

## INDUÇÃO DE MUTAÇÃO EM MILHO (*Zea mays* L.) OPACO-2 POR ETIL-METANOSSULFONATO<sup>1/</sup>

Augusto César Soares Leite<sup>2/</sup>  
Hélio Morais Barbosa<sup>3/</sup>

### 1. INTRODUÇÃO

A descoberta de que o gene *opaco-2* ( $o_2$ ) aumenta substancialmente os teores de lisina (15) e triptófano (17) no endosperma do milho despertou o interesse de geneticistas e melhoristas, que se preocupam com a melhoria da qualidade da proteína do milho.

O melhor valor nutritivo do milho *opaco-2*, em comparação com o milho normal, foi verificado em dieta de ratos (16), suínos (19) e pessoas (3, 8, 11). Foram então iniciados, em vários países, programas de introdução do gene  $o_2$  em variedades e híbridos comerciais. Entretanto, com a transferência do gene  $o_2$ , a população resultante apresenta várias características indesejáveis.

Possivelmente, as características indesejáveis do milho *opaco-2* poderiam ser eliminadas mediante a seleção para endospermas homozigóticos  $o_2o_2o_2$ , porém com aspecto semelhante ao do milho normal. Tentativas de obtenção de milho *opaco-2* com aparência semelhante à do milho normal e com elevado teor de lisina (1, 18, 21, 22, 23, 25) não apresentaram sucesso. Em geral, à medida que a aparência do endosperma *opaco-2* é melhorada, isto é, modificada para vítrea, o teor de lisina diminui. É importante notar que os esforços realizados para eliminar os efeitos indesejáveis do gene  $o_2$  têm sido feitos com a utilização da variabilidade genética natural disponível.

---

<sup>1/</sup> 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 9-10-1981.

<sup>2/</sup> Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Espírito Santo. 29500 Alegre, ES.

<sup>3/</sup> Departamento de Biologia Geral da U.F.V. 36570 Viçosa, MG.

Os autores não têm conhecimento de nenhum pesquisador que tenha tentado induzir a variabilidade genética necessária, com vistas à solução dos problemas apresentados pelo milho opaco-2.

Este trabalho teve os seguintes objetivos: (a) avaliar os efeitos de diferentes concentrações de etil-metanossulfonato (EMS) sobre plantas e sementes de milho opaco-2, nas gerações  $M_1$ ,  $M_2$  e  $M_3$ ; (b) tentar induzir mutações que modificassem o aspecto de endospermas homozigóticos  $o_2o_2o_2$ , de opaco para normal, vítreo; (c) estabelecer a faixa de concentração de EMS mais eficiente para a indução de mutação em milho opaco-2.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Seis grupos de 240 sementes de uma variedade de milho opaco-2 branco (Opaco-2 Colombiano) foram colocados, cada um, em embebição em erlenmeyer de 250 ml, que continha 160 ml de água desionizada, e mantidos em temperatura ambiente durante 5 horas. Nesse período foram feitas duas trocas de água, uma aos 30 minutos e outra 2 horas após a primeira. Terminado o pré-embebição, cada grupo de sementes foi transferido para erlenmeyer de 500 ml, com 160 ml de solução de EMS em tampão fosfato (0,02 M, pH 7,5). As concentrações de EMS utilizadas foram: O (controle); 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 e 1%. O cálculo das concentrações obedeceu a uma relação volumétrica. A boca dos frascos foi coberta com «Parafilm»; a seguir, esses frascos foram adaptados a um agitador Burrell Wrist-Action, e agitados, à temperatura ambiente, durante 8 horas.

Após o tratamento, cada grupo de sementes foi embalado em saquinho de filó e lavado n'água corrente durante 3 horas. Terminada a lavagem, as sementes foram transferidas, imediatamente, para o campo experimental do Setor de Genética da Universidade Federal de Viçosa e plantadas, ainda molhadas. Foram plantadas 2 sementes por cova, em fileiras de 5,0 m de comprimento, utilizando espaçamento de 1,0 m entre fileiras e de 0,5 m entre plantas dentro da fileira. Duas fileiras de cada tratamento constituíram uma parcela. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, com 6 repetições. Cinquenta dias após o plantio, aproximadamente, foi feito o desbaste, de modo que ficassem dez plantas por fileira, no máximo. Com o desbaste foi eliminada a primeira ou as duas primeiras plantas encontradas em cada cova, independentemente do aspecto da planta.

