

Janeiro e Fevereiro de 1983

VOL. XXX

N.º 167

Viçosa — Minas Gerais

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

INDUÇÃO DE MUTAÇÃO EM MILHO (*Zea mays* L.) OPACO-2 POR RADIAÇÃO GAMA^{1/}

Augusto César Soares Leite ^{2/}

Hélio Moraes Barbosa ^{3/}

Renato Sant'Anna ^{3/}

1. INTRODUÇÃO

Vários pesquisadores (2, 16, 17, 18, 25) tentaram, sem sucesso, eliminar os efeitos adversos do gene *o2* (*opaco-2*), mediante a seleção de endospermas homozigóticos *o2o2o2*, porém com aspecto semelhante ao do milho normal. Nesses trabalhos verificou-se que, à medida que a aparência do endosperma opaco-2 foi melhorada, isto é, modificada para vítreo, o teor de lisina diminuiu. Com base nesses resultados, LEITE e BARBOSA (15) utilizaram, embora também sem sucesso, o mutagênico etil-metanossulfonato na tentativa de induzir mutação que conferisse ao endosperma opaco-2 o aspecto normal.

A indução de mutação por radiação gama tem contribuído para a solução de problemas específicos em várias culturas (13, 19, 20), além de produzir considerável variabilidade genética (9, 23, 24). Com este trabalho, objetivou-se: (a) avaliar os efeitos de diferentes doses da radiação gama sobre plantas e sementes de milho opaco-2 nas gerações R₁, R₂ e R₃ e (b) tentar induzir mutação que modificasse o aspecto do endosperma opaco-2 para normal, vítreo.

^{1/} Parte da tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, pelo primeiro autor, como uma das exigências para a obtenção do grau de *Magister Scientiae*.

Recebido para publicação em 22-1-1982.

^{2/} Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Espírito Santo. 29500 Alegre, ES.

^{3/} Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG. 36570.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Seis grupos de 360 sementes da linhagem de milho de endosperma amarelo '183 opaco-2', com 11% de umidade, foram irradiados com 0 (controle), 5, 10, 15, 20 e 25 Krads de radiação gama, provenientes de uma fonte de ^{60}Co , modelo RL-60, que fornecia dose de 4 Krads/hora, pertencente ao Departamento de Biologia Geral da U.F.V. As sementes irradiadas foram plantadas, no mesmo dia, no campo experimental do Setor de Genética, de acordo com o delineamento experimental em blocos ao acaso, com 6 repetições. Cada parcela constava de duas fileiras de 5,0 m de comprimento cada uma. O espaçamento utilizado foi de 1,0 m entre fileiras e de 0,5 m entre plantas, dentro da fileira, colocando-se 3 sementes por cova. O desbaste foi feito de modo que ficassem dez plantas por fileira, no máximo, eliminando-se a primeira ou as duas primeiras de cada cova, independentemente do aspecto da planta. Entretanto, na presença de falha (s), deixaram-se até duas plantas por cova, a título de compensação. Todas as plantas foram autopolinizadas.

Foram feitas anotações relativas a número de plantas aos 20, aos 40 e aos 60 dias; altura de plantas após a polinização; ocorrência de variantes clorofílianais; ocorrência de variantes morfológicos e ocorrência de sementes com endosperma de aspecto normal, vítreo.

As 174 espigas R₁ sadias colhidas nessa primeira geração foram debulhadas manualmente e suas sementes foram analisadas para determinar a ocorrência de endosperma de aspecto vítreo. Grãos com endosperma de aspecto normal ou quase normal, oriundos de uma mesma espiga, foram plantados numa mesma fileira. As plantas obtidas foram autopolinizadas e suas sementes classificadas de acordo com o padrão do endosperma.

Para obtenção da segunda geração foram plantadas 30 sementes de cada uma das 174 espigas R₁ em fileiras de 5,0 m de comprimento (3 sementes/cova), com espaçamento de 1 m uma da outra e de 50 cm entre covas. Os critérios utilizados na condução do experimento e na coleta de dados foram os mesmos do primeiro plantio; entretanto, para facilitar o controle das plantas, o desbaste foi feito de modo que ficasse apenas uma planta por cova.

Todas as 820 espigas R₂, sadias, obtidas na segunda geração, foram submetidas a uma análise visual, visando à identificação de espigas tidas como parcialmente estéreis. Cada espiga foi debulhada manualmente e suas sementes examinadas, coletando-se dados sobre ocorrência de endosperma defeituoso, endosperma vítreo, mosaicismo e endosperma opaco modificado.

