

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
AGR 99006 – DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LILIANA HENTSCHE DUTRA

MATRÍCULA: 00171628

**MELHORAMENTO VEGETAL PARA A PRODUÇÃO DE MILHO HÍBRIDO NA
EMPRESA DUPONT PIONEER, DALLAS CENTER, IOWA – ESTADOS UNIDOS**



PORTO ALEGRE, março de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
AGR 99006 – DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO

LILIANA HENTSCHE DUTRA

MATRÍCULA: 00171628

**MELHORAMENTO VEGETAL PARA A PRODUÇÃO DE MILHO HÍBRIDO NA
EMPRESA DUPONT PIONEER, DALLAS CENTER, IOWA – ESTADOS UNIDOS**

Supervisor de campo: Eng. Agr. MSc. Darren Schneider

Orientador Acadêmico: Eng. Agr., PhD. Prof. Itamar Cristiano Nava

COMISSÃO DE AVALIAÇÃO

Profª. Mari Lourdes Bernardi – Depto. de Zootecnia (Coordenadora)

Profª. Beatriz Maria Fedrizzi – Depto. de Horticultura e Silvicultura

Prof. Elemar Antonino Cassol – Depto. de Solos

Prof. Josué Sant’Ana – Depto. de Fitossanidade

Profª. Lucia Brandão Franke – Depto. de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia

Profª. Renata Pereira da Cruz - Departamento de Plantas de Lavoura

PORTO ALEGRE, março de 2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda equipe da empresa DuPont Pioneer pela atenção, dedicação, ensinamentos e amizade durante e após o período de estágio. Um agradecimento especial para minha família pelo apoio para enfrentar o período longe do país; à minha “família americana” do trabalho e da casa, Ever, Mané, Robin, Sandy, Brian, Shellie, Sam e Esmeralda. E aos meus tutores Darren, Tracy, Leo e Tara, pela paciência e ajuda na adaptação.

Concomitantemente, quero agradecer ao professor Itamar Nava por aceitar me auxiliar nessa tarefa de escrever e apresentar esse trabalho para que seja o mais fiel possível à experiência vivida.

RESUMO

O trabalho de conclusão de curso foi elaborado com base no estágio realizado na empresa DuPont Pioneer, na estação de pesquisa de Dallas Center, no estado de Iowa, nos Estados Unidos, de 29 de março a 13 de dezembro de 2013, totalizando em torno de 1500 horas. A motivação para a escolha do local se deu em virtude de ser uma oportunidade de trabalho em uma empresa multinacional com grande importância no mercado de sementes de milho híbrido no mundo além do aprendizado que considero muito interessante e relevante: o melhoramento de plantas.

Teve como principais objetivos o acompanhamento e execução das etapas principais desenvolvidas na estação de pesquisa, voltadas para os programas de melhoramento de milho desenvolvidos na mesma.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Localização de Iowa e delimitação geográfica de Dallas Center	8
Figura 2. Prejuízo causado por tempestade em lavoura de milho.....	9
Figura 3. Maiores exportadores e importadores de milho do mundo.....	12
Figura 4. Regiões produtoras de milho nos Estados Unidos.....	12
Figura 5. Esboço das etapas em um programa para a obtenção de linhagens puras....	16
Figura 6. Equipamento utilizado para o plantio de parcelas em experimentos.....	19
Figura 7. Estacas utilizadas para a identificação dos experimentos no campo.....	20
Figura 8. Máquina Boreas.....	21
Figura 9. Boreas raízes.....	21
Figura 10. Pacote para a coleta do pólen (A); transferência do pólen para a espiga concluída (B).....	23

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	7
2. CARACTERIZAÇÃO DO MUNICÍPIO.....	8
2.1. Localização.....	8
2.2. Solo.....	8
2.3. Clima.....	9
3. CARACTERIZAÇÃO DA INSTITUIÇÃO DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO.....	10
4. REFERENCIAL TEÓRICO DOS PRINCIPAIS ASSUNTOS.....	11
4.1. O milho como espécie cultivada.....	11
4.2. Melhoramento genético do milho.....	13
5. MELHORAMENTO GENÉTICO NA EMPRESA.....	14
5.1. Obtenção de linhagens.....	14
5.2. Obtenção de duplo-haplóides.....	16
5.3. Seleção assistida por marcadores moleculares.....	17
5.4. Ensaios de híbridos.....	17
6. ATIVIDADES REALIZADAS.....	17
6.1. Contagem de sementes e preparo de experimentos.....	18
6.2. Semeadura de experimentos.....	19
6.3. Identificação de parcelas e coleta de dados.....	19
6.3.1. Coleta de material para dados genotípicos.....	20
6.3.2. Coleta de dados da máquina Boreas.....	20
6.3.3. Coleta de dados de altura de planta e de inserção da espiga.....	22
6.3.4. Coleta de dados de florescimento.....	22
6.4. Polinização.....	22
6.5. Coleta de dados fenotípicos.....	23
6.6. Colheita manual e mecanizada.....	24
6.7. Análise de dados.....	24
7. DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

1. INTRODUÇÃO

O agronegócio americano, em sua grande parte envolvendo o milho, é de extrema importância para o país. Embora a economia pudesse sobreviver sem o impulso da produtividade advinda de solos férteis do meio-oeste do país, sem as áreas cultivadas com o milho americano, com certeza os Estados Unidos não seriam essa potência mundial na produtividade (USDA, 2013).

O milho americano se destina a alimentação animal, produção de etanol, produção de semente, do grão em si, adoçantes, syrup (um líquido com alta concentração de frutose muito consumido nos EUA), alimentação em geral, etc. E o excedente é exportado. Para se ter uma ideia, de acordo com o USDA, para a safra 2013/2014, com início em setembro, as exportações já chegam a 19.952,464 milhões de toneladas, contra 10.030,296 milhões de toneladas, de todo o ano da safra 2012/2013, ano em que o país teve problemas sérios com a seca.

Em virtude dessa importância do milho para o cenário do agronegócio mundial, empresas estão investindo cada vez mais em tecnologias e em programas de melhoramento, sempre visando uma maior produtividade para o produtor utilizando-se os recursos disponíveis.

A decisão do local para realização do estágio foi feita de maneira que se estabelecesse uma relação entre o conhecimento adquirido no meio acadêmico e a atuação de um engenheiro agrônomo em suas atividades profissionais. Dessa forma, reconhecendo-se a importância da produção do milho em um país considerado uma potência no cenário mundial, a empresa DuPont Pioneer foi escolhida para a realização do estágio.

A DuPont Pioneer possui uma de suas mais importantes estações de pesquisa mundial em Dallas Center, no estado de Iowa, nos Estados Unidos e é uma das empresas mais importantes quando se trata de produção de milho híbrido bem como de novas tecnologias aliadas ao melhoramento de plantas. Soma-se a isso o fato de trabalhar em um outro país, com cultura diferente e o aprendizado ao longo das tarefas realizadas.