As plantas obtidas foram autofecundadas. Foram anotados dados sobre: número de plantas aos 20 e aos 40 dias; altura de plantas após a polinização; ocorrência de variantes clorofilianas; ocorrência de variantes morfológicas e ocorrência de sementes com endosperma de aspecto normal, vítreo. Excetuando os dados referentes a número de plantas, os demais foram registrados para cada planta, individualmente. Após a colheita, foram descartadas todas as espigas podres. As 170 espigas remanescentes foram debulhadas manualmente e suas sementes foram examinadas para verificar a ocorrência de endosperma de aspecto vítreo. Grãos que continham endosperma de aspecto normal ou quase normal, provenientes de uma mesma espiga, foram plantados numa mesma fileira. As plantas resultantes foram autopolinizadas e as sementes produzidas foram classificadas de acordo com o aspecto do endosperma. Adicionalmente, trinta sementes de cada uma das espigas  $M_1$  foram plantadas (3 sementes/cova) em fileira com a mesma dimensão e espaçamento adotados na primeira geração. Intercalou-se uma fileira do controle entre 4 fileiras de cada tratamento, até completá-lo.

O desbaste das plantas da segunda geração foi feito mais ou menos 50 dias depois do plantio, de modo que ficasse apenas 1 planta por cova, independente-

mente do número de plantas por fileira. O critério para o desbaste foi o mesmo adotado no primeiro plantio.

As plantas foram autopolinizadas, e o sistema de coleta de dados obedeceu ao mesmo critério anterior.

Foram colhidas 668 espigas  $M_2$  sadias. Inicialmente, foi feita análise visual desse material para identificação das espigas suspeitas de apresentarem esterilidade parcial. Em seguida, as espigas foram debulhadas manualmente e as sementes resultantes de cada espiga foram examinadas, sendo coletados dados sobre ocorrência de endosperma defeituoso, endosperma vítreo, mosaicismo e endosperma opaco modificado.

Para determinar a frequência de mutação nas gerações  $M_1$  e  $M_3$ , adotou-se a metodologia descrita por BRIGGS (4, 5). Segundo essa metodologia, uma semente  $M_1$  (semente tratada com o mutagênico) é plantada e produz uma planta  $M_1$ . Essa planta  $M_1$  é autopolinizada e produz espigas  $M_1$  com sementes  $M_2$ . As sementes  $M_2$  dão origem a plantas  $M_2$ , que são autopolinizadas e produzem espigas  $M_2$  com sementes  $M_3$ . Os mutantes resultantes do tratamento de sementes  $M_1$  com o mutagênico segregarão na geração de sementes  $M_3$ . Para obter a frequência de mutação  $M_1$ , o número de mutações que ocorreram independentemente é dividido pelo número de espigas  $M_1$ . De modo similar, a frequência de mutação  $M_3$  é obtida dividindo-se o número de mutações que ocorreram independentemente pelo número de espigas com sementes  $M_3$ .

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Quadro 1 contém dados referentes à influência das concentrações de EMS sobre o número médio de plantas, por parcela, aos 20 e aos 40 dias, e sobre a altura média de plantas, na geração  $M_1$ . De modo geral, o aumento da concentração de EMS determinou redução do número e da altura média de plantas. Entretanto, até 0,25%, o número de plantas não diferiu significativamente do encontrado para o controle, aos 20 ou 40 dias, ao passo que a altura foi significativamente reduzida, também em relação ao controle, a partir de 0,125%. A redução do número de plantas e da altura média de plantas foi mais acentuada nas concentrações mais elevadas, ocasionada pelos danos fisiológicos induzidos pelo mutagênico. O termo 'dano fisiológico' é mais descritivo que indicativo da origem das mudanças biológicas induzidas. O dano fisiológico tem, provavelmente, origem cromossômica e extracromossômica (10). O comportamento observado já era previsto, porque o efeito do aumento da dose dos mutagênicos físicos e químicos sobre altura da planta e sobrevivência é descrito por uma curva sigmóide (10). Resultados similares foram encontrados, em soja, por CONSTANTIN *et alii* (9).

Em várias parcelas do tratamento com EMS a 1% não havia nenhuma planta por ocasião da coleta de dados referentes à altura de planta e, por isso, esse tratamento foi desconsiderado para efeito de análise (Quadro 1).

