

Espectroscopia no Infravermelho Próximo e Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais como Método Alternativo para a Seleção de Sementes Haploides de Milho



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
200**

**Espectroscopia no Infravermelho Próximo e
Análise Discriminante por Mínimos Quadrados
Parciais como Método Alternativo para a
Seleção de Sementes Haploides de Milho**

**Maria Lúcia Ferreira Simeone
Mariana Rodrigues Ribeiro
Roberto dos Santos Trindade**

*Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2019*

Esta publicação está disponível no endereço:
<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/publicacoes>

Embrapa Milho e Sorgo
Rod. MG 424 Km 45
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Maria Marta Pastina

Secretário-Executivo
Elena Charlotte Landau

Membros
*Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia Maria
Borges Damasceno, Maria Lúcia Ferreira
Simeone, Roberto dos Santos Trindade e
Rosângela Lacerda de Castro*

Revisão de texto
Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica
Rosângela Lacerda de Castro (CRB 6/2749)

Tratamento das ilustrações
Mônica Aparecida de Castro

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Mônica Aparecida de Castro

Foto da capa
Roberto dos Santos Trindade

1ª edição
Publicação digitalizada (2019)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Nome da unidade catalogadora

Simeone, Maria Lúcia Ferreira.

Espectroscopia no infravermelho próximo e análise discriminante por mínimos quadrados parciais como método alternativo para a seleção de sementes haploides de milho / Maria Lúcia Ferreira Simeone, Mariana Rodrigues Ribeiro, Roberto dos Santos Trindade. -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2019.

19 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 200).

1. Zea mays. 2. Método de análise. 3. Semente. I. Ribeiro, Mariana Rodrigues. II. Trindade, Roberto dos Santos. III. Título. IV. Série.

CDD 633.15 (21. ed.)

Sumário

Resumo	05
Abstract	06
Introdução.....	06
Material e Métodos	09
Resultados e Discussão	12
Conclusões.....	16
Referências	17

Espectroscopia no Infravermelho Próximo e Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais como Método Alternativo para a Seleção de Sementes Haploides de Milho

Maria Lúcia Ferreira Simeone¹

Mariana Rodrigues Ribeiro²

Roberto dos Santos Trindade³

Resumo – O trabalho apresenta o desenvolvimento de um método para a identificação de sementes haploides que possuam o gene marcador *R1-navajo* em milho utilizando a espectroscopia no infravermelho próximo e a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Os espectros de absorvância foram obtidos a partir de 137 sementes de quatro genótipos de milho, na região do infravermelho próximo utilizando um equipamento MicroNIR, modelo 1700. A combinação de Standard Normal Variate - SNV, primeira derivada por Savitzky-Golay e dados centrados na média foi a sequência de pré-processamento mais eficiente para minimizar os efeitos de espalhamento e deslocamentos da linha de base. O modelo PLS-DA alcançou 100% de classificações corretas, considerando os dados de validação externa para os quatro genótipos de milho avaliados. A análise de parâmetros como sensibilidade, especificidade e eficiência no conjunto de testes de validação do modelo resultou em valores iguais a 100% para o conjunto de treinamento e para o conjunto de testes. Os resultados evidenciam que a espectroscopia NIR combinada com o método de análise discriminante por quadrados mínimos parciais é uma ferramenta promissora para a seleção rápida e não destrutiva de sementes de milho haploides.

Termos para indexação: análise multivariada, espectroscopia, análise qualitativa, haploide identificação, gene R-navajo.

¹ Química, DSc. em Química, pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo.

² Bolsista de doutorado pela UFV e coorientada pelo pesquisador Roberto dos Santos Trindade.

³ Eng. Agrôn. DSc em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo

Near Infrared Spectroscopy and Partial Least Squares Discriminant Analysis as an Alternative Method for Maize Haploid Seed Selection

Abstract – This study presents the development of a method for the identification of haploid seeds that have the marker gene *R1-navajo* in maize using near infrared spectroscopy and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). The absorbance spectra were obtained from 137 seeds of four maize genotypes in the near infrared region using a Model 1700 MicroNIR device. The combination of Standard Normal Variate - SNV, first derived by Savitzky-Golay and data centered on the average was the most efficient preprocessing sequence to minimize the effects of baseline scattering and offsets. The PLS-DA model reached correct classifications of 100%, when considering the external validation data and the four maize genotypes evaluated. The analysis of parameters such as sensitivity, specificity and efficiency in the model validation test set resulted in values equal 100% for both the training set and the test set. Results showed that NIR spectroscopy combined with discriminating methods is a promising tool for non-destructive and fast haploid maize seeds classification.

