semear as sementes colhidas de anteriores regenerações. Colher espigas auto-polinizadas que sejam provenientes de plantas uniformes, com espigas e grãos uniformes.
- No caso de polinização natural, plantar os acessos a uma distância de 200 – 300 m, com mais de 200 plantas por acesso nas parcelas do campo, para obter 100 espigas meio-irmãos, bem cheias (a população efectiva será de 100 plantas), e colher 100 espigas do centro do talhão para melhor representatividade do acesso.
- Se não se obtiverem 100 espigas (ou outra quantidade requerida de sementes), fazer uma segunda regeneração do mesmo acesso, usando semente da mesma origem. Combinar as espigas do primeiro e segundo ciclos de regeneração para representar um único ciclo de regeneração.

Maneio da cultura

O milho é geralmente cultivado em condições de sequeiro, mas pode também ser cultivado sob irrigação.

Irrigação

- Aplicar irrigação suplementar durante épocas secas
- Se a regeneração for feita sob irrigação, reduzir a água 2 semanas antes e depois da floração, pois este stress é crítico para o bom estabelecimento dos grãos e crescimento da espiga.

Fertilização

- Aplicar no solo nutrientes minerais suficientes para o crescimento normal das plantas
- Aplicar as doses recomendadas pré-emergentes de N-P-K, e de N na altura da plantação
- Nos trópicos, geralmente usa-se uma aplicação mínima de fertilizante 80-40-0 de N-P-K, em ensaios com agricultores.

Pragas e doenças frequentes

- É recomendável contactar os especialistas locais de fitossanidade para identificar os sintomas das pragas e doenças mais prováveis e as medidas de controlo apropriadas. As seguintes pragas e doenças são as mais comuns no milho:
- Lagarta das raízes (vaquinha), lagarta rosca, tripes, *Dalbulus maidis*, *Cicadulina* spp., *Spodoptera frugiperda*, e outros insectos atacam raízes, folhas e colmos em regiões tropicais (Ortega 1987).
- Doenças foliares, do colmo e da espiga são míldios, ferrugens do milho, *Turcicum* e *Maydis* manchas da folha, manchas cinzentas da folha, *Pythium* podridão do colmo, *Fusarium* e *Gibberella* podridão do colmo, *Stenocarpella* (*syn. Diplodia maydis*) podridão branca da espiga e do colmo, antracnose (*Collectotrichum graminicola*) podridão do colmo, *Penicillium* podridão da espiga, *Aspergillus* podridão da espiga, *Fusarium* e *Gibberella* podridão rosada da espiga, *Cephalosporium* podridão do grão, *Stenocarpella* podridão da espiga, morrão ou carvão-comum (*Ustilago maydis*), vírus do mosaico ananicante do milho (maize dwarf mosaic virus - MDM), vírus do listrado do milho (maize streak virus - MStpV), vírus do listrado fino do milho (maize fine stripe virus - MRFV), enfezamento vermelho (maize bushy stunt mycoplasma - MBSD), e enfezamento pálido (corn stunt spiroplasm - CSS) (The CIMMYT Maize Program 2004).

Controle de pragas e doenças

Consultar sempre um especialista de fitossanidade.

- Reduzir os danos devido aos insectos com a aplicação atempada do insecticida correcto. No entanto, doenças foliares e do colmo assim como de apodrecimento da espiga, são difíceis de controlar.
- Ter atenção à incidência local de pragas e doenças em cada região. Evitar zonas de grande incidência de pragas e doenças malélicas.
- Humidade excessiva ou stress devido à seca pode agravar o problema.
- Coordenar inspecções periódicas de campo, com fitopatologistas e virologistas durante o período de crescimento das plantas.

Eliminação de plantas atípicas

- A eliminação de plantas atípicas de cada acesso deve ser feita nas parcelas de regeneração depois da emergência e durante a floração, pois as sementes podem ter sido contaminadas com outros genótipos ou acessos durante a regeneração anterior ou através de pólen contaminado durante a polinização anterior.

Outros

- Evitar a contaminação com pólen exterior, incluindo o de transgênicos.
- Seguir as práticas de rotação apropriadas para os sistemas de produção de cada região.

Colheita

1. Antes da colheita, registrar todas as informações relevantes sobre características agronômicas (ver a 'documentação' abaixo).
2. Imediatamente antes da colheita, anotar o número de plantas existentes e o número de plantas polinizadas.
3. Durante a colheita, a camada preta da semente está formada e a maioria das folhas, especialmente as da camada exterior estarão secas. Remover da planta as espigas polinizadas e colocá-las perto da planta ou em frente à linha de plantas para serem inspeccionadas (foto 5a e 5b).
4. Em seguida, inspeccionar as espigas individualmente e remover as que tiverem doenças, estejam contaminadas ou com sementes anormais na espiga, antes ou depois da desfolha.
5. Escolher as espigas limpas com grãos de boa qualidade para representarem o ciclo de regeneração e anotar o número de espigas que formam as sementes de cada acesso no livro de campo de regeneração.
6. Tratar as espigas colhidas com insecticida para as proteger de danos de insectos durante o processamento das sementes.