Dados sobre o número de variantes clorofilianos e morfológicos e respectivas percentagens de ocorrência na geração  $M_1$ , encontram-se no Quadro 2. O termo utilizado, 'variantes clorofilianas', inclui todas as alterações clorofilianas observadas no campo, tais como folhas verde-claras, folhas com manchas verdes e claras distribuídas irregularmente, folhas com listras amarelas, com listras brancas e com listras amarelas e brancas simultaneamente, etc. O número de variantes clorofilianas aos 20 dias é bem pequeno, quando comparado com o encontrado aos 40 e 80 dias. Esses resultados indicam, possivelmente, uma manifestação retardada dos efeitos induzidos. Interpretação similar a essa foi feita por CHATTERJEE *et alii* (6,

QUADRO 1 - Influência das concentrações de EMS sobre o número médio de plantas, por parcela, aos 20 e aos 40 dias, e sobre a altura média de plantas, na geração  $M_1^{1/}$

Concentração de EMS (%)	Número de plantas $1/$		Altura de planta (m)
	20 dias	40 dias	
0	4,29 ab $2/$	4,25 ab	1,37 a
0,0625	4,51 a	4,38 a	1,21 ab
0,1250	4,25 ab	4,12 abc	0,99 bc
0,2500	3,74 bc	3,58 bc	0,82 c
0,5000	3,51 c	3,43 c	0,50 c
1,0000	2,72 d	1,74 d	—
CV (%)	8,87	11,60	13,77

$1/$  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.

QUADRO 2 - Efeito das concentrações de EMS sobre o número de variantes clorofilianos e morfológicos, aos 20, 40 e 80 dias, e respectivas percentagens de ocorrência na geração  $M_1$

Concentração de EMS (%)	Número e % de variantes clorofilianos			Número e % de variantes morfológicos		
	20 dias	40 dias	80 dias	20 dias	40 dias	80 dias
0 (controle)	0 (0,00%)	1 (0,92%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
0,0625	1 (0,82%)	15 (12,93%)	6 (5,77%)	0 (0,00%)	11 (9,48%)	21 (20,19%)
0,1250	1 (0,92%)	27 (26,21%)	15 (15,46%)	2 (1,83%)	8 (7,77%)	26 (26,80%)
0,2500	1 (1,19%)	35 (44,87%)	17 (22,67%)	2 (2,38%)	9 (11,54%)	30 (40,00%)
0,5000	0 (0,00%)	27 (37,50%)	8 (14,28%)	4 (5,33%)	10 (13,89%)	23 (41,07%)
1,0000	1 (2,22%)	1 (5,00%)	0 (0,00%)	6 (13,33%)	1 (5,00%)	2 (66,66%)

7), porém, para a predominância de quimeras resultantes do tratamento, com EMS, de grãos de pólen e proembriões portadores de genes marcadores. O decréscimo no número de variantes clorofilianas dos 40 para os 80 dias talvez tenha sido consequência da morte natural de plantas, causada por deficiência no sistema clorofiliano, e/ou ao desbaste feito entre esses 2 períodos. O aumento da concentração do mutagênico até 0,25% determinou a elevação da frequência de variantes clorofilianas (Quadro 2). A redução observada a partir dessa concentração é, provavelmente, causada por danos fisiológicos severos, que impedem a recuperação de variantes clorofilianas.

O termo 'variantes morfológicas' inclui todas as alterações morfológicas observadas, tais como folhas enroladas, folhas enrugadas, folhas estreitas e alongadas, perfilhamento de plantas, ausência de pendão, etc. Os resultados referentes à frequência de variantes morfológicas (Quadro 2) mostram que, de modo geral, os danos fisiológicos são acentuados, com o aumento das concentrações e do estágio de desenvolvimento da planta.

No Quadro 3 encontram-se os dados alusivos à frequência de espigas com endosperma defeituoso, de esterilidade e de sementes com endosperma vítreo. A frequência de espigas com endosperma defeituoso nas gerações  $M_1$  e  $M_3$  aumentou com o acréscimo das concentrações de EMS. Entretanto, as percentagens de mutação no controle foram consideravelmente elevadas. Esses valores, possivelmente, são resultantes, em grande parte, da variabilidade genética da variedade utilizada. As autofecundações realizadas permitiram que genes recessivos se manifestem. O ideal seria usar uma linhagem no lugar da variedade utilizada, o que favoreceria consideravelmente a coleta de dados, para todos os caracteres em estudo, graças à maior uniformidade.