O estágio foi realizado no período compreendido entre 29 de março a 13 de dezembro de 2013, totalizando mais de 1500 horas de trabalho. Teve como principais objetivos o acompanhamento e execução de tarefas relacionadas aos programas de melhoramento executados pela estação de pesquisa, bem como a condução de um experimento próprio, com a responsabilidade de toda a análise de dados para apresentação ao término do período de estágio.

2. CARACTERIZAÇÃO DO MUNICÍPIO

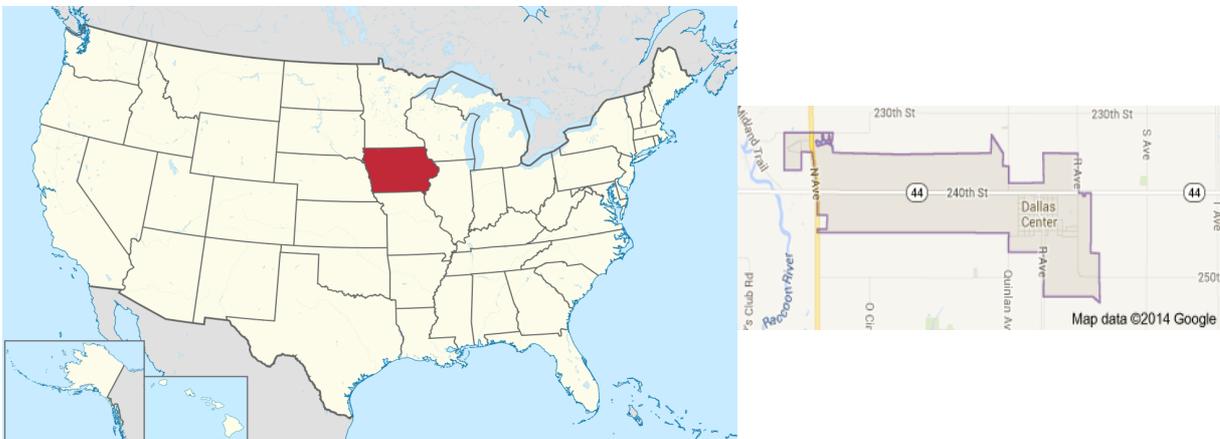
2.1. Localização

O município de Dallas Center localiza-se a 32 quilômetros da capital do estado de Iowa, Des Moines. É uma cidade extremamente pequena e possui 1623 habitantes. (CENSO, 2010). Pertence ao condado de Dallas (PREFEITURA, 2014).

Sua área total é de 11,86 Km².

A cidade faz divisa com Grimes, à leste, Adel, à Oeste, ao Norte com Waukee e ao Sul com Polk.

Figura 1 – Localização de Iowa e delimitação geográfica de Dallas Center



Fonte: Adaptado de Google Maps (2014).

2.2 Solo

A classificação dos solos americanos é semelhante com a observada no Brasil, no entanto, existem ferramentas para a descrição dos mesmos fornecidas pelo Departamento de Agricultura, mais especificamente pelo serviço de conservação de recursos naturais.

Dessa forma, foi realizada a classificação online do solo na área de realização do estágio. A análise resultou em solo número 107 – Webster – franco argilo siltoso, com sedimentos originados e depositada por geleiras; mal drenados e com conteúdo máximo de carbonato de cálcio de 30%. Também foi encontrado na área a presença do solo número 55 – Nicollet argiloso, com sedimentos de argila originados de geleiras; pouco mal drenados e com o mesmo conteúdo de carbonato de cálcio encontrado no anterior (NRCS, 2014). Os solos na região não possuem problemas de acidez, dessa forma, problemas como a toxidez por Alumínio também não são observados.

2.3.Clima

Conforme a classificação climática de Köppen, Dallas Center está localizada em uma região de clima Dfa (clima continental, com estações de verão e inverno bem definidas, com clima úmido, precipitações em todos os meses do ano, sem uma estação seca definida e com verões quentes). A média de temperaturas máximas fica em torno dos 16 graus Celsius enquanto que a média das mínimas está em 5 graus Celsius. Isso se deve ao período em que a neve cobre totalmente as terras do estado, que totalizam em torno de 150 – 170 dias (U.S CLIMATE DATA, 2013).

A média anual de precipitações para o estado de Iowa é de 823 milímetros, sendo que junho, o mês mais chuvoso possui uma média de 109 milímetros de chuva. Na região de Dallas Center, não se vê necessidade de utilização de irrigação, pelo menos até o momento. No entanto, houveram perdas significativas para os produtores de milho nos últimos anos, ocasionadas justamente pelo déficit hídrico.

Um lugar de destaque deve ser reservado para a ocorrência frequente de tornados na região. Iowa, além de fazer parte do cinturão do milho americano, também é componente da “alameda” dos tornados. Esse fator é extremamente preocupante para os habitantes e produtores de milho da região, pois a ocorrência de fenômenos envolvendo ventos extremamente fortes pode destruir casas e lavouras muito rapidamente (Figura 2).

Figura 2 - Prejuízo causado por tempestade em lavoura de milho



Foto: Liliana Hentschke Dutra

3. CARACTERIZAÇÃO DA INSTITUIÇÃO DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO

A empresa Pioneer Hi-Bred foi fundada em 1926 por Henry Agard Wallace que, por seu interesse e entendimento da genética do milho o levou a introduzir sementes de milho híbrido no mercado para o aumento do rendimento dos agricultores, acreditando que esta tecnologia de base científica e sua abordagem iriam revolucionar a agricultura através do aumento da produção e produtividade (DUPONT PIONEER, 2014).

A Pioneer Hi- Bred International é uma das maiores empresas de sementes do mundo. A companhia desenvolve, produz e comercializa milho híbrido, sorgo, girassol, soja, alfafa, trigo, canola e arroz. A empresa domina a maioria dos mercados em que participa, possuindo uma participação de 40 por cento do mercado de sementes de milho norte-americano, e ainda mais em mercados europeus. A empresa foi fundamental para uma das conquistas genéticas mais importantes da agricultura norte-americana: o desenvolvimento de milho híbrido. A Pioneer tem nos últimos anos se tornado cada vez mais envolvida no uso da biotecnologia. Sempre conhecida como uma empresa muito independente, a Pioneer concordou em ser comprada pela química Dupont em 1999 para se manter competitiva em uma indústria que muda rapidamente.

Somente nos Estados Unidos, a empresa conta com 45 estações de pesquisa (em 25 estados) colocadas em locais estratégicos para o melhoramento mais específico, conseqüentemente, os produtos gerados possuirão características de adaptação nas regiões também específicas. Além disso, em território americano, são 33 estações de produção e beneficiamento de sementes de milho híbrido, fazendo com que a logística seja facilitada, pois estas unidades estão divididas em 14 estados.

A estação de pesquisa de Dallas Center conta com 20 trabalhadores efetivos entre pesquisadores, assistentes de pesquisa e auxiliares de pesquisa. Além disso, para o trabalho de contagem de sementes para experimentos possuem 15 trabalhadores temporários (trabalham de setembro até final de maio). A polinização é feita com o auxílio de 130-140 funcionários temporários que são contratados por 1 mês e meio e, na sua grande maioria, são jovens estudantes da escola de ensino médio da cidade.