Utilizou-se a metodologia proposta por Briggs (5, 6), com a finalidade de determinar a freqüência de mutação nas gerações R₁ e R₃.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os dados relativos aos efeitos das doses de radiação gama sobre o número médio de plantas por parcela e sobre a altura média de plantas na geração R₁ encontram-se no Quadro 1. Verificou-se redução no número de plantas aos 40 e 60 dias e na altura média de plantas com o aumento das doses de radiação gama. Contudo, diferenças significativas, em relação ao controle, foram encontradas somente para 25 Krads e a partir de 20, 15 e 10 Krads, para número de plantas aos 20, 40 e 60 dias e altura de plantas, respectivamente. Resultados como esses são atribuídos por GAUL (11) aos danos fisiológicos induzidos pelo mutagênico, que incluem, provavelmente, alterações cromossômicas e extracromossômicas. Segundo esse mesmo autor, o aumento das doses dos mutagênicos físicos determina uma redução na altura de plântula e na sobrevivência, decréscimo descrito por uma curva sigmoidéia.

Os efeitos das doses de radiação gama sobre o número de variantes clorofílianais

QUADRO 1 - Influência das doses de radiação gama sobre o número médio de plantas, por parcela, aos 20, 40 e 60 dias, e sobre a altura média de plantas na geração R₁

Doses de radiação gama (Krads)	Número de plantas 1/			Altura de planta (m)
	20 dias	40 dias	60 dias	
0	5,25 a ^{2/}	4,86 a	4,74 a	1,60 a
5	4,95 a	4,53 a	4,42 ab	1,44 ab
10	4,97 a	4,33 a	4,10 ab	1,25 bc
15	5,09 a	3,94 a	3,39 bc	1,24 bc
20	4,54 a	3,76 b	2,63 cd	1,18 bc
25	3,45 b	2,11. b	1,50 d	1,12 c
CV (%)	9,07	16,26	20,47	11,54

1/ Dados transformados, expressos em raiz quadrada.

2/ Em cada coluna, as médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

e morfológicos e sobre o número de variantes que afetam os órgãos reprodutores, com as respectivas percentagens de ocorrência na geração R₁, encontram-se no Quadro 2. Todas as alterações clorofílicas observadas na geração R₁ foram agrupadas sob a designação de «variantes clorofílicas» e incluem planta (s) com folhas lis-tradas, folha superior com listra amarela, folhas verde-claras, deficiência de clorofila nas folhas terminais e folha superior com coloração amarelo-clara na base. Entre os variantes clorofílicas descritos, predominam os que têm listras nas folhas. Contudo, muitos dos variantes clorofílicas apresentaram apenas uma ou duas listras numa única folha. O número e a percentagem de variantes clorofílicas, aos 40 dias, são bem pequenos e representados apenas por duas plantas. Entretanto, foi maior a ocorrência de variantes clorofílicas aos 60 dias. A ausência de variantes clorofílicas para a dose de 25 Krads foi, provavelmente, consequência de danos fisiológicos mais acentuados, que impediram a recuperação das plantas atingidas. De acordo com vários autores, citados por ERIKSSON e LINDGREN (10), a ocorrência de listras e manchas nas folhas pode estar mais estreitamente correlacionada com a mutação genética do que a redução no crescimento ou letalidade de plantas.

Todas as modificações morfológicas identificadas na geração R₁ foram agrupadas sob a designação de «variantes morfológicas». Verifica-se, pelo Quadro 2, que o aumento da dose de radiação gama determinou elevação da percentagem de variantes morfológicas. Essa percentagem também aumentou de acordo com o estádio de desenvolvimento da planta. Esses resultados, provavelmente, são também produzidos por danos fisiológicos determinados pelo mutagênico.

O número de variantes que afetam os órgãos reprodutores (Quadro 2) inclui planta (s) com ausência de pendão, com pendão rudimentar e estéril, com pendão parcialmente estéril, com espiga e pendão fundidos no lugar do pendão normal e com sementes no pendão. A percentagem de variantes que afetam os órgãos reprodutores aumentou de acordo com a dose de radiação gama aplicada. Entretanto, verificou-se a ocorrência de pendão rudimentar e estéril e de sementes no pendão de plantas do controle. Isso indica a existência de variabilidade genética na linhagem utilizada. De fato, foi notada alguma variação fenotípica na planta, na coloração das sementes e no aspecto dos endospermas provenientes de sementes não tratadas. Com relação aos variantes induzidos, foram possivelmente determinados por danos fisiológicos do mutagênico.

