

RELAÇÃO ENTRE PESO RELATIVO DE SEMENTES E TEORES DE PROTEÍNA E
LISINA NO MILHO OPACO-2*

Luiz Sérgio Saraiva
John C. Anderson**

1. INTRODUÇÃO

Com a descoberta, em 1963, por MERTZ *et alii* (5), de que o gene opaco-2 melhora a composição química do milho, tornando-o de melhor qualidade, em razão dos teores mais elevados de dois aminoácidos essenciais, lisina e triptofano, as atenções dos melhoristas e pesquisadores voltaram-se para esse gene. Passaram a situá-lo como uma das metas a atacar, para a solução do sério problema mundial, que é a escassez protéica que provoca a desnutrição dos povos.

Os animais monogástricos, incluindo o homem, necessitam dos aminoácidos essenciais para o seu desenvolvimento. O milho, com o gene opaco-2 apresenta duas vezes mais lisina e 2/3 mais triptofano do que o milho comum (2).

O milho opaco-2 difere do milho normal na sua composição química, em virtude da atuação de um simples gene recessivo, localizado no cromossomo 7, loco 16(8), e que afeta somente o endosperma da semente, permanecendo a qualidade do germe inalterada.

O presente trabalho visa estudar a relação entre peso relativo de sementes e teores de proteína e lisina no endosperma e no germe de sementes de milho opaco-2. Com esse objetivo, fez-se uma série de cruzamentos dialélicos, envolvendo milhos

* Parte da tese apresentada pelo primeiro autor à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Fitotecnia, para obtenção do grau de "Magister Scientiae".

Aceito para publicação em 27-5-1972.

** Respectivamente, Auxiliar de Ensino da Universidade Federal de Viçosa e Pesquisador da Universidade de Purdue.

opacos de diferentes pesos relativos, e também os respectivos cruzamentos recíprocos, para se estudar a geração F_2 .

2. REVISÃO DE LITERATURA

NELSON (7) cita que o endosperma mutante opaco-2 foi descoberto por SINGLETON e JONES, e foi usado, durante muitos anos, somente como marcador genético para identificar o cromossomo 7.

O gene opaco-2 aumenta consideravelmente o teor de lisina no endosperma do milho (5) e, em consequência, o conteúdo de lisina na semente total é aumentado (1,3,9). Ele não causa, entretanto, mudança na qualidade da proteína do germe (5,7).

WICHSEER (10) encontrou maior porcentagem de proteína para o germe opaco-2 (19,5%) em relação ao do milho dentado normal (15,8%). O endosperma do opaco-2 também apresentou teor mais elevado de proteína (9,8%) do que o do milho normal (8,9%).

O milho opaco-2 possui duas vezes mais lisina na proteína do endosperma do que o milho normal (5,7).

NELSON (7) demonstrou ser possível melhorar, ao mesmo tempo, o teor de proteína e o nível de lisina, no milho, ao aumentar o teor de proteína do Illinois High Protein de 1,3% de lisina para 3,6%, pela introdução do gene opaco-2.

LENG *et alii* (4) estudaram o efeito da fonte de pólen sobre o conteúdo de proteína da semente do milho comum e, apesar de encontrarem diferenças estatisticamente significativas, elas foram tão pequenas que podem ser consideradas sem importância prática.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Campo Experimental da Genética, na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Utilizou-se o milho 'Maya 50' do Instituto Agrônomo de Campinas, do qual selecionaram-se cerca de 100 sementes que apresentavam o endosperma parcialmente vítreo. Em novembro de 1967, estas sementes foram plantadas e autofecundadas, observando-se que 70 das 100 sementes selecionadas produziram espigas que segregavam para opaco-2. Essas 70 espigas foram debulhadas uma a uma, e as sementes opacas e normais de cada espiga foram separadas e guardadas. Os grãos opacos foram contados e pesados, e igual número de sementes normais das espigas correspondentes foi retirado ao acaso e pesado. O peso das sementes do opaco foi expresso como porcentagem em relação à normal. Fez-se a seguinte classificação: relação de peso opaco/normal (O2/N), variando de 60,5% a 74,7%, considerada *baixa*; de 74,8% a 88%, relação *média*; de 88,1% a 101,4% como sendo *alta*. Estes termos-baixa, média e alta-passarão a ser usados