4. REFERENCIAL TEÓRICO DOS PRINCIPAIS ASSUNTOS

4.1 O milho como espécie cultivada

O milho é classificado como pertencente à família Poaceae, tribo Maydeae, gênero *Zea* e espécie *mays* (*Zea mays* L.). Como é característico da sua tribo, o milho possui flores unissexuadas, com inflorescências masculinas (pendão) e femininas (espiga) separadas na mesma planta. De acordo com o modo de reprodução, o milho é uma espécie alógama com pelo menos 95% de reprodução cruzada (PATERNIANI & CAMPOS, 2005).

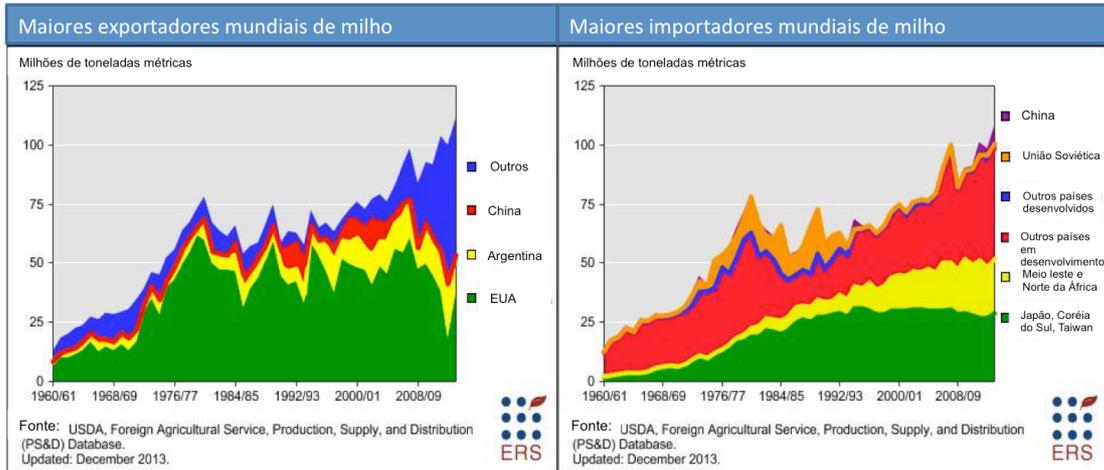
Para a obtenção de informações à respeito de centros de origem de uma espécie, são observadas as áreas de localização das mesmas, onde haja um grande número e diversos tipos (diversidade genética). Baseando-se nesse princípio, o milho possui dois possíveis centros de origem, sendo as terras altas no Peru, Equador e Bolívia; e a região Sul do México e a América Central (SLEPER & POELHMAN, 1995).

O país que mais produz e exporta milho no mundo é os Estados Unidos. Isso representa uma fonte significativa de demanda para os produtores e gera a maior contribuição líquida para a balança comercial do país dentre todas as commodities (mercadorias de origem primária utilizadas em transações comerciais) produzidas. Na média, o milho representou aproximadamente 11% de toda a exportação agrícola durante os anos 90. No ano 2008 esse valor chegou a 12% (USDA, 2013).

Segundo dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2014), os Estados Unidos dominam o comércio mundial de milho, e o que é exportado representa apenas uma pequena parcela quando comparado à demanda por milho do país (Figura 3). Isso significa que os preços do milho dependem, em grande parte, das relações de oferta e demanda no mercado dos EUA, e, no resto do mundo o preço do cereal deverá se ajustar aos preços vigentes nos Estados Unidos. Essa forte influência da oferta de milho dos EUA faz com que o comércio mundial do cereal se torne dependente das condições meteorológicas no cinturão do milho americano, composto pelos estados de Iowa, Illinois, Indiana, Sul de Michigan, Oeste de Ohio, Leste de Nebraska, Leste do Kansas, Sul de Minnesota e partes do Missouri (Figura 4). A Argentina, o segundo país maior exportador de milho na maioria dos anos, está localizada no Hemisfério Sul, e os agricultores argentinos podem plantar o seu milho depois de descobrir o tamanho da safra americana, proporcionando uma rápida resposta da oferta do cereal no mercado. Vários países - incluindo o Brasil, Ucrânia, Romênia e África

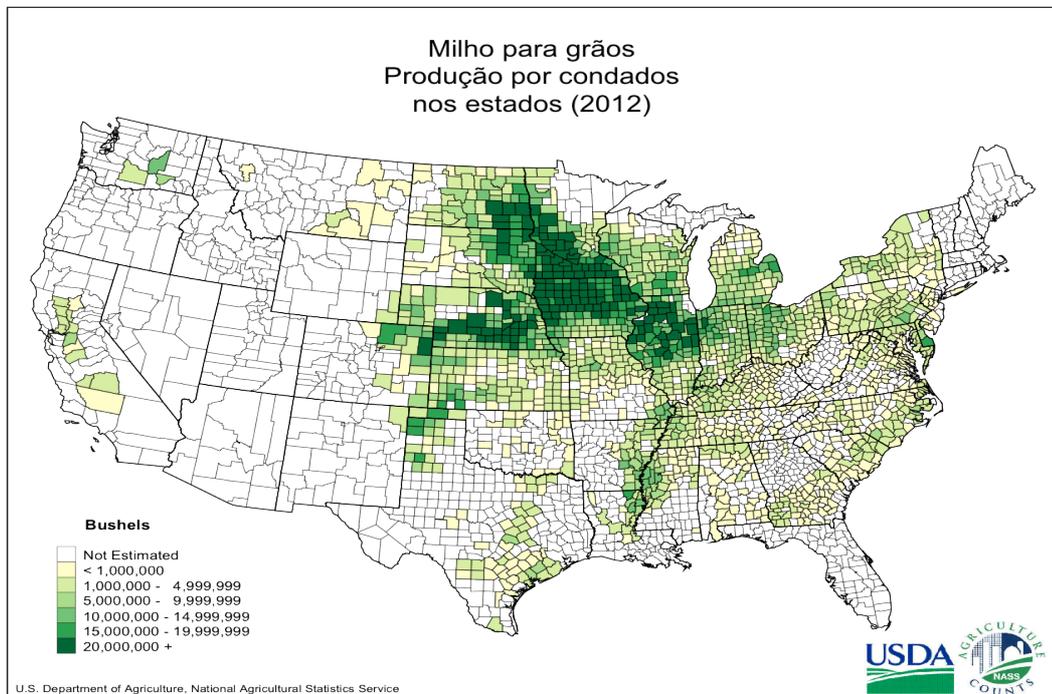
do Sul - tiveram exportações significativas de milho quando as colheitas possuíam altos preços ou mercados internacionais atraentes.

Figura 3 - Maiores exportadores e importadores de milho do mundo.



Fonte: USDA (2014).

Figura 4 - Regiões produtoras de milho nos Estados Unidos.



Fonte: USDA (2012).