Quanto à frequência de espigas com esterilidade nas gerações  $M_1$  e  $M_3$  (Quadro 3), não houve preocupação em separá-las nas classes de 1/4 ou 1/2 estéril, como foi feito por BRIGGS (4, 5). Para concentrações do mutagênico mais ou menos equivalentes, os valores obtidos são consideravelmente mais elevados que os encontrados por esse autor. Entretanto, utilizou-se uma variedade, ao passo que Briggs utilizou uma linhagem. Além disso, é possível que se tenha adotado maior rigor na coleta dos dados. Consequentemente, espigas consideradas de esterilidade parcial neste experimento podem não tê-lo sido no de Briggs. Outro aspecto que deve ser considerado é que vários fatores podem influenciar a produção de mutação antes, durante ou após o tratamento com o mutagênico químico. Dentre eles, os íons metálicos, como  $Zn^{++}$  e  $Cu^{++}$ , aumentam consideravelmente a frequência de aberrações cromossômicas induzidas (12). Esse aumento, conseqüentemente, contribuiria para a elevação da percentagem de esterilidade. Contudo, não se sabe se a ocorrência desses íons é alta ou baixa no local onde o experimento foi realizado, porque não foi feita nenhuma análise nesse sentido.

Quanto ao número e frequência de espiga com pelo menos uma semente com endosperma vítreo (Quadro 3), a utilização de uma variedade opaco-2 com endosperma branco facilitou consideravelmente a identificação de sementes resultantes de contaminações com pólen estranho. O endosperma das sementes utilizadas nos experimentos próximos apresentavam cor amarela, que é dominante sobre a branca. Entretanto, não se pode descartar a possibilidade de contaminação com pólen proveniente de um pequeno número, não conhecido, de plantas heterozigóticas para endosperma branco. Assim, contaminações oriundas de pólen estranho eram, em sua maioria, detectadas e eliminadas. Sementes com endosperma branco, vítreo, no controle, podem ser resultantes de variabilidade genética existente na variedade e/ou de contaminação com pólen estranho. Não há evidência de que o EMS esteja induzindo mutação que modifique o fenótipo do endosperma do milho opaco-2 para normal, vítreo. Progenies dessas sementes que apresentaram endosperma vítreo

QUADRO 3 - Influência de diferentes concentrações de EMS sobre número e frequência de endospermas defeituosos, esterilidade e sementes com endosperma vítreo, nas gerações  $M_1$  e  $M_3$

Concentração de EMS (%)	Número de espigas $M_2$ com			Número de espigas sadias colhidas			% de ocorrência de espigas com					
	Endosperma defeituoso			Endosperma defeituoso			Endosperma defeituoso			Esterilidade		
	Endosperma defeituoso	Esterilidade	Sementes normais/mais <sup>2/</sup>	$M_1$	$M_2$		$M_1$	$M_3$		$M_1$	$M_3$	Sementes com endosperma vítreo
0 (controle)	22	11	11	61	263		36,06	8,36	18,03	4,18	18,03	4,18
0,0625	26	18	10	54	218		48,15	11,93	33,33	8,26	18,52	4,59
0,1250	27	18	05	36	142		75,00	19,01	50,00	12,68	13,89	3,52
0,2500	12	10	02	18	043		66,67	27,91	55,55	23,35	11,11	4,65
0,5000	01	01	01	01	002		100,00	50,00	100,00	50,00	0,00	0,00
1,0000	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-

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

2/ Espigas com endosperma vítreo.

foram obtidas por PRIOLI *et alii* (24) e produziram sementes com endospermas opacos e/ou opacos modificados. Esses autores concluíram que o tratamento com EMS não originou sementes vítreas e que há sistemas genéticos não identificados que modificam severamente a expressão do gene *o2*.