Index terms: multivariate analysis, spectroscopy, qualitative analysis, haploid identification, *R-navajo* gene.

Introdução

O milho é um dos cereais mais utilizados na alimentação humana e animal, entretanto, sua importância econômica não se encontra vinculada apenas à sua aplicação alimentícia, mas também nos seus derivados, que se estendem às indústrias química, farmacêutica, de papéis, têxtil, combustíveis, entre outras aplicações. O Brasil é o segundo maior produtor e exportador de milho do mundo, com produção de, aproximadamente, 99 milhões de toneladas de grãos, na safra 2018/2019 (Acompanhamento da Safra Brasileira [de] Grãos, 2019), sendo que mais de 90% das sementes plantadas são híbridas (Cruz et al., 2004).

Em função do tempo e custo para obtenção das linhagens necessárias para a produção de híbridos, os melhoristas têm procurado alternativas que

agilizem e barateiem esse processo. Uma delas é o emprego da tecnologia de duplo-haploides. Isto é, a geração de plântulas a partir de células haploides e posterior duplicação (Pierre et al., 2011). Essa técnica tem sido padronizada e utilizada por muitas empresas produtoras de sementes e pelo setor público, uma vez que permite o desenvolvimento de linhagens de milho na metade do tempo (Guimarães et al., 2018).

Para obtenção de haploides em milho, o método mais utilizado é o protocolo *in vivo*, que consiste no cruzamento de populações-fonte com indutores de haploidia, que são genótipos que possuem a capacidade de induzir a formação de sementes com embriões haploides de constituição baseada nos genes dos genótipos-fonte. Após duplicação cromossômica, estas plantas são autofecundadas e passam a ser chamadas de linhagens duplo-haploides, uma vez que, para cada cromossomo que a planta haploide possuía anteriormente, passa-se a ter uma cópia exata, o que lhe confere completa homozigose e o mesmo número de cromossomos de uma planta diploide (Prigge; Melchinger, 2011; Trindade et al., 2017).

Para a identificação precoce dos haploides gerados por meio do uso de linhagens indutoras, Chase e Nanda (1965) descreveram um sistema de marcador fenotípico baseado na pigmentação das sementes de milho por antocianina, determinado pelo gene R-navajo (*R1-nj*). O alelo dominante promove a pigmentação com antocianina no endosperma e no embrião das sementes diploides, sendo que as sementes haploides apresentam pigmentação somente no endosperma, ficando com o embrião branco, por causa da não ocorrência de cruzamento com o indutor de haploidia (Figura 1).



Sementes diploides



Sementes haploides

Figura 1. Sementes diploides e haploides de milho.

Entretanto, a expressão do marcador *R1-nj* pode variar nas diferentes linhagens de milho e dificultar a identificação das sementes haploides. A forma das sementes também pode dificultar a visualização do marcador. As sementes redondas e sementes do grupo heterótico duro apresentam um formato que dificulta a visualização do marcador no embrião (Bitica; Giura, 2015), sendo que é comum a inibição da expressão do marcador *R1-nj*.

O método visual é o mais utilizado para a separação das sementes haploides, mas está sujeito à fadiga visual e subjetividade na interpretação das cores pelo operador, levando a erros de classificação das sementes, além de ser um método muito laborioso e demorado.

O desenvolvimento de um método para a classificação de haploides de milho que proporcione a separação das sementes com maior rapidez e confiabilidade torna-se de grande interesse para auxiliar os melhoristas no desenvolvimento de híbridos de milho.

Entre as técnicas disponíveis para obtenção de métodos analíticos não destrutivos de aplicação diretamente em grãos se destaca a reflectância no infravermelho próximo para a determinação de diferentes propriedades ou constituintes de matrizes de interesse agrícola (Williams et al., 1996). Porém, metodologias que empregam a tecnologia NIR têm se mostrado altamente eficientes na substituição de métodos de análise laboratoriais em diversos setores, como em análises de alimentos, produtos farmacêuticos e agrícolas, entre outros, viabilizando a avaliação de um grande número de propriedades e características, em um largo espectro de amostras (Pasquini, 2018).

O uso da espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) associando métodos de calibração multivariada pode ser uma alternativa para realizar a separação de haploides de milho, uma vez que é um método não destrutivo, rápido, livre do uso de reagentes químicos e com muitas aplicações na cultura do milho (Berardo et al., 2009; Simeone et al., 2018; Wakholi et al., 2018).