4.2. Melhoramento genético do milho

Para o início de um programa de melhoramento, deve-se observar, principalmente o germoplasma disponível e o método de melhoramento a ser utilizado. Dessa forma, pode-se escolher determinadas características desejadas, uma vez que o milho possui elevada quantidade de raças e variedades. Essas características podem ser relacionadas à utilização final do cereal (grão, silagem), resultados para curto, médio ou longo prazo, preferências pelo formato e cor do grão além de tolerância a estresses bióticos e abióticos (PATERNIANI E CAMPOS, 2005).

O milho tornou-se uma referência para o desenvolvimento de híbridos desde 1960. Híbrido pode ser definido como toda a progênie (F_1) gerada a partir do cruzamento de duas (híbrido simples), três (híbrido triplo) ou quatro (híbrido duplo) linhagens endogâmicas (puras) geneticamente distantes ou híbridos antecessores a ele (SLEPER & POELHMAN, 1995).

O principal objetivo em se desenvolver variedades híbridas está associado com a exploração da heterose. A expressão da heterose pode ser quantificada pela diferença de desempenho das progênies F_1 em relação ao pai mais produtivo ou em relação à média dos pais (PATERNIANI E CAMPOS, 2005). A principal causa da superioridade da progênie (híbrido), o que resulta em vigor, é dependente de locos gênicos em heterozigose (ALLARD, 1960).

Dentre os métodos de melhoramento existentes, o método genealógico é utilizado mundialmente para o desenvolvimento de linhagens endogâmicas (FEHR, 1987), as quais serão utilizados na produção de híbridos comerciais. O princípio do método consiste na seleção de plantas individuais em uma população que está segregando (a partir da geração F_2), com a avaliação de cada progênie separadamente. Os indivíduos selecionados serão avaliados por sua progênie, considerando-se assim o seu genótipo e não somente o fenótipo (BORÉM, 2009).

O início da utilização da biotecnologia como ferramenta auxiliar ao processo de melhoramento de milho foi um marco importante na história mundial da produção de híbridos. O desenvolvimento de plantas de milho transgênicas resistentes a insetos (com início de sua comercialização nos Estados Unidos em 1995), trouxe uma redução de problemas de rendimento da cultura, pela redução da pressão de insetos bem como a redução da aplicação de inseticidas, o que reduz o custo da produção (ANDRADE et al, 2011). A utilização da tecnologia se dá pela introdução de um gene oriundo de outra espécie na planta de milho,

seguida de seleção e regeneração da planta agora transgênica e/ou geneticamente modificada. A maioria dos eventos transgênicos é oriunda da utilização do *Bacillus thuringiensis* (Bt), bactéria encontrada no solo, que se mostra efetiva contra várias espécies de insetos-praga na cultura do milho. (VASCONCELOS et al, 2011).

O uso de marcadores moleculares também representa uma ferramenta importante aos programas de melhoramento de milho. A seleção assistida por marcadores tem como objetivo tornar as atividades de identificação e caracterização de indivíduos superiores mais simples e rápida. Dessa forma, a seleção de indivíduos superiores será mais precisa, podendo se obter em gerações segregantes, uma frequência elevada de genótipos desejados (BERED *et. al.*, 1997) e não é dependente do ambiente.

5. MELHORAMENTO GENÉTICO NA EMPRESA PIONEER HI-BRED

Existem dois grupos de trabalho bem divididos dentro da empresa. Um, se dedica a produção de linhagens endogâmicas, representando o melhoramento genético propriamente dito, feito em um *nursery* (campo experimental da empresa onde é feita a seleção das plantas superiores). E o outro, que trabalha testando e avaliando os híbridos obtidos a partir dessas linhagens.

5.1. Obtenção de linhagens

Para a seleção das linhagens superiores, se utiliza basicamente o método genealógico de melhoramento. Esse método é utilizado para se selecionar linhagens superiores que serão utilizadas em cruzamentos para a obtenção de híbridos. Paralelamente à utilização desse método que caracteriza o melhoramento clássico, a empresa utiliza a produção de duplo-haplóides, visando acelerar o processo de obtenção de linhagens puras, além de seleção baseada em dados genotípicos obtidos previamente através de marcadores moleculares, o que caracteriza o *forward breeding* (melhoramento adiantado).

O germoplasma que é trabalhado na empresa possui basicamente dois grupos heteróticos. Esses grupos são distantes geneticamente e suas linhagens são conduzidas separadamente para que, no processo de obtenção de híbridos, quando se cruza uma linhagem de cada grupo, a heterose seja a maior possível. Essas linhagens serão cruzadas somente em F₅ ou após a obtenção de linhagens duplo-haplóides.

A autofecundação de plantas F₁, obtidas a partir de cruzamentos controlados entre genitores pertencentes ao mesmo grupo heterótico, darão origem a plantas F₂. A partir desse

momento, pode-se autofecundar as plantas novamente (melhoramento convencional) ou pode-se enviar as sementes para a produção de plantas duplo-haplóides. No caso da estação de pesquisa, essas sementes são enviadas para o Haváí ou para o Chile para esse processo. No caso da autofecundação de plantas F_2 , sementes F_3 serão obtidas.

No melhoramento convencional, começa-se a observação das características da planta, para a seleção visual das mesmas e decisão para o avanço de materiais. As principais características observadas são a incidência de doenças e, principalmente, acamamento e quebramento do colmo. Em Dallas Center somente 20% de todo o material é melhorado pelo método convencional. Os outros 80% são convertidos em duplo-haplóides, utilizando-se o método de indução com o produto colchicina.

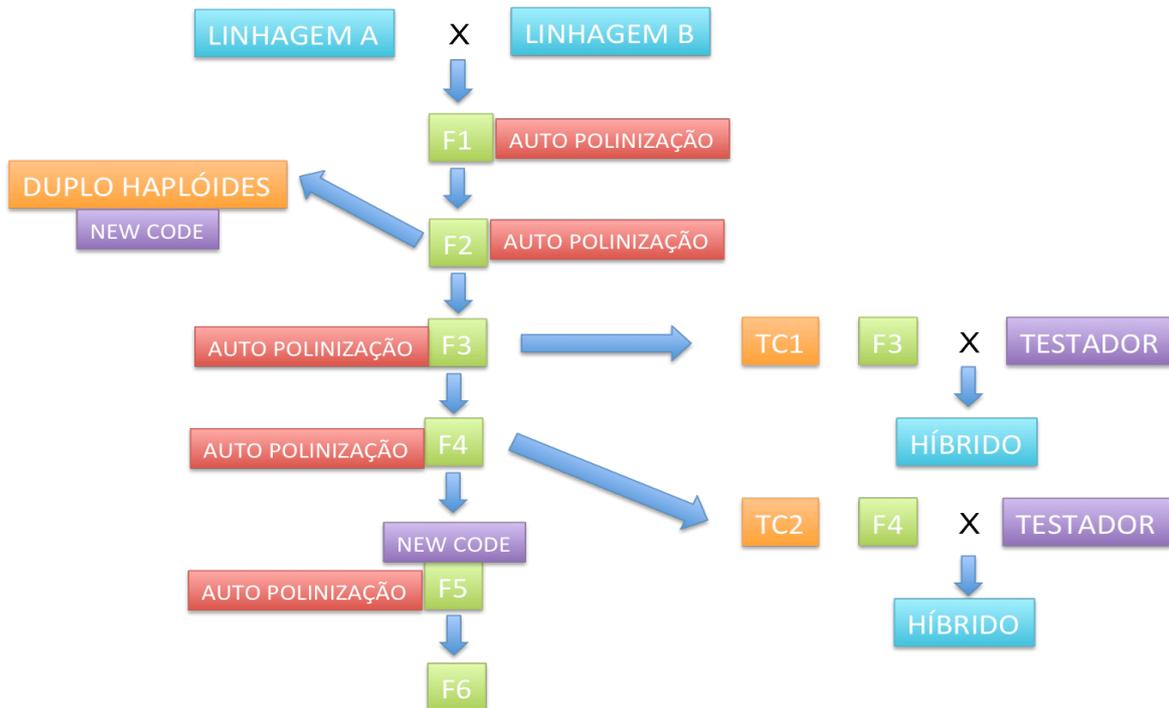
Ao mesmo tempo que plantas F_3 são semeadas no *nursery*, elas são avaliadas no *TopCross 1* (TC1), que é quando as linhagens começam a ser testadas como híbridos. Os TC1 são plantas em F_3 testadas com 1 linhagem testadora em 3 ou 4 locais, obtendo-se assim, valores de rendimento, muito importantes para a determinação da manutenção ou exclusão da linhagem do programa.