no trabalho. A classificação foi baseada na variação observada, de um mínimo de 60,5% até um máximo de 101,4%, com uma distribuição normal aproximada. As relações de peso dos pais utilizados para os cruzamentos foram de: baixa x baixa (61% e 68%, respectivamente); baixa x média (61% e 82%); baixa x alta (61% e 101%); média x média (79% e 82%); média x alta (82% e 101%) e alta x alta (96% e 101%). Em todo cruzamento, a classe que vem citada em primeiro lugar foi utilizada como fêmea. Quando se utilizaram duas classes iguais, a citada em primeiro lugar é sempre a de menor peso nos cruzamentos e a de maior peso nos cruzamentos recíprocos.

Em novembro de 1968, foi plantado um bloco de cruzamentos dialélicos composto de sementes normais de espigas que segregaram para opaco, colhidas do plantio do ano anterior. A classificação das sementes normais (baixa, média ou alta) foi feita utilizando a relação de peso 02/N, na respectiva espiga segregante. As progênies desses cruzamentos produziram algumas espigas com segregação.

Essas progênies foram separadas, de acordo com os cruzamentos originais, nos seguintes grupos: baixa x baixa, baixa x média, baixa x alta, média x média, média x alta, alta x alta e os seis respectivos cruzamentos recíprocos.

De cada uma dessas progênies, usando-se somente espigas normais que segregavam para opaco-2, tirou-se igual número de sementes normais de cada espiga, até completar 200. Em dezembro de 1969, foram misturadas e plantadas 50 sementes por fileira, correspondendo a quatro fileiras de cada cruzamento e mais quatro do recíproco, dando um total de 48 fileiras de 10 metros. Utilizou-se o espaçamento de 40 centímetros entre covas com 1 metro entre fileiras. Após o desbaste, deixaram-se 40 plantas por fileira para serem autofecundadas, a fim de se obter os F_2 e estudar o modelo ou padrão de resposta. Desde que cada espiga que segregasse para opaco-2 seria considerada uma repetição, não houve necessidade de utilizar um determinado delineamento experimental.

Foram autofecundadas mil plantas, cada uma duas vezes, a fim de que fosse garantida boa granação das espigas. A segunda polinização foi efetuada dois dias após a primeira.

Foram colhidas 946 espigas, em maio de 1970, e levadas imediatamente para o secador, onde permaneceram durante 72 horas, à temperatura média de 33,1°C, sendo o teor de umidade final, após a secagem, de 12,3%. Depois deste período, efetuou-se a seleção das espigas, sendo que 417 foram eliminadas visto não terem mostrado segregação ou estarem doentes. As 529 espigas normais que segregavam para opaco-2 foram selecionadas e debulhadas.

Todos os grãos opacos de cada espiga foram contados e guardados, e igual número de sementes normais das mesmas espigas

foi contado e guardado em câmara seca, a 21,7°C e 37% de umidade.

Efetou-se a pesagem do mesmo número de sementes normais e opacas de cada espiga e o peso das sementes opacas foi expresso como porcentagem da normal (O_2/N). Finda esta etapa, iniciou-se a dissecação das sementes opaco-2. A dissecação consistiu na separação do pericarpo, germe e endosperma de cada semente.