Número de sementes colhidas por cada espiga polinizada

- Colher 10 sementes de 100 plantas maternas ou 50 sementes de 20 plantas maternas ou um igual número de sementes do maior número possível de plantas maternas para manter um tamanho de população efectivo elevado (N_e) (Crossa et al. 1994; Vencovsky e Crossa 1999).

Manejo pós-colheita

1. Secar previamente as espigas numa câmara com ar aquecido (não mais que 35°C) introduzido através das pilhas de espigas para reduzir a humidade dos grãos para cerca de 13 – 15%. Se o milho estiver bastante húmido depois da colheita, manter a temperatura de secagem abaixo de 30°C. Quando não houver condições especiais para a secagem, secar as espigas à sombra, com boa circulação de ar.
2. Debulhar as espigas para envelopes individuais e equilibrar as amostras de sementes preparadas a partir de todas as espigas para representar um ciclo de regeneração, escolhendo normalmente o mesmo número de grãos por espiga. Continuar a secagem de todas as sementes com temperaturas baixas e ambiente seco. Idealmente devem-se fazer vários pacotes com duas sementes de cada espiga individual (para conservação a longo prazo) para serem usados em subseqüentes ciclos de regeneração (Crossa 1987).

3. Fazer a secagem secundária da semente, colocando as sementes em sacos de pano ou de papel, numa câmara de secagem a baixa temperatura e humidade (10 – 15°C e 15 – 20 % de humidade relativa) durante pelo menos 4 semanas, até a humidade da semente atingir um equilíbrio de 6 – 8%. Isto é normalmente feito usando um secador especial com funções combinadas de arrefecimento e desumidificação. Se este tipo de equipamento não estiver disponível, secar as sementes até um conteúdo de humidade de 7 – 8% com sílica gel ou outros desseccantes adequados.
4. Preparar vários conjuntos equilibrados de amostras de sementes em grande quantidade para preservação nas colecções activas, de base e de duplicação de segurança. Enviar uma amostra de cada acesso para um laboratório de fitossanidade, de acordo com as normas locais dos requisitos de quarentena.
5. Registar o peso padrão das sementes (peso de 1000 sementes) e a percentagem de germinação antes da armazenagem.
6. Registar outros dados de regeneração (ver documentação abaixo) no sistema de gestão do banco de germoplasma. Verificar os dados de passaporte originais para ver se as características das sementes são as mesmas descritas nos documentos originais, para repor se necessário, (ver ponto 8 abaixo) as sementes mais antigas com as recentemente regeneradas.
7. Armazenar as amostras de sementes nos respectivos lugares do armazém, de acordo com as normas do banco de germoplasma (colecções activas, de base ou de duplicação de segurança).
8. Substituir as sementes mais antigas da colecção activa e/ou de base com as novas sementes regeneradas, para facilitar a gestão e poupar espaço. Pode ser necessária a manutenção de uma pequena amostra das sementes originais, para posterior referência.

Monitorar a identidade dos acessos

- Conferir a identidade do acesso das sementes regeneradas com os dados de caracterização de cor e textura dos grãos registados originalmente para esse acesso.
- Durante a colheita, conferir de novo a cor e textura dos grãos, tipo de espiga e de grãos, maturação e classificação das raças em relação aos dados originais (registados durante as introduções originais do germoplasma) do acesso no banco de dados do banco de germoplasma. O tipo de planta pode também ser usado para verificar a identidade dos acessos, mas pode não ser muito estável durante os vários ciclos de regeneração, especialmente em diferentes ambientes. A classificação da raça pode ser confirmada pelo fenótipo da planta e pelas características da espiga e grãos.
- Depois da debulha da espiga e durante o processamento das sementes, verificar o lote de sementes em relação às referências permanentes da amostra original do acesso. Colocar etiquetas com o número de identificação do acesso e o número da parcela do campo, dentro e fora dos envelopes e sacos de rede.

Documentação de informação durante a regeneração

Recomenda-se o uso de um livro de campo para registar todos os dados de regeneração, identificação, caracterização, origem das sementes, número de plantas polinizadas e colhidas e características agronómicas dos acessos e introduções. O livro de campo deve conter a seguinte informação detalhada:

- Nome do local de regeneração e referência no mapa/GPS
- Nome do colaborador

- Referência do campo/parcela/estufa
- Número do acesso e identificação da população
- Origem das sementes
- Data, local e número da parcela da regeneração anterior
- Data e densidade de sementeira
- Esquema de campo usado
- Detalhes do manejo do campo (irrigação, fertilização, capina, controle de pragas e doenças, outros)
- Condições ambientais (altitude, fotoperíodo, temperatura, precipitação, tipo de solo, outros)
- Emergência no campo ou estufa (número de plantas germinadas)
- Número de plantas estabelecidas
- Dias entre a plantação e a emergência dos estigmas (barbas) e o lançamento da bandeira (flor masculina)
- Método de controlo de polinização usado: planta a planta, cruzamento em cadeia, polinização aberta
- Número de plantas polinizadas
- Data da colheita
- Número de plantas (espigas polinizadas ou espigas) colhidas
- Peso das espigas colhidas no campo
- Percentagem de humidade da semente depois da colheita
- Avaliação agronómica relativa do acesso, considerando o peso no campo, qualidade das sementes, uniformidade e sobrevivência
- Avaliação agro-morfológica de características das plantas e das espigas (comprimento da espiga, diâmetro da espiga, número de carreiras de grãos, comprimento dos grãos, largura dos grãos, espessura dos grãos, altura das plantas, altura da espiga, número de folhas acima da folha da espiga, dias até à emergência dos estigmas (barbas), dias até à floração masculina, taxa de apodrecimento da espiga) devem ser registadas para estudos de caracterização e usados para análises de multivariância para agrupar os acessos semelhantes (Franco et al. 2005)
- Aprovar ou repetir a regeneração baseada no tamanho efectivo da população e/ou possíveis inconsistências nas sementes dos acessos em relação aos dados de passaporte e de referência das amostras originais das sementes.
- Fotos das espigas e grãos
- Data da armazenagem das sementes
- Percentagem inicial de germinação das sementes armazenadas
- Percentagem de humidade das sementes durante o armazenamento
- Documentos dos certificados de quarentena emitidos pelas entidades fitossanitárias

Referências e leitura recomendada

- The CIMMYT Maize Program. 2004. Maize diseases: A guide for field identification. 4th edition. CIMMYT: Mexico, D.F.
- Crossa J. 1989. Methodologies for estimating the sample size required for genetic conservation of outbreeding crops. *Theoretical Applied Genetics* 77:153–161.
- Crossa J, Taba S, Eberhart SA, Bretting P, Vencovsky R. 1994. Practical considerations for maintaining germplasm in maize. *Theoretical Applied Genetics* 89:89–95.
- FAO/IPGRI. 1994. Genebank Standards. FAO, Rome, Italy.

- Franco J, Crossa J, Taba S, Shands H. 2005. A sampling strategy for conserving genetic diversity when forming core subsets. *Crop Science* 45:1035–1044.
- Hartkamp AD, White JW, Rodriguez Aguilar A, Banzinger M, Srinivasan G, Granados G, Crossa J. 2000. Maize production environments revisited: A GIS-based approach. CIMMYT, Mexico City, Mexico.
- ISTA. 2008. International Rules for Seed Testing. International Seed Testing Association. ISTA Secretariat, CH-Switzerland.
- Lafitte HR. 1994. Identifying production problems in tropical maize: A field guide. CIMMYT, Mexico, D.F.
- Mezzalama ML, Gilchrist L, McNab A. 2001. Seed health: rules and regulations for the safe movement of germplasm. CIMMYT, Mexico D.F.
- Ortega AC. 1987. Insect pests of maize. A guide for field identification. CIMMYT, Mexico D.F.
- Pardey PG, Koo B, Van Dusen E, Skovemand B, Taba S, Wright BD. 2004. CIMMYT genebank in *Saving Seeds: The economics of conserving crop genetic resources ex-situ in the future harvest centers of the CGIAR*, pp. 21–47. CABI Publishing, UK.
- Salhuana W. 1995. Conservation, evaluation and use of maize genetic resources. In: Engels JMM, Rao RR, editors. *Regeneration of Seed Crops and Their Wild Relatives*. ICRISAT, India.
- Wang J, Crossa J, van Ginkel M, Taba S. 2004. Statistical genetics and simulation models in genetic resource conservation and regeneration. *Crop Science* 44:2246–2253.

Agradecimentos

Estas directrizes foram revistas pelos Jose Crossa, International Maize and Wheat Improvement Centre (CIMMYT), México; Major Goodmann, EUA e Zachary K. Muthamia, Banco Nacional de Germoplasma, Quênia.

Citação correcta

Taba S. and Twumasi-Afriyie S. 2008. Directrizes de regeneração: milho. In: Dullo M.E., Thormann I., Jorge M.A. and Hanson J., editors. *Crop specific regeneration guidelines [CD-ROM]*. CGIAR System-wide Genetic Resource Programme (SGRP), Rome, Italy. 11 pp.



1 Campo de milho em San Jose de Minas.
Suketoshi Taba

2 Espigas de milho isoladas com envelopes
de papel cristal.
Suketoshi Taba

3 Sacos de polinização prontos para recolher
o pólen.
Suketoshi Taba

4 Colheita de pólen agitando os sacos de
polinização.
Suketoshi Taba

5a e b Espigas colhidas para serem
inspeccionadas no campo .
Suketoshi Taba