Uma linhagem testadora é fixa e conhecida pelos pesquisadores, assim, possui alta capacidade de combinação com qualquer material e tem a capacidade de gerar bons híbridos.

Plantas em F_4 serão testadas em *TopCross 2*, nessa etapa do programa, as plantas serão testadas com 3 linhagens testadoras em 7 ou 8 locais, para dados mais consistentes de rendimento.

Em F_5 , as plantas superiores serão codificadas, pois estão quase totalmente homozigotas (93.5% de homozigose nos locos) (BORÉM, 2009). Essas, deverão ser submetidas a mais uma autofecundação e depois, juntamente com os duplo-haplóides codificados poderão ser utilizadas como linhagens elite, com as características desejadas pelos pesquisadores. Assim, o trabalho de melhoramento para a obtenção de linhagens puras está concluído.

Figura 5 - Esboço das etapas em um programa para a obtenção de linhagens puras.



5.2. Obtenção de duplo-haplóides

A produção de linhagens duplo-haplóides (DH) visa a obtenção de genótipos com 99% de locos em homozigose. A principal vantagem na utilização dessa técnica está na rápida obtenção dessas linhagens puras. Enquanto um programa de melhoramento convencional obtém uma linhagem pura em 5-10 anos, os duplo-haplóides são obtidos em 2 anos.

Normalmente, as sementes enviadas para a produção de DHs estão em F₂. Esta planta é cruzada com uma planta considerada indutora. Esse indutor é uma linhagem que, ao cruzar com o material desejado, não transmite seu material genético para os descendentes, o que possibilita a formação de um grão haplóide (n). Este grão, identificado por apresentar coloração roxa, é tratado com o produto químico colchicina, que induz a duplicação do genoma haplóide, o que resultará em um embrião diplóide (2n). Assim, esse grão é semeado em tubetes em ambiente protegido e após é transferido para o campo.

Os DHs obtidos serão testados posteriormente em TC1 e TC2 e selecionados da mesma forma que plantas em melhoramento convencional.

5.3. Seleção assistida por marcadores moleculares

Utilizando-se as técnicas de biologia molecular, a empresa realiza a seleção de genótipos baseando-se em análises genotípicas.

Um dos métodos é através da obtenção de partes das folhas, através de um furador. Essas amostras são enviadas para o laboratório e o resultado retorna para os pesquisadores, que terão os dados genotípicos no momento em que estiverem fazendo as observações fenotípicas das populações.

Outro método utilizado é o *Kernel Chipping*, que consiste na retirada de um pequeno fragmento da semente (parte superior direita da semente), o qual é enviado ao laboratório. Essa técnica se baseia no mesmo princípio da amostra das folhas, no entanto, a semente só é semeada após a análise, quando possuir as características desejadas pelo pesquisador.

5.4. Ensaios de híbridos

Após a obtenção das linhagens puras desejadas, se iniciará os testes de híbridos. Essa fase se divide em R1, R2, R3, R4 e R5 ou RC (híbrido comercial). Durante os anos de testes de híbridos são observadas as características dos mesmos híbridos em variados locais. Conforme se avança um híbrido, o número de locais para o teste aumenta, para que, dessa forma, os resultados de rendimento sejam mais consistentes. Assim, em R1 híbridos são testados em 20 locais, enquanto que em R4 são testados em mais de 100 locais. Isso se deve ao fato de que, em Dallas Center, são conduzidos ao menos 6 programas de melhoramento distintos.

Essa fase é de suma importância e as observações devem ser criteriosas e cuidadosas, tanto que, para a condução de áreas em R4 e R5 a estação possui um grupo especial. Esse grupo, com nome IMPACT, existe somente para essas fases e possui ensaios de rendimento em mais de 100 locais em Iowa, Nebraska, Minnessota, Illinois e Missouri.

6. ATIVIDADES REALIZADAS

Durante o período de estágio, foram acompanhadas a maioria das atividades relativas aos programas de melhoramento de milho desenvolvidos pela estação de pesquisa da empresa em Dallas Center bem como a coleta de dados de experimentos em cidades nos estados de Iowa e Nebraska.

À seguir, serão descritas, detalhadamente, as principais atividades desenvolvidas durante o período de realização do estágio na empresa DuPont Pioneer.

6.1. Contagem de sementes e preparo de experimentos

Esta atividade consistiu em se obter conhecimento à respeito do sistema de identificação utilizado para as sementes presentes e armazenadas na câmara fria da empresa, sua localização (normalmente em caixas dispostas em prateleiras identificadas com códigos específicos) e os cuidados na contagem das sementes.

O sistema utilizado pela empresa é totalmente informatizado. Todas as sementes, organizadas em pacotes, possuem um código de barras e um número de identificação (como se fosse uma identidade). Assim, no momento em que se utiliza determinada semente, para a contagem e colocação em um envelope destinado ao experimento, deve-se fazer a leitura do código de barras com um scanner conectado ao computador que irá avisar se a identidade confere com a semente necessária.

O mesmo arquivo do computador contém a localização exata da semente a ser utilizada. Ele indica o número da prateleira e a caixa onde está localizado o pacote contendo as sementes solicitadas. Só assim será possível a leitura do código de barras dessa semente, dessa forma, a contagem poderá ser realizada (manualmente) e os envelopes separados por local a serem semeados.

Essa atividade é realizada por 15 pessoas durante um período de pelo menos 3 meses e essas sementes são utilizadas para a semeadura no campo utilizado para a obtenção de linhagens.