Para a dissecação, selecionaram-se de cada fileira as cinco espigas que produziram maior número de grãos opacos. De cada uma destas espigas, foram tiradas ao acaso 30 sementes, sendo que a única seleção efetuada foi no sentido de evitar a retirada de sementes doentes ou podres que pudessem interferir nos resultados. Um total de 7200 sementes opacas foram dissecadas em germe, pericarpo e endosperma. Foram dissecadas, ainda, 150 sementes normais de cinco grupos diferentes (30 sementes de cada grupo), sendo três de cruzamentos e dois de cruzamentos recíprocos, para servir de padrão de comparação com os opacos nas características estudadas. O motivo de ter sido dissecado pequeno número de sementes normais deveu-se ao fato de já serem bem conhecidas as características da semente do milho normal e, também, porque o presente estudo prendeu-se principalmente ao comportamento do milho opaco-2.

Para a dissecação, cada grupo de 30 sementes era colocado em vidro com 20 ml d'água destilada, aí permanecendo por 14 horas, para promover o amolecimento das partes da semente e facilitar a dissecação. No início dos trabalhos de dissecação, fez-se a análise d'água destilada, onde permaneciam as sementes durante 14 horas, para verificar se o nitrogênio solúvel do grão de milho estava sendo solubilizado para o meio. A análise d'água não constatou a presença de nitrogênio, o que fez com que os trabalhos continuassem normalmente.

A dissecação era feita com pinça e estilete, e as partes de um mesmo grupo de sementes eram guardadas em saquinhos identificados como germe, pericarpo e endosperma. Completada a dissecação, as partes eram levadas ao secador, por dois dias, e depois para a câmara seca, onde permaneciam.

Para a fase seguinte, que seria a análise de proteína e lisina, eliminou-se o pericarpo, visto não apresentar componentes químicos de interesse para o presente estudo. Processou-se, então, a análise do germe e endosperma para determinação dos teores de proteína e lisina. Para isso, combinaram-se os cinco grupos de sementes de cada fileira em um só, constituído de germes e endospermas de 150 sementes, que foram então analisados.

Após a moagem do endosperma e germe, fez-se a determinação da proteína total, usando o método semimicro Kjeldahl. A análise de lisina foi efetuada fazendo-se uso do método colorimé-

trico da dinitro piridina, desenvolvido por Tsai e Hansel.

A comparação entre as médias dos diversos caracteres estudados foi feita pelo teste de t.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Teores de Proteína no Endosperma e no Germe das Sementes Opacas do F_2

4.1.1. Teores de Proteína no Endosperma

Observou-se ligeira tendência para classes de menores pesos relativos apresentarem teores mais elevados de proteína no endosperma e classes de maiores pesos possuírem menor teor de proteína. Contudo, poucas diferenças significativas foram detectadas, acreditando-se que o pequeno número de graus de liberdade utilizado não permitiu a significância de algumas comparações (quadros 1 e 2).

QUADRO 1 - Teores de proteína no endosperma de sementes opacas em F_2 (*)

Cruzamento Original	Cruzamentos	Cruzamentos Recíprocos
Baixa x Baixa	10,40	11,03
Baixa x Média	10,94	10,06
Baixa x Alta	10,31	10,58
Média x Média	10,67	10,75
Média x Alta	10,24	9,90
Alta x Alta	10,08	9,54
Valor Médio	10,44	10,31
Média Geral	10,38	

* Média de 4 determinações.

Quando se compararam os cruzamentos com os respectivos cruzamentos recíprocos houve diferença significativa apenas para o F_2 de baixa x média, mostrando que a inversão dos pais não causou diferenças de importância prática no conteúdo de proteína no endosperma. Conclusão semelhante foi obtida por LENG

et alii (4), usando diferentes fontes de pólen e semente integral.

A porcentagem de proteína no endosperma da semente normal (média geral de 13,52%, quadro 3) foi maior do que a encontrada para as sementes opacas (média geral de 10,38%). Este resultado discorda do obtido por WICHSER (10).