Na literatura estão descritos alguns trabalhos utilizando a espectroscopia NIR e métodos de calibração multivariada não lineares para identificação de haploides em milho (Hong et al., 2016; Li et al., 2018; Yu et al., 2018). Entretanto, ainda não foi utilizada a análise discriminante por quadrados mínimos parciais como método alternativo para a seleção de grãos haploides de milho.

Assim, o objetivo desse trabalho foi desenvolver um método para a identificação de haploides em milho utilizando a espectroscopia no infravermelho próximo e a análise discriminante por quadrados mínimos parciais (PLS-DA) para eliminar a subjetividade da avaliação visual na separação das sementes.

Material e métodos

As sementes de milho haploides foram selecionadas a partir do cruzamento de quatro diferentes genótipos-fonte do Programa de Melhoramento de Milho da Embrapa (genótipos 17-5-flint, 17-6-flint, 17-8-flint e 17-122-dent) com o híbrido indutor de haploidia TAILP1xTAILP2, desenvolvido pelo CYMMIT (Prasanna et al., 2012).

De cada fonte, foram selecionadas 139 sementes de milho que foram caracterizadas visualmente pela presença do gene R1-navajo como haploides ou diploides. Os espectros de absorvância foram obtidos a partir de cada semente, do lado do embrião, na região do infravermelho próximo utilizando um equipamento MicroNIR, modelo 1700 (JDSU, Flawil, Switzerland) equipado com detector de InGaAs (Arseneto de índio e gálio). O lado do embrião foi escolhido, uma vez que a pigmentação que distingue melhor a semente haploide de diploide está contida no embrião (Cui et al., 2019).

O equipamento foi calibrado utilizando um padrão de Spectralon®. Os espectros das sementes de milho foram obtidos em triplicata, na região de 900 a 1.700 nm com resolução 12,5 nm, tempo de medida 0,25 segundos. Os espectros foram coletados em ambiente climatizado a temperatura de 23 ± 2 °C e os espectros dos dois tipos de sementes de milho foram obtidos de forma aleatória.

Os dados foram analisados utilizando o software The Unscrambler versão 10.4 (CAMO Software Inc., Norway). Diferentes pré-processamentos foram aplicados às variáveis comparativamente. No caso, para corrigir os efeitos de espalhamento da luz e deslocamentos de linha de base, os espectros foram pré-processados utilizando a variação normal padrão - SNV (*Standard Normal Variate*) e primeira derivada Savitzky-Golay. Os dados também foram centrados na média. Para a construção dos modelos foi realizada inicialmente

uma análise de PCA (*Principal Component Analysis*) para a verificação da variância amostral.

No conjunto de dados espectrais das amostras foi desenvolvido um modelo utilizando o algoritmo Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA), que é um método de classificação supervisionado que maximiza a relação entre as variáveis dependente e os escores, além de reduzir a dimensionalidade das variáveis originais corrigindo o problema encontrado em matrizes singulares com posto incompleto. Em seguida utilizou-se o algoritmo Kennard-Stone (Kennard; Stone, 1969) para a seleção do conjunto de amostras de treinamento e teste. Dessa forma, foram obtidos dois conjuntos, um de treinamento com 2/3 das amostras e outro de teste contendo 1/3 das amostras aproximadamente.

A análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) é uma variação do algoritmo de regressão por Quadrados Mínimos Parciais (PLS), método de calibração inversa que busca correlacionar a resposta instrumental (matriz \mathbf{X}) com um vetor \mathbf{y} de concentrações. No caso do PLS-DA a diferença está no fato de que o vetor \mathbf{y} conterá valores da classe à qual a amostra pertence (Barker, Rayens, 2003).

Nos modelos PLS-DA, o valor de classe -1 foi atribuído às amostras de treinamento pertencentes às sementes que estavam sendo discriminadas (haploide), e o valor de classe 1 foi atribuído às amostras de treinamento das demais sementes (diploides).

O número de variáveis latentes (VL) foi escolhido baseado no menor erro de classificação na validação cruzada. A validação cruzada foi realizada utilizando o método randômico com subconjuntos de 5 amostras.

Outro critério importante na construção do modelo PLS-DA é a detecção de amostras anômalas (*outliers*). A detecção de amostras anômalas foi baseada na análise dos gráficos de resíduos espectrais Q e de T^2 Hotelling \square s, ao nível de 95% de confiança.