Paralelamente à contagem manual das sementes, se faz a contagem automatizada das sementes. Nesse caso, são ensaios de rendimento de híbridos, onde se precisa de uma maior quantidade de sementes e onde estas serão semeadas em mais locais, tendo assim, um maior volume de trabalho. A contagem automatizada consiste em operar máquinas contadoras de sementes. O sistema de organização de sementes é o mesmo, assim, basta encontrar a semente desejada, colocar na máquina previamente ajustada com o número de sementes desejadas e o número de pacotes (que serão os locais) necessários.

Após a contagem de todas as sementes necessárias para os experimentos, os envelopes contendo as sementes são organizados em caixas, de acordo com a pré disposição no campo e escaneadas, para a conferência no sistema.

6.2. Semeadura de experimentos

Nessa atividade foi realizada a semeadura dos experimentos previamente preparados e descritos na etapa anterior. Para tanto, se utiliza semeadoras especiais para experimentos. Foi feita a divisão em equipes para a mais fácil organização e otimização do tempo, já que ao todo, foram em torno de 100 locais diferentes para o plantio.

As semeadoras utilizadas para experimentos são de 8 linhas (Figura 6). Assim, consistem em possuir 2, 4 ou 8 pessoas em cima do equipamento, colocando as sementes em sincronia no dosador, para que assim possam ser semeadas as mesmas sementes em 4 linhas (2 pessoas), 2 linhas (4 pessoas) ou 1 linha (8 pessoas). Essas pessoas possuem as caixas de sementes em ordem à sua frente e possuem fones de ouvido para a comunicação entre si e conferir se estão plantando na mesma linha previamente indicada no envelope.

Figura 6 - Equipamento utilizado para o plantio de parcelas em experimentos.



Foto: Ever Andrés Vargas Escobar

6.3. Identificação de parcelas e coleta de dados

Após em média 2 semanas da semeadura, foram feitas identificações com estacas na maior parte das localidades. Isso serve para que cada pessoa que vá até a lavoura contendo os experimentos saiba exatamente que planta está se desenvolvendo em determinada parcela e, assim, fazer as observações necessárias. Os dados da estaca consistem no nome do experimento, o bloco e a parcela de cada lavoura (Figura 7). Esses dados serão os mesmos encontrados em cadernos de anotações de pesquisadores e auxiliares

Cerca de vinte dias após a emergência das plantas, iniciou-se a coleta de dados de número de plantas por parcela. Essa contagem é importante para que possam ser descartadas parcelas em que o número de plantas for muito baixo, o que irá influenciar na sua produtividade, sendo impossível a obtenção de dados confiáveis de rendimento.

A coleta desses dados é feita com o auxílio de um iPad onde consta os dados de campo (nome do experimento, bloco e parcela). Dessa forma, 6 pessoas contavam o número de plantas por parcela e 1 pessoa, anotava os dados no iPad.

Figura 7 - Estacas utilizadas para a identificação dos experimentos no campo



Foto: Maria Inés Amuchastegui

6.3.1. Coleta de material para dados genotípicos

Através da utilização de um perfurador de folhas (*leaf puncher*), se coletou amostras de folhas em parcelas específicas dos experimentos.

Esse material foi enviado para o laboratório de biologia molecular da empresa, onde posteriormente foi feita, pelos técnicos de laboratório, a extração de DNA e testes necessários. Assim, os pesquisadores podem contar com dados genotípicos das linhagens e uni-los com as observações fenotípicas feitas à campo para uma melhor qualidade de dados para a escolha de materiais superiores dentro do programa de melhoramento.

6.3.2. Coleta de dados da máquina Boreas

Um dos experimentos mais interessantes realizados pela estação de pesquisa envolve a máquina do vento Boreas. Essa máquina foi desenvolvida pelos engenheiros da empresa para simular ventos turbulentos de até 160km/hora, que ocorrem em tempestades severas na região (Figura 8).

A necessidade da criação de uma máquina assim ocorreu após o ano de 2000, quando fortes tempestades ocorridas principalmente no estado de Iowa, resultaram em perdas gigantescas para os agricultores que plantavam sementes Pioneer, pois os fortes ventos fizeram com que os colmos das plantas de milho se partissem, sem a possibilidade de recuperação das lavouras.

A máquina simuladora de vento foi incluída ao programa de melhoramento para se fazer a seleção de linhagens que sejam tolerantes aos ventos fortes, que são característicos da região do cinturão do milho.

Dessa forma, trabalhando durante a madrugada (período em que a planta é mais suscetível por estar com o colmo túrgido e também por ser o horário em que normalmente ocorrem tempestades, tornados, etc), a máquina Boreas passava nas parcelas (4 de cada vez).

Pela manhã, fez-se a contagem de colmos quebrados em cada parcela e esses dados foram armazenados com o auxílio do iPad. Dessa forma, para o programa de melhoramento que visa colmos mais fortes e resistentes às tempestades, parcelas com números elevados de plantas quebradas fizeram com que as linhagens fossem excluídas do programa.

Da mesma forma que há a máquina para testar os colmos, existe outra utilizada para testar as raízes das plantas. A mesma, chamada “Boreas raízes”, visa a redução de problemas com acamamento sofridas pelas plantas da região. As máquinas se parecem, no entanto a de raízes possui as turbinas de vento voltadas para a parte de baixo da planta (Figura 9).

Figura 8 - Máquina Boreas.



Foto: DuPont Pioneer

Figura 9 - Boreas raízes



Foto: DuPont Pioneer

6.3.3. Coleta de dados de altura de planta e de inserção da espiga

Com o auxílio de uma estaca devidamente identificada com as unidade de medidas, se coletou as informações de altura de plantas e de inserção da espiga. Esses dados foram obtidos medindo-se a partir da base da planta até a ponta do pendão (para altura de planta) e da base da planta até o nó de inserção da espiga (para altura da inserção da espiga).

Com esses dados é possível excluir linhagens ou híbridos com essas medidas elevadas, pois, sendo uma região de tempestades severas, com presença de ventos muito fortes, plantas muito altas e com espigas altas tendem a ser mais suscetíveis ao quebramento do colmo.

6.3.4. Coleta de dados de florescimento

Também com o auxílio de um iPad, foram feitas observações em 2 locais diferentes das datas em que se iniciou a liberação do pólen pelo pendão das plantas e o início do aparecimento dos estigmas da espiga, o que caracteriza o período reprodutivo da planta e que é muito importante no melhoramento, uma vez que híbridos, para serem produzidos, necessitam de sincronia entre a liberação do pólen e o aparecimento dos estigmas para uma adequada fertilização e consequente produtividade.

Foram feitas as observações a cada 2 dias em cada localidade para que os dados fossem mais precisos.

6.4. Polinização

Em um programa de melhoramento de milho, a polinização é a fase mais importante. Nesse período deve-se realizar as tarefas muito atentamente para que, na colheita, se consiga o maior número de sementes possível.

O milho é uma planta alógama, dessa forma, realizam a polinização cruzada, onde o pólen de uma planta preferencialmente fecunda o estigma de outra planta. Em melhoramento, é necessário se fazer a auto polinização do milho para a obtenção de plantas homozigotas.