QUADRO 2 - Comparações entre as classes em F₂, quanto aos teores de proteína no endosperma das sementes opacas (abaixo da diagonal para os cruzamentos; acima da diagonal para os cruzamentos recíprocos)

Cruzamento	Baixa x Baixa	Baixa x Média	Baixa x Alta	Média x Média	Média x Alta	Alta x Alta
Original	Baixa	Média	Alta	Média	Alta	Alta
Baixa x Baixa	-	*	ns	ns	ns	**
Baixa x Média	ns	-	ns	*	ns	ns
Baixa x Alta	ns	ns	-	ns	ns	*
Média x Média	ns	ns	ns	-	ns	**
Média x Alta	ns	ns	ns	ns	-	ns
Alta x Alta	ns	*	ns	ns	ns	-

ns: não significativo

* : significativo ao nível de 5%

** : significativo ao nível de 1%.

QUADRO 3 - Teores de proteína no endosperma das sementes normais em F₂(*)

Cruzamento Original	Cruzamentos	Cruzamentos Recíprocos
Baixa x Baixa	14,67	-
Baixa x Alta	-	12,80
Média x Média	14,25	-
Alta x Alta	14,13	11,77
Média Geral	13,52	

* Os dados omitidos são referentes a determinações não efetuadas.

4.1.2. Teores de Proteína no Germe

A distribuição dos valores de proteína no germe entre as diferentes relações do F_2 variou desordenadamente, não se observando nenhuma tendência de associação entre teor de proteína do germe e peso relativo das sementes (quadro 4).

QUADRO 4 - Teores de proteína no germe de sementes opacas em F_2 (*)

Cruzamento Original	Cruzamentos	Cruzamentos Recíprocos
Baixa x Baixa	23,43	25,96
Baixa x Média	28,36	26,69
Baixa x Alta	24,06	27,47
Média x Média	29,12	28,57
Média x Alta	27,82	27,42
Alta x Alta	26,88	25,82
Valor Médio	26,61	26,99
Média Geral	26,80	

* Média de 4 determinações

Para os cruzamentos, apenas a comparação de baixa x média com alta x alta apresentou significância estatística, a 5%. Para os cruzamentos recíprocos, o mesmo nível de significância foi observado quando se comparou média x média com alta x alta. Todas as outras comparações efetuadas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Semelhantemente ao que se observou com o teor de proteína no endosperma, para o germe não se verificou efeito significativo da inversão dos pais no teor de proteína, para nenhum dos casos analisados.

Os teores de proteína do germe da semente normal (média geral de 21% quadro 5) apresentaram-se mais baixos do que os da semente opaco-2 (média geral de 26,80%). Resultado semelhante foi obtido por WICHSER (10).

QUADRO 5 - Teores de proteína no germe das sementes normais em F_2 (*)

Cruzamento Original	Cruzamentos	Cruzamentos Recíprocos
Baixa x Baixa	20,56	-
Baixa x Alta	-	21,05
Média x Média	21,77	-
Alta x Alta	20,66	20,97
Média Geral	21,00	

* Os dados omitidos são referentes a determinações não efetuadas.

4.2. Teores de Lisina no Endosperma e no Germe das Sementes Opacas em F_2

4.2.1. Teores de Lisina no Endosperma

Observou-se tendência para o F_2 das classes de menores pesos relativos apresentarem maiores teores de lisina no endosperma e vice-versa. Apesar da tendência observada, poucas diferenças significativas foram detectadas, talvez em razão do pequeno número de graus de liberdade usado (quadros 6 e 7).

Os teores de lisina obtidos para os F_2 nos cruzamentos e cruzamentos recíprocos correspondentes foram muito próximos, e em nenhum caso constatou-se diferença significativa, o que indicou que não houve efeito quando se inverteu a ordem dos pais nos cruzamentos.