Para avaliar a qualidade e eficiência do modelo de classificação desenvolvido foram avaliados os seguintes parâmetros de mérito conforme descrito por Botelho et al. (2015): taxas de falso positivo (TFP), falso negativo (TFN), taxa de sensibilidade (SEN), taxa de especificidade (ESPEC), a taxa de eficiência (TEF) em %, RMSEC (*Root Mean Squared Error of Calibration*),

raiz quadrada do erro médio de validação cruzada - RMSECV (*Root Mean Squared Error of Cross Validation*), raiz quadrada do erro médio de predição - RMSEP (*Root Mean Squared Error of Prediction*) e R^2 (coeficiente de determinação para o conjunto de treinamento e teste).

A taxa de falsos positivos (TFP) representa o percentual de amostras que apresentaram erros falsos positivos e é calculada como a relação entre o número absoluto de falsos positivos (FP) e a soma do número absoluto de erros falsos positivos (FP) e verdadeiros negativos (VN) multiplicada por 100, representada pela equação: $TFP = FP / (FP + VN) \times 100$ (1)

A taxa de falsos negativos (TFN) representa o percentual de amostras que apresentou erros falso negativos, sendo calculada como a relação entre o número absoluto de falsos negativos (FN) e a soma do número absoluto de erros falsos negativos (FN) e verdadeiros positivos (VP) multiplicada por 100, representada pela equação: $TFN = FN / (FN + VP) \times 100$ (2)

A especificidade (ESPEC) representa o percentual de amostras pertencentes às outras classes ($y = -1$) que foram identificadas como pertencentes a essas classes. Essa figura de mérito é calculada pela razão entre o número absoluto de verdadeiros negativos (VN) e a soma do número absoluto de verdadeiros negativos (VN) e dos erros falso positivos (FP) multiplicado por 100, representada pela equação:

$$ESPEC = VN / (VN + FP) \times 100 \quad (3)$$

A sensibilidade (SEN) representa o percentual de amostras pertencentes à classe discriminada que foram identificadas como sendo dessa classe. Portanto, sendo calculada como a razão entre o número absoluto de verdadeiros positivos (VP) e a soma do número absoluto de verdadeiros positivos (VP) e dos erros falsos negativos (FN) multiplicada por 100, representada pela equação:

$$SEN = VP / (VP + FN) \times 100 \quad (4)$$

Por fim, a taxa de eficiência (TEF) dos modelos de discriminação pode ser obtida pela diferença entre o valor de 100% e a soma das taxas de erros falsos negativos (TFN) e falsos positivos (TFP), representada pela equação:

$$TEF = 100 - (TFN + TFP) \quad (5)$$

Resultados e Discussão

Os espectros médios originais das sementes de milho estão apresentados na Figura 2. Há pequenas diferenças entre os espectros das sementes de milho haploides e diploides e entre os quatro diferentes genótipos, mas não é possível a sua separação visual.

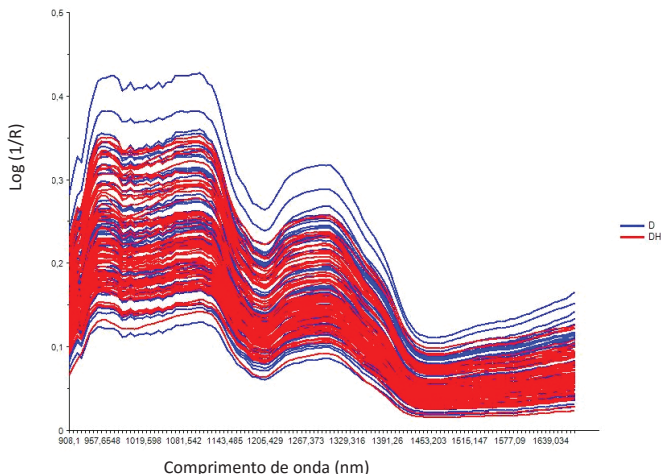


Figura 2. Espectros originais das sementes de milho haploides (DH) e diploides (D) para os genótipos 17-5-flint, 17-6-flint, 17-8-flint e 17-122-dent.

Podemos observar na Figura 2 que as informações contidas na região entre 900 e 1.700 nm pode ser atribuída à região de primeiros sobretons das ligações C-H, N-H e O-H características das moléculas de açúcares que compõem o amido e a fibra bruta, ácidos graxos e proteínas presentes no grão de milho (Osborne; Douglas, 1981).