Dados sobre a influência de diferentes doses de radiação gama sobre as freqüências de espigas com endosperma defeituoso, esterilidade e sementes com endosperma normal, vítreo, encontram-se no Quadro 3. Verificou-se maior freqüência de espigas com endosperma defeituoso com todas as dosagens, em relação ao controle, indicando, claramente, que a radiação gama induz mutação para essa característica. Entretanto, essa freqüência não apresentou tendência crescente, conforme as doses utilizadas. A morte ou eliminação de células iniciais mutadas, que se verifica com altas dosagens de radiação, como proposto por Gaul, citado por ANDO (1), o aumento de esterilidade, causada por aberrações cromossômicas, verificado por Matsuo *et alii*, citados por esse mesmo autor, ou o desbaste indiscriminado de plantas durante a condução do experimento poderiam explicar esses resultados. Contudo, a percentagem dessas espigas no controle foi relativamente elevada, em consequência, provavelmente, da variabilidade genética na linhagem ou dificuldades de classificação.

O aumento da percentagem de esterilidade (Quadro 3) não apresentou tendência crescente, conforme o aumento das doses de radiação gama utilizadas. Entretanto, as percentagens de esterilidade, em relação ao controle, indicam indução de mutação para essa característica. A explicação para esses resultados é a mesma do caso anterior. Translocações e deficiências induzidas por radiação na geração R₁ são as principais causas da esterilidade (12). Gaul e Mittelstenscheid, cita-

QUADRO 2 - Efeito das doses de radiação gama sobre o número de variantes clorofílianoss e morfológicos, aos 40 e 60 dias, e sobre o número de variantes que afetam os órgãos reprodutores (espiga e pendão), aos 100 dias, com respectivas % de ocorrência na geração R₁

Doses de radiação gama (Krads)	Número e % de variantes clorofílianoss		Número e % de variantes morfológicos	Número e % de variantes que afetam os órgãos reprodutores
	40 dias	60 dias		
0	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
5	0 (0,00%)	2 (1,80%)	1 (0,87%)	1 (0,90%)
10	0 (0,00%)	5 (4,90%)	2 (1,75%)	7 (6,86%)
15	1 (1,01%)	2 (2,56%)	5 (5,05%)	19 (24,36%)
20	1 (2,08%)	2 (4,54%)	11 (22,92%)	16 (36,36%)
25	0 (0,00%)	0 (0,00%)	12 (44,44%)	10 (71,43%)
				2 (28,57%)

QUADRO 3 - Influência de diferentes doses de radiação gama sobre o número e freqüência de endosperma defeituoso, esterilidade e sementes normais nas gerações R₁ e R₃

Doses de radiação gama (Kradis)	Número de espigas R ₂ com endosperma defeituoso esterilizado 1/ normais ^{2/}	Número de espigas sadias colhidas	% de ocorrência de espigas com					
			end. defeituoso esterilidade			sem. com endosperma vítreo		
			R ₁	R ₂	R ₁	R ₃	R ₁	R ₃
0	11	3	16	67	316	16,42	3,48	0,95
5	14	5	1	42	186	33,33	7,53	11,90
10	16	14	7	38	170	42,10	9,41	36,84
15	9	8	1	19	103	47,37	8,74	42,10
20	2	1	1	7	37	28,57	5,40	14,28
25	1	1	1	1	8	100,00	12,50	100,00

1/ Espigas com 50% ou 25% de esterilidade.

2/ Sementes com endosperma vítreo.

dos por GAUL (12), apresentam evidências de que essa esterilidade é transferida para as gerações seguintes. Variabilidade genética ou dificuldades na classificação, possivelmente, foram os fatores responsáveis pela ocorrência de esterilidade no controle.