Apesar de o milho normal apresentar teores mais elevados de proteína no endosperma do que o opaco-2, os teores de lisina da semente normal (quadro 8) apresentaram-se mais baixos do que os do endosperma da semente opaco-2 dos F_2 correspondentes. A semente normal apresentou média geral de 0,216% de lisina no endosperma, que no opaco-2 foi de 0,301%.

QUADRO 6 - Teores de lisina no endosperma (g/100 g matéria seca) de sementes opacas em F₂(*)

Cruzamento Original	Cruzamentos	Cruzamentos Recíprocos
Baixa x Baixa	0,330	0,318
Baixa x Média	0,322	0,310
Baixa x Alta	0,286	0,324
Média x Média	0,340	0,328
Média x Alta	0,278	0,289
Alta x Alta	0,260	0,234
Valor Médio	0,303	0,300
Média Geral	0,301	

* Média de 4 determinações

QUADRO 7 - Comparações entre as classes em F₂, quanto aos teores de lisina no endosperma de sementes opacas (abaixo da diagonal para os cruzamentos; acima da diagonal para os cruzamentos recíprocos)

Cruzamento Original	Baixa x Baixa	Baixa x Média	Baixa x Alta	Média x Média	Média x Alta	Alta x Alta
Baixa x Baixa	-	ns	ns	ns	ns	**
Baixa x Média	ns	-	ns	ns	ns	**
Baixa x Alta	*	ns	-	ns	ns	**
Média x Média	ns	ns	ns	-	ns	**
Média x Alta	*	ns	ns	ns	-	*
Alta x Alta	**	*	ns	ns	ns	-

ns: não significativo

* : significativo ao nível de 5%

**: significativo ao nível de 1%.

QUADRO 8 - Teores de lisina no endosperma das sementes normais em F_2 (*)

Cruzamento Original	Cruzamentos	Cruzamentos Recíprocos
Baixa x Baixa	0,269	-
Baixa x Alta	-	0,190
Média x Média	0,245	-
Alta x Alta	0,208	0,190
Média Geral	0,216	

* Os dados omitidos são referentes a determinações não efetuadas.

4.2.2. Teores de Lisina no Germe

A distribuição da porcentagem de lisina no germe da semente opaco-2 foi irregular, não se notando relação entre teor de lisina e peso relativo das sementes (quadros 9 e 10).

QUADRO 9 - Teores de lisina no germe (g/100 g matéria seca) de sementes opacas em F_2 (*)

Cruzamento Original	Cruzamentos	Cruzamentos Recíprocos
Baixa x Baixa	1,839	1,960
Baixa x Média	1,736	1,808
Baixa x Alta	1,739	1,893
Média x Média	1,971	1,766
Média x Alta	2,009	1,662
Alta x Alta	1,692	1,765
Valor Médio	1,831	1,809
Média Geral	1,820	

* Média de 4 determinações

QUADRO 10 - Comparações entre as classes em F₂, quanto aos teores de lisina no germe das sementes opacas (abaixo da diagonal para os cruzamentos; acima da diagonal para os cruzamentos recíprocos)

Cruzamento	Baixa x Baixa	Baixa x Média	Baixa x Alta	Média x Média	Média x Alta	Alta x Alta
Original	Baixa	Média	Alta	Média	Alta	Alta
Baixa x Baixa	-	ns	ns	ns	**	ns
Baixa x Média	ns	-	ns	ns	ns	ns
Baixa x Alta	ns	ns	-	ns	ns	ns
Média x Média	ns	**	*	-	ns	ns
Média x Alta	ns	*	*	ns	-	ns
Alta x Alta	ns	ns	ns	**	*	-

ns: não significativo

* : significativo ao nível de 5%

** : significativo ao nível de 1%.

Quando se comparou o cruzamento com o cruzamento recíproco correspondente em apenas um caso (F₂ de média x alta), observou-se significância estatística. Os outros resultados foram muito próximos, não mostrando efeito nos teores de lisina no germe provocado pela direção dos cruzamentos.