A auto polinização em milho é realizada se coletando o pólen do pendão da planta individual e transferindo manualmente esse pólen para a espiga dessa mesma planta. Assim, o pólen entrará em contato com os estigmas da espiga e fertilizará a mesma.

A espiga é coberta com um pacote para a proteção dos estigmas. Essa cobertura é realizada bem cedo, ao primeiro sinal de desenvolvimento da espiga. Dessa forma, não há o risco de contaminação por pólen que não seja da própria planta.

No momento em que se detectar a presença de pólen viável no pendão, se observa se a espiga possui estigmas. Em caso positivo, um saco de papel é colocado, cobrindo totalmente o pendão (Figura 10 – A). No dia seguinte, esse pacote é cuidadosamente retirado do pendão e posicionado sobre a espiga. Rapidamente, se retira o pacote que cobria a espiga e se sacode o pacote contendo o pólen (Figura 10 – B). Dessa forma se evita a polinização cruzada e as chances de fertilização aumentam.

Figura 10 - Pacote para a coleta do pólen (A); transferência do pólen para a espiga concluída (B).

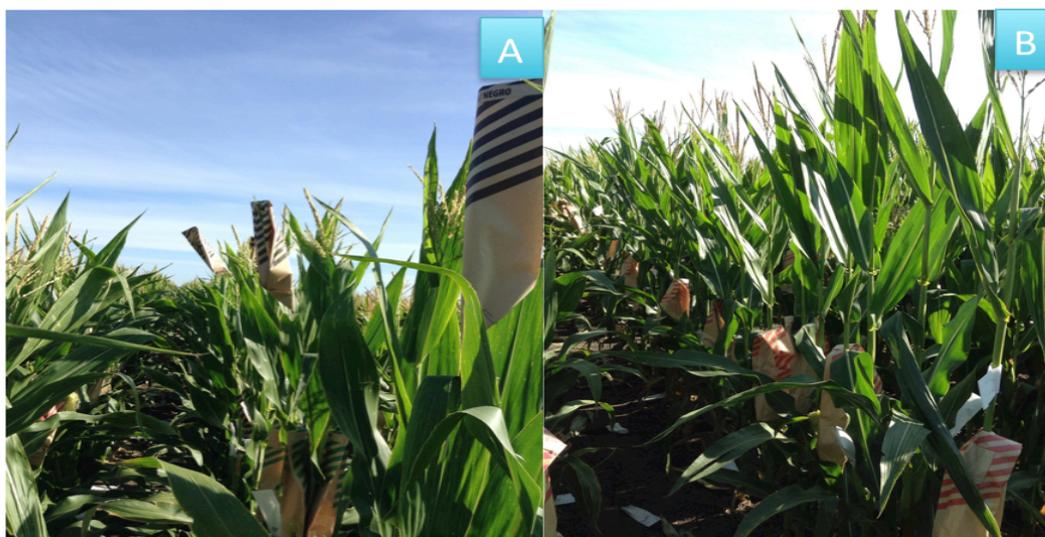


Foto: Liliana Hentschke Dutra

6.5. Coleta de dados fenotípicos

Paralelamente à polinização, fez-se a coleta de dados fenotípicos. Tarefa de suma importância em um programa de melhoramento, pois é a observação a campo do que a planta está expressando.

Nesse período foi priorizado observações como o tamanho do pendão (obedecendo uma escala de 1 a 9, sendo 1 pendão pequeno e com baixa capacidade de produção de pólen e 9 pendão grande e com alta capacidade produtora de pólen), a ocorrência de acamamento (nesse caso, a linhagem que apresentar acamamento mais severo deverá ser excluída do programa) bem como a ocorrência de plantas com o colmo quebrado (nesse caso as linhagens também devem ser excluídas do programa).

Nessas observações também se teve o cuidado de se obter dados à respeito de doenças. As mais severas são a helmintosporiose do milho, causada pelo patógeno *Exserohilum turcicum* bem como a Cercosporiose, causada pelo fungo *Cercospora zae-maydis*. Assim, se

teve cuidado para a detecção de problemas de pressão dessas doenças nas parcelas experimentais.

Além dessas observações específicas, recomendou-se a anotação de qualquer coisa que parecesse anormal em cada parcela, como falta de algum nutriente, problemas de desenvolvimento, falhas no plantio, etc.

6.6. Colheita manual e mecanizada

Ao final do ciclo da cultura, fez-se a colheita manual de parcelas (parcelas específicas, localizadas no nursery) previamente determinadas através das análises genotípicas, feitas no laboratório da empresa, ou baseadas em observações do fenótipo expresso no campo. As espigas eram retiradas da palha e colocadas em sacos de nylon devidamente identificadas. Após sua retirada do campo, eram depositadas em secadores para atingirem a umidade ideal para o armazenamento.

Nessa tarefa foi possível o acompanhamento dos pesquisadores no campo e visualizar o que eles buscam em uma linhagem que será selecionada para uma alta produtividade no futuro. Normalmente os pesquisadores já possuem dados genotípicos à respeito das linhagens e complementam o processo de seleção com as observações fenotípicas na hora da colheita. Algumas das características observadas são: o comprimento e largura da espiga, número de fileiras de grãos na espiga, tamanho do sabugo e formato do grão.

A colheita mecanizada foi realizada em todos os locais com testes de híbridos. O principal componente desses testes é o rendimento. Dessa forma, a colhedora é equipada com aparelhos medidores de umidade e balança. Dessa forma, as médias de produtividade dos híbridos são feitas automaticamente e esses dados são armazenados diretamente em um *pen drive* conectado à máquina. As sementes colhidas são descartadas ou deixadas para o produtor que arrendou parte de suas terras para o plantio dos experimentos.

6.7. Análise de dados

Após a colheita manual e secagem das espigas, alguns experimentos necessitam de dados de rendimento. Dessa forma, esses dados foram gerados através de estimativas com base em fotografias tiradas das espigas.

O processo é todo baseado em programas de análise no computador. Para tanto, foi necessário fotografar uma parte significativa das espigas previamente colhidas com uma aparelhagem especial desenvolvida pela empresa. Essas fotos identificadas com o nome do

experimento, foram enviadas para análise em um setor específico de informática da empresa. Ao final da análise, as fotos retornaram com valores estimados de comprimento de espiga, largura da espiga, tamanho do grão, número de fileiras de grãos, número total de grãos, e, com base nesses dados, é possível se ter a estimativa de produtividade para cada experimento desejado.

Esse método é bem confiável, pois quando comparado aos dados obtidos em uma máquina colhedora teve valores bastante aproximados.

Baseado nesse método de estimativa de rendimento, com fotografias, foi desenvolvido um projeto onde se queria descobrir qual seria a influência da altura das plantas vizinhas no rendimento de híbridos.

Para isso, se coletou dados de altura de plantas nas linhas de híbridos escolhidas, em 10 locais diferentes. Na época da colheita, foram colhidas 10 espigas em cada parcela em que se desejava obter os valores de rendimento. O experimento tinha 3 repetições para 5 híbridos em cada local.