No Quadro 3 encontram-se também dados relativos ao número e à percentagem de ocorrência de espigas com pelo menos uma semente com endosperma normal, vítreo. A análise visual das sementes não foi suficiente para identificar possíveis contaminações por pólen estranho, tendo em vista que a linhagem utilizada neste experimento apresentava endosperma amarelo. A ocorrência de sementes normais amarelas no controle é, provavelmente, resultante de variabilidade genética na linhagem e/ou de contaminações. É importante citar que em plantas do controle foram identificadas espigas segregantes com sementes de totalmente normais a completamente opacas. Embora a percentagem de mutação para o tratamento com 25 Krads seja de 100% na geração R₁, esse valor refere-se a uma única espiga com sementes normais. Os resultados obtidos não indicam que a radiação gama esteja induzindo mutação que modifique o fenótipo das sementes de opaco para normal, vítreo. Contudo, é possível que haja sementes com endosperma vítreo em consequência da radiação.

Sementes normais ou quase normais foram obtidas de seis espigas R₁. As sementes R₃ provenientes de duas dessas espigas eram todas uniformemente opacas. Isso não era esperado e indica que mecanismos ainda não conhecidos podem modificar a expressão fenotípica do gene *opaco-2*. As quatro espigas restantes apresentaram segregação acentuada, com sementes uniformemente opacas, opacas modificadas, mosaicas e normais, embora nem sempre todas essas classes estivessem presentes numa mesma espiga.

Dados relativos à influência de diferentes doses de radiação gama sobre o número e percentagem de mutantes clorofílianos e morfológicos encontram-se no Quadro 4. Essas duas classes compreendem plantas com folhas listradas, plantas albinas e plantas verde-amareladas; plantas perfilhadas, plantas com folhas mais largas que o normal, plantas com folhas largas e de menor comprimento, planta anã, com internódios curtos, plantas pequenas e com folhas estreitas e pequenas, plantas com folhas irregulares e enroladas e plantas pouco desenvolvidas, com folhas estreitas e longas, respectivamente.

O mutante clorofílico identificado no controle apresenta listra amarela em uma única folha, possivelmente em consequência de mutação espontânea na linhagem. Os dois mutantes clorofílicos restantes, para o levantamento referente aos 25 dias, compreendem plantas albinas e plantas verde-amareladas. Embora nenhuma análise citológica tenha sido realizada, é provável que aberrações cromossônicas estejam envolvidas na sua origem. Há evidência de que as mutações induzidas no milho pela radiação gama sejam provenientes, principalmente, de aberrações cromossômicas (3, 7, 8, 14, 21). Segundo SINGLETON (22), pelo menos 99% dos mutantes induzidos por radiação em milho, durante 15 anos de pesquisa no Laboratório Brookhaven e na Blandy Experimental Farm, Estados Unidos, eram de natureza cromossômica e deletéria. A diferença na percentagem de mutantes clorofílicos dos 25 para os 45 dias deve-se à morte ou recuperação de plantas e à identificação de outro mutante nas observações feitas aos 45 dias. Os dados obtidos até os 25 dias indicam que a radiação gama talvez esteja aumentando a percentagem de mutantes morfológicos. Entretanto, não há evidência de que isso tenha ocorrido aos 45 dias, exceto quando foram utilizados 20 Krads de radiação gama. A diferença entre as percentagens de mutantes morfológicos aos 25 e aos 45 dias deve-se, provavelmente, à morte natural de plantas e ao aparecimento de novos mutantes nesse período. Variabilidade genética na linhagem ou efeitos do ambiente são, provavelmente, as causas das percentagens relativamente eleva-

QUADRO 4 - Número de mutantes e de espigas e percentagens de mutação nas gerações R_1 e R_2 em função das diferentes doses de radiação gama

Doses de radiação gama (Krads)	Número de mutantes na geração R_2 até os 25 dias			Número de mutantes na geração R_2 aos 45 dias			Número de espigas saídas colhidas			% mutantes até os 25 dias			% mutantes aos 45 dias			
	Clorofílianos	Morfológicos	Clorofílianos	Morfológicos	Clorofílianos	Morfológicos	R_1	R_2	R_1	R_2	R_1	R_2	R_1	R_2	Clorofílianos	Morfológicos
0	1	5	0	6	67	316	1,49	0,32	7,46	1,58	0,00	0,00	8,95	1,90		
5	1	6	1	1	42	186	2,38	0,54	14,28	3,22	2,38	0,54	2,38	0,54		
10	0	5	0	3	38	170	0,00	0,00	13,16	2,94	0,00	0,00	7,89	1,76		
15	0	2	0	1	19	103	0,00	0,00	10,53	1,94	0,00	0,00	5,26	0,97		
20	1	2	0	1	7	37	14,28	2,70	28,57	5,40	0,00	0,00	14,28	2,70		
25	0	0	0	0	1	8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		