Os teores de lisina do germe da semente normal (média de 1,50% quadro 11) apresentaram-se mais baixos do que os da semente opaco-2 (média de 1,82%), porém, isto ocorreu porque o germe da semente opaco-2 teve um maior nível de proteína, tanto é que a concentração de lisina no germe, expressa em g/100 g de proteína, foi de 6,8 para o germe da semente opaco-2 e 7,1 para o da semente normal, mostrando não haver mudança no teor de lisina da proteína do germe. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por NELSON (7) e MERTZ *et alii* (5).

QUADRO 11 - Teores de lisina no germe das sementes normais em F_2 (*)

Cruzamento Original	Cruzamentos	Cruzamentos Recíprocos
Baixa x Baixa	1,440	-
Baixa x Alta	-	1,564
Média x Média	1,588	-
Alta x Alta	1,540	1,392
Média Geral	1,500	

* Os dados omitidos são referentes a determinações não efetuadas.

4.3. Relação Lisina/Proteína (%) no Endosperma das Sementes Opaco-2 em F_2

Tanto nos cruzamentos quanto nos cruzamentos recíprocos, observou-se tendência para classes de maiores pesos relativos apresentarem relações de lisina/proteína mais baixas e vice-versa, indicando uma associação negativa entre peso relativo das sementes e qualidade da proteína do endosperma da semente opaco-2 (quadro 12). Estes resultados constituem uma advertência para os melhoristas, quando se seleciona milho opaco para sementes mais pesadas.

Os dados da relação lisina/proteína para os cruzamentos e cruzamentos recíprocos correspondentes praticamente não variaram, não evidenciando efeito da inversão dos pais na qualidade da proteína do endosperma das sementes opacas.

As sementes opacas apresentaram 81% mais lisina no endosperma (média geral de 2,90 g de lisina/100 g de proteína) do que as sementes normais (1,60 g de lisina/100 g de proteína, quadro 13). MERTZ *et alii* (5) encontraram diferença semelhante, com 69% mais lisina para o endosperma opaco-2. NELSON (6,7) também obteve resultados comprovando o teor mais alto em lisina no endosperma opaco-2. FEIST e PATTERSON (3) e ALVEY e HAMILTON (1) também obtiveram níveis mais altos em lisina para o milho opaco-2 do que para o normal, porém, utilizaram a semente integral.

QUADRO 12 - Relação lisina/proteína (%) no endosperma de sementes opacas em F₂(*)

Cruzamento Original	Cruzamentos	Cruzamentos Recíprocos
Baixa x Baixa	3,17	2,88
Baixa x Média	2,94	3,08
Baixa x Alta	2,77	3,06
Média x Média	3,19	3,05
Média x Alta	2,71	2,92
Alta x Alta	2,58	2,45
Valor Médio	2,89	2,91
Média Geral	2,90	

* Média de 4 determinações

QUADRO 13 - Relação lisina/proteína (%) no endosperma das sementes normais em F₂(*)

Cruzamento Original	Cruzamentos	Cruzamentos Recíprocos
Baixa x Baixa	1,83	-
Baixa x Alta	-	1,48
Média x Média	1,72	-
Alta x Alta	1,47	1,61
Média Geral	1,60	

* Os dados omitidos são referentes a determinações não efetuadas.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Estudou-se a geração F₂ de cruzamentos dialélicos entre diferentes classes de peso relativo de sementes no milho 'Maya

50'. Analisou-se a influência desses diferentes pesos, usando-se o F_2 dos cruzamentos e dos cruzamentos recíprocos, na porcentagem de proteína e lisina no endosperma e no germe, e na relação lisina/proteína do endosperma. Para nenhum dos caracteres encontrou-se diferença de importância entre cruzamentos e cruzamentos recíprocos correspondentes.

Observou-se a tendência de as sementes de maior peso relativo possuírem menor teor de proteína e de lisina no endosperma. Estes dados sugerem possível problema na seleção de milho opaco de maior peso.