A partir dos pré-processamentos aplicados aos espectros originais, a combinação de SNV, primeira derivada por Savitzky-Golay (polinômio de 2ª ordem e janela de 11 pontos à direita e à esquerda) e dados centrados na média foi o pré-processamento mais eficiente para minimizar os efeitos de espalhamento e deslocamentos da linha de base.

A análise de PCA foi aplicada aos espectros pré-processados utilizando a variação normal padrão - SNV e primeira derivada Savitzky-Golay com

onze pontos à direita e onze pontos à esquerda. Os dados também foram centrados na média.

Na Figura 3 podemos observar que o gráfico de *scores* PC1 x PC2 (*scores plot*) obtido da análise de PCA explicou 94,13% da variância amostral, mas não apresentou uma separação clara entre as duas classes de sementes de milho, sendo necessário adicionar outro algoritmo para a realização da análise discriminante entre os dois tipos de sementes de milho.

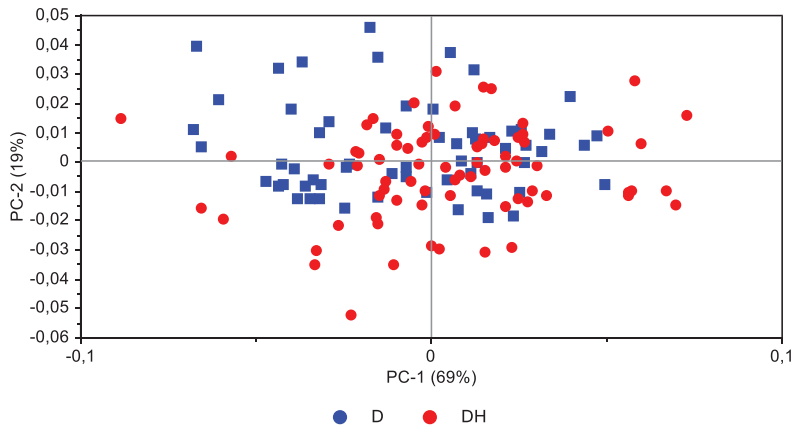


Figura 3. Gráfico de scores com 3 variáveis latentes para o conjunto de amostras de grãos de milho haploides (DH) e diploides (D).

Durante a construção do modelo PLS-DA foram utilizadas 13 variáveis latentes (VL), uma vez que 13 VL permitiu obter o menor valor de RMSECV (0,30) e a maior variância acumulada (95,02%). Na otimização dos modelos tentou-se ainda a seleção de variáveis pela inspeção dos coeficientes de regressão (teste de incerteza), contudo, o método não resultou em melhora nos resultados e, portanto, foi utilizada toda a região espectral. Figura 4.

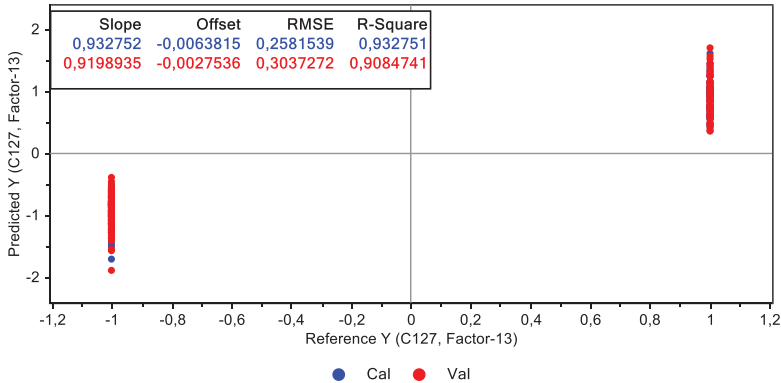


Figura 4. Modelo PLS-DA para a classificação de sementes de milho haploides de sementes diploides. Em azul estão apresentados os resultados para o conjunto de calibração; em vermelho, os resultados para a validação cruzada.

O modelo PLS-DA construído a partir de 13 VL foi capaz de classificar corretamente as sementes de milho do conjunto de teste conforme os resultados apresentados na Figura 5.