1/ Percentagem determinada em função do número de espigas R_1 .2/ Percentagem determinada em função do número de espigas R_2 .

das de mutantes morfológicos nas plantas do controle. Como os dados coletados foram obtidos de plantas R_2 individuais, é possível que alguns dos supostos mutantes morfológicos dos tratamentos sejam, na realidade, consequência de efeitos do ambiente. O ideal seria plantar as sementes das plantas selecionadas por mais uma geração, para verificar se as características sob seleção se manifestam. Nesse caso, as novas observações seriam feitas tomando por base progénies, e não plantas individuais, descartando-se, assim, o efeito do ambiente. Considerações dessa natureza foram feitas por VEIGA *et alii* (26).

A faixa de radiação gama recomendada para indução de mutação no material experimental utilizado, possivelmente, encontra-se entre 5 e 20 Krads. Entretanto, convém ter em mente que diferentes genótipos podem apresentar respostas diferentes a tratamentos com agentes mutagênicos (4).

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Sementes de milho da linhagem '183 opaco 2' foram submetidas a seis diferentes doses de radiação gama (0, 5, 10, 15, 20 e 25 Krads), com os seguintes objetivos: (a) avaliar os efeitos de diferentes doses de radiação gama sobre plantas e sementes de milho opaco-2 e (b) tentar induzir mutações que modificassem o aspecto do endosperma para normal, vítreo.

O aumento das doses de radiação gama causou redução no número e da altura média de plantas e afetou severamente o fenótipo das plantas R_1 .

A frequência de espigas com sementes que apresentavam endosperma defeituoso, bem como a percentagem de esterilidade, foi maior nas progénies de sementes tratadas, em comparação com o controle. Entretanto, essas características não foram influenciadas em intensidade proporcional às dosagens de radiação.

Não houve indicação de que o aspecto opaco do endosperma tivesse sido modificado para normal, vítreo, em consequência das radiações. Entretanto, é clara a evidência de que há sistemas genéticos desconhecidos capazes de modificar marcadamente a expressão do gene *opaco-2*.

Na linhagem utilizada, a dosagem de radiação gama recomendada para indução de mutação encontra-se na faixa de 5 a 20 Krads.

5. SUMMARY

Seeds of the maize inbred '183 opaque-2' were treated with 0 (control), 5, 10, 15, 20 and 25 Krads of gamma rays with the following objectives: (a) to evaluate the effects of different doses of seed irradiation on plants and seeds of opaque-2 maize; and, (b) to attempt to induce mutations which modify the opaque endosperm phenotype to vitreous, translucent.

In general, the increase in radiation dose caused reduction in number and height of plants and severely affected the plant phenotype. The frequency of ears with defective endosperm seeds and of ears exhibiting sterility increased with increased doses of radiation.

There was no evidence that gamma rays induced mutation to vitreous endosperm. There seemed to exist modifier genes segregating in the material used which severely affected the function of the *opaque-2* gene. These modifiers were probably mainly responsible for the occurrence of seeds with vitreous endosperm on ears derived from treated as well as from untreated seeds. Contamination by stray pollen should not be discounted.

The dosage of gamma rays for mutation induction in the material used is in the range of 5 to 20 Krads.