Não foi observada relação entre peso relativo de sementes opacas e porcentagem de proteína ou de lisina no germe.

As sementes opacas mostraram possuir teores mais baixos de proteína no endosperma e teores mais elevados de proteína no germe do que as sementes normais.

As sementes opacas mostraram ainda possuir, no endosperma, 81% mais lisina na proteína do que as sementes normais.

As sementes opacas apresentaram, no endosperma, relação lisina/proteína (em %) sempre maior do que as sementes normais, evidenciando a melhor qualidade da proteína do endosperma da semente opaco-2.

6. SUMMARY

A study was made of the F_2 generation of diallel crosses between different classes of relative weight of seeds of the corn variety 'Maya 50'. The influence of these various weights were analyzed using the F_2 of the crosses and their reciprocals. Characteristics studied were percent protein and percent lysine in both the endosperm and the germ, and the ratio of lysine to protein in the endosperm.

In none of the above characteristics was any important difference found between crosses and their reciprocals.

A negative association was observed between relative weight of seed of opaque-2 and its percent of protein, as well as lysine in the endosperm. There was a tendency for seed of greater relative weight to have a lower level of protein and lysine in the endosperm. These data suggest a possible problem in selecting opaque corn of greater relative weight.

No relationship was found between relative weight of opaque seed and protein or lysine level in the germ.

The opaque seeds had lower levels of protein in the endosperm and higher levels of protein in the germ than normal seeds on the same ears.

The opaque seeds had in their endosperms 81% more lysine in the protein than did normal seeds.

In the endosperm of the opaque seeds the lysine as percent of protein was always greater than that of normal endosperm

indicating a superior quality of protein in the endosperm of opaque-2 seed.

7. LITERATURA CITADA

1. ALVEY, D.D. & HAMILTON, J.R. Effect of genetic background on the lysine content of corn endosperm homosygous¹ for opaque-2 gene. *Agronomy Abstracts*, USA, p.3. 1966.
2. BEESON, W.M., PICKETT, R.A., MERTZ, E.T., CROMWELL, G.L. & NELSON, O.E. *Nutritional value of high-lysine corn*. Lafayette, USA, Purdue University, 1966. 8 p. (Research Progress Report 227).
3. FEIST, W.A. & PATTERSON, E.B. Evaluation of six inbred lines of *Zea mays* during conversion to opaque. *Agronomy Abstracts*, USA, p. 7. 1968.
4. LENG, E.R., EARLE, F.R. & CURTIS, J.J. Direct effect of pollen parent on protein content of the corn kernel. *Cereal Chemistry*, USA, 28(6):479-482. 1951.
5. MERTZ, E.T., BATES, L.S. & NELSON, O.E. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. *Science*, USA, 145(3629):279-280. 1964.
6. NELSON, O.E. Opaque-2, floury-2 and high protein maize. In: *Proceedings of the High Lysine Corn Conference*. Washington, USA, Corn Refiners Association, Inc., 1966. p. 156-160.
7. NELSON, O.E. O programa de milho opaco-2 na Universidade de Purdue. In: *Anais da VII Reunião Brasileira do Milho e I Simpósio sobre o Milho Opaco*, Viçosa, Universidade Federal, 1971. p. 160-183.
8. NEUFFER, M.G., JONES, L. & ZUBER, M.S. *The mutants of maize*. Wisconsin, Crop Science Society of America, 1968. 74 p.
9. PAEZ, A.V., USSARY, J.P., HELM, J.L. & ZUBER, M.S. Survey of maize strains for lysine content. *Agronomy Journal*, USA, 61(6):886-889. 1969.
10. WICHSEER, W.R. Comparison of the dry milling properties of opaque-2 and normal dent corn. In: *Proceedings of the High Lysine Corn Conference*. Washington, USA, Corn Refiners Association, Inc., 1966. p. 104-116.