Após a colheita das espigas, foram feitas fotografias das mesmas e enviadas para análise. Com o resultado, se utilizou um programa de estatística para a análise de dados comparando-se os rendimentos obtidos com a altura das plantas vizinhas.

Ao final da análise foi possível a observação de padrões para a redução do rendimento, baseada em um menor tamanho de espiga para híbridos que possuíam um vizinho mais alto, quando comparados com um vizinho mais baixo. Isso dá indícios que a competição, representada pela presença de vizinhos mais altos, influencia no rendimento de híbridos, o que pode ser decisivo no momento da seleção dos mesmos, pois podem não estar expressando seu potencial total de rendimento em virtude de um fator externo e com isso, levando à sua exclusão do programa pelo pesquisadores.

Esse experimento será repetido para que os dados possam ser confirmados. Mas já se estudam alternativas para tentar minimizar o efeito da competição em lavouras de experimentos.

7. DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização do estágio se deu de forma surpreendente. Pois se teve a oportunidade de conhecer os mais diversos setores da empresa e, em se tratando de uma empresa multinacional, isso é muito difícil. Algumas coisas como visitas em laboratórios e casas de

vegetação não puderam ser registrados fotograficamente, mas a explicação dada foi muito satisfatória.

Uma parte interessante do trabalho da estação de pesquisa em Dallas Center é o uso de jovens estudantes de ensino médio no período de maior volume de trabalho (polinização). Eles são contratados, com a autorização dos pais e trabalham durante as férias. Isso é bom para as duas partes, pois a empresa consegue o volume de mão-de-obra necessária (120-140 pessoas) e os jovens ganham experiência e dinheiro durante as férias.

Um setor da empresa que é de suma importância e vastamente utilizado é o uso da biologia molecular em favor do melhoramento. A utilização de marcadores moleculares é muito comum e todo o processo é feito através de programas de computadores (também aplicativos para iPad e iPhone), facilitando muito para quem deseja informações sobre determinado marcador, linhagem ou híbrido de interesse.

A vasta utilização de duplo-haplóides no programa é outro fator interessante, pois 80% de todas as linhagens são submetidas ao processo, o que economiza muito tempo para o melhoramento da planta, no entanto com altos custos. Entretanto, não há a possibilidade, pelo menos nos próximos anos, dessa tecnologia de DHs substituir o melhoramento clássico e as observações feitas pelos pesquisadores no campo. É através do melhoramento clássico que se vê a interação do genótipo do indivíduo com o ambiente, e esse fenótipo continua sendo a parte mais importante da planta, pois é baseado no fenótipo que o produtor irá comprar determinada semente de milho híbrido.

A máquina Boreas merece destaque. Foi um trabalho conjunto entre pesquisadores e engenheiros da empresa, além de um investimento milionário. O trabalho com essa máquina do vento vêm dando resultados e os híbridos da empresa agora suportam melhor (não quebram o colmo tão facilmente) as tempestades com fortes ventos características de Iowa.

O setor de pesquisa em milho híbrido americano possui suas dificuldades em lançar produtos novos no mercado com rendimentos acima dos que eles possuem atualmente. Isso se torna complicado pois os Estados Unidos, na região do cinturão do milho, não possuem mais área novas que estejam disponíveis para agricultores. Dessa forma, é trabalho dos melhoristas a produção de materiais com uma maior produtividade para suprir a demanda sempre crescente do mercado americano e mundial.

A área de melhoramento de plantas irá sempre precisar de novos profissionais capacitados e competentes. A oferta de profissionais dispostos a trabalhar nessa área não supre a demanda nacional e internacional. O processo do melhoramento se torna um exercício

de paciência e persistência, no entanto, para quem gosta da área é algo prazeroso e apaixonante e uma perspectiva profissional interessante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLARD, R. W.; Principle of Plant Breeding. University of California, Davis, CA. Ed John Wiley & Sons, Inc. 1960.

ANDRADE, G. S., ALMEIDA, G. D. & BORÉM, A., 2011. Histórico das Plantas Geneticamente Modificadas. Em: ALMEIDA, G.; BORÉM, A.; (editores) Plantas Geneticamente Modificadas. Desafios e oportunidades para regiões tropicais. Capítulo 1: 13-27.

BERED, F.; BARBOSA NETO, J. F.; CARVALHO, F. I. F.; Marcadores Moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. Revisão bibliográfica. Ciências Rural. Santa Maria, v.27, n. 3, p. 513-520, 1997.

BORÉM, A.; Melhoramento de Plantas, 5 edição, UFV, 2009, 529 p.

CENSO, 2010. Disponível em <http://censusviewer.com/city/IA/Dallas%20Center>. Acesso em 15 de março de 2014

DUPONT PIONEER. Disponível em <http://www.pioneer.com/home/site/about/business/who-we-are/our-heritage/>. Acesso em 15 de março de 2014.

FEHR, W. R.; Principles of cultivar development. Theory and technique. Vol. 1, Iowa State University, 1987.

KOEPPEN, W. Climatologia: Un estudio de los climas de la Tierra. México: Fondo de Cultura Economica. 1948, 478 p.

NATURAL RESOURCES CONSERVATION SERVICE – NRCS - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA 2014.; Disponível em : <http://websoilsurvey.sc.egov.usda.gov/App/WebSoilSurvey.aspx>. Acesso em 20 de março de 2014.

PATERNIANI, E., CAMPOS, M.S., 2005. Melhoramento do Milho. Em: BORÉM, A.; (editor). Melhoramento de Espécies Cultivadas, 2 edição, Viçosa, UFV. Pág: 491-552.

PREFEITURA DE DALLAS CENTER. Disponível em <http://www.dallascenter.com>. Acesso em 15 de março de 2014

SLEPER, D. A.; POEHLMAN, J. M.; Breeding field crops. Fourth Edition, Iowa State University Press, 1995, 494 p.

U. S. CLIMATE DATA, 2013. Disponível em: <http://www.usclimatedata.com/climate/iowa/united-states/3185#>. Acesso em 15 de março de 2014.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA, 2012. **Corn for grain, Production by County for Selected States.** Disponível em:

http://www.nass.usda.gov/Charts_and_Maps/Crops_County/pdf/CR-PR12-RGBChor.pdf.

Acesso em 13 de março de 2014.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA, 2013. **Corn overview**. Disponível em <http://www.ers.usda.gov/topics/crops/corn.aspx#.UzIrcBZc06g>. Última atualização em 16 de maio de 2013. Acesso em 15 de março de 2014.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA, 2014. **Corn trade**. Disponível em <http://www.ers.usda.gov/topics/crops/corn/trade.aspx#.UzIshhZc06g>. Última atualização em 14 de maio de 2014. Acesso em 15 de março de 2014.

VASCONCELOS, M. J. V., CARNEIRO, A.A. & VALICENTE, F. H., 2011. Estudo de Caso em Milho Bt. Em: ALMEIDA, G.; BORÉM, A.; (editores) Plantas Geneticamente Modificadas. Desafios e oportunidades para regiões tropicais. Capítulo 15: 311-332.