Na geração de plantas  $M_1$  foram selecionadas sementes de 4 espigas, com endosperma vítreo ou quase vítreo. As sementes  $M_3$  provenientes de uma dessas 4 espigas foram classificadas com dificuldade, pois seu fenótipo variava de opaco uniforme a normal. É possível que isso tenha sido consequência da ação de genes modificados sobre o efeito do gene *o2*. Essas alterações fenotípicas em endosperma de milho opaco-2 são relativamente frequentes e já foram observadas por vários pesquisadores (1, 20, 25). As sementes  $M_3$  provenientes de outra espiga apresentavam endospermas mosaicos, isto é, com áreas opacas e vítreas distribuídas uniformemente por todo o endosperma. Como foi estabelecido por McCLINTOCK (14) e verificado em vários trabalhos (6, 7, 13), o mosaicismo pode surgir como consequência de um ciclo típico de quebra-fusão-ponte. É possível que esse mecanismo esteja envolvido nesse caso. Finalmente, as sementes com endosperma vítreo ou quase vítreo selecionadas nas 2 espigas  $M_1$  restantes não germinaram.

As percentagens de mutantes clorofilianos e morfológicos nas gerações  $M_1$  e  $M_3$  são apresentadas no Quadro 4. A classe de mutantes clorofilianos é constituída por plantas com áreas verdes e brancas nas folhas, plantas com listras amarelas nas folhas, plantas verde-claras e plantas albinas. A ocorrência de plantas albinas no controle indica segregação de gene(s) para albinismo na variedade utilizada. O número de mutantes clorofilianos aos 60 dias foi sensivelmente reduzido pela morte da maioria nesse período de tempo. Ao que tudo indica, excetuando as plantas albinas, que fatalmente não sobreviveriam, as mutações que afetam o sistema clorofiliano, de modo geral, também reduzem o vigor das plantas, acarretando sua morte.

Os mutantes morfológicos (Quadro 4) identificados e descritos na geração  $M_2$  incluem plantas com folhas enrugadas, plantas com folhas superiores presas às inferiores, plantas perfilhadas, plantas de pequeno porte com folhas bem mais largas que o normal, e plantas com folhas trifurcadas. A percentagem de mutantes morfológicos até 30 dias apresentou comportamento irregular, em relação aos 60 dias. Não há evidência de que o EMS esteja aumentando a percentagem desses mutantes aos 30 dias. Contudo, a percentagem de mutantes morfológicos aos 60 dias tende a aumentar com o aumento da concentração de EMS até 0,25%.

Não constam do Quadro 4 dados referentes a mutantes clorofilianos e morfológicos para tratamento com EMS a 0,5 e 1%. Isso, certamente, deve-se a danos fisiológicos mais acentuados nessas concentrações, tendo em vista que somente 1 espiga  $M_1$  foi colhida no tratamento com EMS a 0,5% e nenhuma foi colhida no tratamento com 1%.

Os resultados indicam que a faixa de concentração de EMS para indução de mutação na variedade 'Opaco-2 Colombiano' provavelmente se encontra entre 0,0625 e 0,25%. Se fosse tomada como base a faixa de  $LD_{30}$  (dose letal 30%) a  $LD_{50}$ , em relação ao número de plantas aos 40 dias (Quadro 1), essa faixa estaria, aproximadamente, entre 0,25 e 1%. Entretanto, a concentração do mutagênico que determina a  $LD_{50}$  já é muito elevada, tendo em vista que no tratamento com EMS a 0,5% (Quadro 3) apenas 1 espiga  $M_1$  foi colhida. Por outro lado, com o EMS a 0,0625%, as percentagens de variantes clorofilianas e morfológicas (Quadro 2), de endosperma defeituoso e de esterilidade (Quadro 3), de mutantes clorofilianos e morfológicos (Quadro 4), de modo geral, foram consideravelmente mais elevadas que no controle, justificando sua inclusão na faixa recomendada. Entretanto, dever ser levado em consideração que, de acordo com BOROJEVIC (2), a resposta ao mutagênico é muito influenciada pelo genótipo do organismo tratado. Há diferenças de resposta ao

QUADRO 4 - Número de mutantes e de espigas e percentagens de mutação, nas gerações  $M_1$  e  $M_2$ , em função das diferentes concentrações de EMS

Concentração de EMS (%)	Número de mutantes na geração $M_2$ , até os 30 dias		Número de mutantes na geração $M_2$ , aos 60 dias		Número de espigas sadias colhidas		% de mutantes até 30 dias		% de mutantes até 60 dias	
	Clorofilianos	Morfológicos	Clorofilianos	Morfológicos	$M_1$	$M_2$	Clorofilianos		Clorofilianos	
							$M_1$	$M_2$	$M_1$	$M_2$
0 (controle)	4	3	-	2	61	263	6,56	1,52	4,92	1,14
0,0625	5	2	2	2	54	218	9,26	2,29	3,70	0,92
0,1250	1	3	-	2	36	142	2,78	0,70	8,33	2,11
0,2500	2	-	-	1	18	043	11,11	4,65	-	-
0,5000	-	-	-	-	01	002	-	-	-	-
1,0000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1/ Percentagem determinada de acordo com o número de espigas  $M_1$ .