6. LITERATURA CITADA

1. ANDO, A. *Efeito biológico da combinação de tratamentos com raios-gama, cisteína e algumas substâncias alquilantes sobre sementes de arroz*. E.S.A.L.Q., Piracicaba, 1970. 117 p. (Tese de Doutorado).
2. BARREIRO NETO, M. *Seleção para alta e baixa densidade das sementes de milho (Zea mays L.) opaco-2 e seu efeito sobre caracteres agronómicos e teores de proteína e lisina*. U.F.V., Viçosa, 1978. 51 p. (Tese de Mestrado).
3. BASUDEO, V., CASPAR, A. & SINGLETON, W.R. Genetic effects of cobalt-60 radiation on proembryos of corn. *Genetics* 48:914-1963.
4. BOROJEVIC, K. Differences depending on the genotype. In: *Manual on Mutation Breeding*. Vienna, Int. Atom. Energy Ag., 1970. p. 125-126.
5. BRIGGS, R.W. Induction of endosperm mutation in maize with ethyl methane sulfonate. *Maize Genet. Coop. News Lett.* 43:23-31. 1969.
6. BRIGGS, R.W. Further studies on induction of endosperm mutations in maize with ethyl methanesulfonate. *Maize Genet. Coop. News Lett.* 44:11-17. 1970.
7. CASPAR, A.L. Dominant phenotype induced in homozygous recessive proembryos by gamma radiation. *Pl. Breed. Abstr.* 37:438, 1967.
8. CASPAR, A.L. & SINGLETON, W.R. Mutation induced during maize microsporogenesis. *Genetics* 47:946-947. 1962.
9. CONGER, B.V., SKINNER, L.W. & SKOLD, L.N. Variability for components of yield induced in soybeans by seed treatment with gamma radiation, fission neutrons, and ethylmethane sulfonate. *Crop Sci.* 16:233-236. 1976.
10. ERIKSSON, G. & LINDGREN, D. Chimeras. In: *Manual on Mutation Breeding*. Vienna, Int. Atom. Energy Ag., 1970. p. 99-104.
11. GAUL, H. Plant injury and lethality. In: *Manual on Mutation Breeding*. Vienna, Int. Atom. Energy Ag., 1970. p. 85-90.
12. GAUL, H. Sterility. In: *Manual on Mutation Breeding*. Vienna, Int. Atom. Energy Ag., 1970. p. 95-99.
13. KIVI, E.I., REKUNEN, M. & VARIS, E. Use of induced mutations in solving problems of Northern Crop Production. In: *Polyplody and Induced Mutations in Plant Breeding*. Vienna, Int. Atom. Energy Ag., 1974. p. 187-194.
14. KONZAK, C.F. & SINGLETON, W.R. The mutation of linked maize endosperm loci induced by thermal-neutron, X-, gamma, and ultraviolet radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 42:239-245. 1956.
15. LEITE, A.C.S. & BARBOSA, H.M. Indução de mutação em milho (*Zea mays* L.) opaco-2 por etil-metanossulfonato. *Rev. Ceres* 29:210-211. 1982.
16. PAEZ, A.V., HELM, J.L. & ZUBER, M.S. Lysine content of opaque-2 maize kernels having different phenotypes. *Crop Sci.* 9:251-252. 1969.

17. PINTO, R.F.S. & BARBOSA, H.M. Seleção visual para endosperma de milho (*Zea mays* L.) opaco-2 de diferentes fenótipos. *Rev. Ceres* 23:281-287. 1976.
18. PINTO, R.F.S., BARBOSA, H.M. & ALMEIDA FILHO, J. Seleção para diferentes densidades das sementes em milho (*Zea mays* L.) opaco-2. *Experientiae* 18:41-58. 1974.
19. SIGURBJORNSSEN, B. Induced mutations in plants. *Sci. Amer.* 224:86-95. 1971.
20. SIGURBJORNSSEN, B. & MICKE, A. Progress in mutation Breeding. In: *Induced Mutation in Plants*. Vienna, Int. Atom. Energy Ag., 1969. p. 673-698.
21. SINGLETON, W.R. The effect of chronic gamma radiation on endosperm mutations in maize. *Genetics* 39:587-603. 1954.
22. SINGLETON, W.R. A population genetics study of mutations induced in maize seeds. *Genetics* 52:475. 1965.
23. SPARROW, A.H. & SINGLETON, W.R. The use of radiocobalt as a source of gamma rays and effects of chronic irradiation on growing plants. *Am. Nat.* 87: 29-48. 1953.
24. TANAKA, S. Some useful mutations induced by gamma irradiation in rice. In: *Induced Mutation in Plants*. Vienna, Int. Atom. Energy Ag., 1969. p. 517-527.
25. VASAL, S.K. Use of genetic modifiers to obtain normal-type kernels with the opaque-2 gene. In: *High-quality protein maize*. Dowden, Hutchinson & Ross, Inc., Stroudsburg, Pennsylvania. p. 197-216. 1975.
26. VEIGA, A. A., CAMARGO, C.E.O., FELICIO, J., TULMANN NETO, A., ANDO, A. & BARROS, B.C. Indução de mutação no melhoramento do trigo. In: *Trabalho apresentado na IX RACPET*. Londrina, PR, 1977. 13 p.