2/ Percentagem determinada de acordo com o número de espigas  $M_2$ .

mutagênico tanto entre espécies de mesmo nível de ploidia como entre variedades dentro da mesma espécie. Gregory, citado por BOROJEVIC (2), considera que a constituição genética do organismo experimental, e não o tipo de mutagênico usado, é o fator limitante da produção e recuperação dos mutantes. Conseqüentemente, é possível obter resultados experimentais, em milho opaco-2, bem diferentes dos deste experimento, embora adotando a mesma metodologia e as mesmas concentrações de EMS.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

Sementes de milho da variedade Opaco-2 Colombiano foram submetidas a seis diferentes concentrações de EMS, 0; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 e 1%, com os objetivos de: (a) avaliar os efeitos das concentrações de EMS sobre plantas e sementes de milho opaco-2, nas gerações  $M_1$ ,  $M_2$  e  $M_3$ ; (b) tentar induzir mutações que modificassem o aspecto de endospermas homozigóticos  $o_2o_2o_2$ , de opaco para normal, vítreo; (c) estabelecer a faixa de concentração de EMS mais eficiente para a indução de mutação em milho opaco-2.

De modo geral, o aumento das concentrações de EMS determinou redução do número e da altura média de plantas e afetou severamente o fenótipo das plantas  $M_1$ . Para o tratamento com EMS até 0,25%, o número de plantas não diferiu significativamente do encontrado para o controle, ao passo que a altura foi significativamente reduzida, também em relação ao controle, a partir de 0,125%.

De modo geral, a frequência de espigas com endosperma defeituoso e apresentando esterilidade, nas gerações  $M_1$  e  $M_3$ , aumentou com o aumento das concentrações de EMS. Isso demonstra claramente que o agente mutagênico induz mutação para essas 2 características.

Não houve evidência de que o EMS tenha induzido mutação que modificasse o fenótipo do endosperma de opaco para normal, vítreo. Por outro lado, há evidência de que existem genes modificadores do efeito do gene opaco-2 segregando na variedade utilizada. Genes modificadores e/ou contaminações por pólen estranho foram, provavelmente, os principais fatores responsáveis pela ocorrência de sementes com endosperma vítreo, tanto nas espigas do controle quanto nas originadas de sementes tratadas.

Nos tratamentos com EMS a 0,5 e 1% não foi recuperado nenhum mutante clorofiliano ou morfológico. Além disso, somente uma espiga  $M_1$  foi colhida no tratamento com 0,5%. Admite-se que essas concentrações sejam elevadas para as condições experimentais adotadas. A concentração de EMS recomendada para indução de mutação na variedade encontra-se na faixa de 0,0625 a 0,25%.

#### 5. SUMMARY

Maize seeds of the variety 'Opaco-2 Colombiano' were treated with 0, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 and 1% ethyl-methanesulfonate (EMS) solution. The objectives were: (a) to evaluate the effects of EMS on plants and seeds of opaque-2 maize; (b) to search for mutations that might change the endosperm phenotype from opaque to vitreous; and, (c) to determine the most efficient concentration of EMS for mutation induction in opaque-2 maize.

Increased concentrations of EMS tended to reduce the number of plants and the mean plant height, and severely affected the phenotype of  $M_1$  plants. The frequency of  $M_1$  and  $M_3$  ears with defective endosperms and exhibiting sterility increased with the increase in concentration of the mutagen.

There was no evidence that EMS induced mutation to vitreous, translucent endosperm. There are modifier genes which markedly affect the expression of the *opaque-2* gene in the variety used. The occurrence of seeds with vitreous endosperm which was observed may have been due to the action of segregating modifiers and/or to stray pollen.

The most efficient concentration of EMS for mutation induction in this maize variety and under the conditions utilized in this experiment is in the range of 0.0625 to 0.25%.

## 6. LITERATURA CITADA

1. BARREIRO NETO, M. *Seleção para alta e baixa densidade das sementes de milho (Zea mays L.) opaco-2 e seu efeito sobre caracteres agrônômicos e teores de proteína e lisina*. U.F.V., Viçosa, 1978. 51 p. (Tese Mestrado).
2. BOROJEVIC, K. Differences depending on the genotype. In: *Manual on Mutation Breeding*. Vienna, Int. Atom. Energy Ag., 1970. p. 125-126.
3. BRESSANI, R. Protein quality of opaque-2 maize in children. In: *Proc. High Lysine Corn Conf.*, Washington, U.S.A., Corn Refiners Association, Inc., 1966, p. 34-39.
4. BRIGGS, R.W. Induction of endosperm mutations in maize with ethyl methane-sulfonate. *Maize Genet. Coop. News Lett.* 43:23-31. 1969.
5. BRIGGS, R.W. Further studies on induction of endosperm mutations in maize with ethyl methanesulfonate. *Maize Genet. Coop. News Lett.* 44:11-17. 1970.
6. CHATTERJEE, N.K.; CASPAR, A.L. & SINGLETON, W.R. Genetics changes in maize induced by ethyl methanesulfonate. *J. Hered.* 56:276-277. 1965.
7. CHATTERJEE, N.K.; CASPAR, A. L. & SINGLETON, W.R. Genetic effects of ethyl methanesulfonate and gamma ray treatment of the proembryo in maize. *Genetics* 52:1101-1111. 1965.
8. CLARK, H.E.; ALLEN, P.E.; MEYERS, S.M., TUCKETT, S.E. & YAMAMURA, Y. Nitrogen balances of adults consuming opaque-2 maize protein. *Am. J. Clin. Nutr.* 20:825-833. 1967.
9. CONSTANTIN, M.J. KLOBE, W.D. & SKOLD, L.N. Effects of physical and chemical mutagens on survival, growth, and seed yield of soybeans. *Crop Sci.* 16:49-52. 1976.
10. GAUL, H. Plant injury and lethality. In: *Manual on Mutation Breeding*. Vienna, Int. Atom. Energy Ag., 1970. p. 85-90.
11. HARPSTEAD, D.D., PRADILLA, A. & LINARES, F. Response of malnourished children to diets of opaque-2, floury-2 and normal maize. *Agron. Abstr.* :59. 1969.
12. KAMRA, O.P. & BRUNNER, H. Modifying factors. In: *Manual on Mutation Breeding*. Vienna, Int. Atom. Energy Ag., 1970. p. 69-72.

13. 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.
14. McCLINTOCK, B. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* 26:234-282. 1941.
15. MERTZ, E.T., BATES, L.S. & NELSON, O.E. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. *Science* 145:279-280. 1964.
16. MERTZ, E.T. VERON. O.A., BATES, L.S. & NELSON, O.E. Growth of rats fed on opaque-2 maize. *Science* 148: 1741-1742. 1965.
17. NELSON, O.E., MERTZ, E.T. & BATES, L.S. Second mutant gene affecting the amino acid pattern of maize endosperm proteins. *Science* 150:1469-1470. 1965.
18. 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.
19. PICKETT, A.R. Opaque-2 corn in swine nutrition. In: *Proc. High Lysine Corn Conf.*, Washington, U.S.A., Corn Refiners Association, Inc., 1966, p. 19-22.
20. PINTO, R.F.S. *Seleção para modificadores do gene opaco-2 em milho (Zea mays L.)*. U.F.V., Viçosa, 1973. 50 p. (Tese Mestrado).
21. PINTO, R.F.S. & BARBOSA, H.M. Seleção visual para endospermas de milho (*Zea mays* L.) opaco-2 de diferentes fenótipos. *Rev. Ceres* 23:281-287. 1976.
22. 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.
23. POLLACSEK, M. Modification chez le maiz de l'expression du gène opaque-2 par un gène supresseur dominant. *Ann. Amélior. Plantes* 20:337-343. 1970.
24. PRIOLI, A.J., BARBOSA, H.M. & SANT'ANNA, R. Análise genética de endospermas translúcidos originados de plantas homozigóticas para o gene opaco-2 em milho (*Zea mays* L.). *Rev. Ceres* 27:550-556. 1980.
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, 1975. p. 197-216.