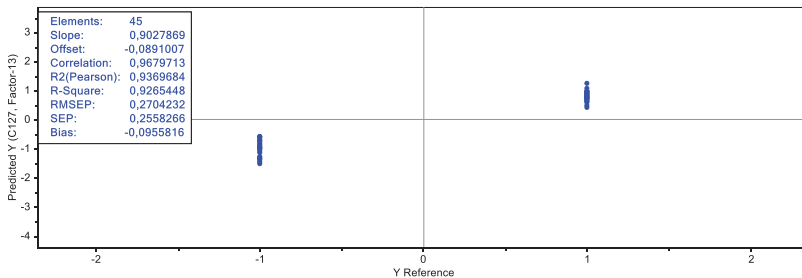


Figura 5. Estimativa do modelo PLS-DA para a classificação dos grãos de milho diploides (1) de haploides (-1).

O modelo PLS-DA obtido foi validado com um conjunto de amostras teste que não foram utilizadas na construção do modelo. Os principais parâmetros de avaliação do modelo e discriminação de cada semente para a fase de treinamento e teste estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros de classificação obtidos do modelo PLS-DA para classificação das sementes de milho haploides e diploides.

Parâmetros	Conjunto de treinamento	Conjunto de teste
Número de amostras	92	45
Variáveis latentes	13	13
Amostras anômalas	2	0
Taxa de Falso Positivo e Negativo	0	0
Taxa de Verdadeiro Positivo e Negativo	100	100
Sensibilidade	100	100
Especificidade	100	100
Eficiência	100	100

Podemos observar na Tabela 1 que todas as amostras foram classificadas corretamente e não ocorreram amostras classificadas como falso positivo ou falso negativo. Dessa forma, a análise dos parâmetros contidos na Tabela 1 como sensibilidade especificidade e eficiência resultou em valores iguais a 100% tanto para o conjunto de treinamento, quanto para o conjunto de teste, indicando que houve uma excelente classificação das sementes de milho haploides.

Pela análise dos *loadings* (Figura 6) podemos observar que as regiões que tiveram maior influência para a discriminação das sementes foram em PC1: 1.050, 1.150 e 1.420 nm, PC2: 1.150, 1.250 e 1.348 nm.

Nessa região espectral podemos observar os primeiros e segundos sobretons de estiramento de C-H, O-H e N-H. Particularmente, as bandas

centradas em 1.150 e 1.250 estão associadas ao sobretons de estiramento O-H de açúcares e ácidos graxos presentes nas sementes de milho e apresentam coeficientes de regressão mais positivos, diretamente relacionados com as amostras de sementes diploides. Enquanto os *loadings* mais negativos (1.150 e 1.430 nm) estão associados respectivamente aos sobretons de O-H presentes em açúcares e ácidos graxos e N-H de proteínas das amostras de sementes haploides.

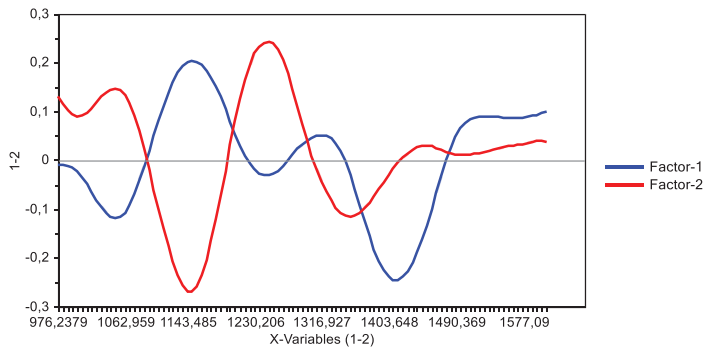


Figura 6. *Loadings* (PC1 e PC2) para o modelo obtido PLS-DA.

Comparando-se a taxa de eficiência obtida em outros trabalhos utilizando métodos não lineares, como os descritos por Hong et al. (2016), Li et al. (2018), Yu et al. (2018), que obtiveram respectivamente, 93,2; 90,0 e 97,3 % de reconhecimento das sementes haploides, o algoritmo PLS-DA é mais simples de executar computacionalmente e possibilitou obter como resultado uma taxa de eficiência de classificação das sementes haploides de 100%.

Conclusões

Os resultados apresentados demonstraram que foi possível utilizar um equipamento NIR portátil para construir um modelo multivariado de classificação que possibilitou a discriminação entre as sementes de milho haploides e diploides.

O modelo de classificação PLS-DA obtido permitiu a classificação correta das sementes de milho haploides e diploides, com taxa de eficiência de

100%, o que comprova a possibilidade do uso dessa técnica instrumental na separação das sementes haploides.

Em comparação ao método visual, que é muito laborioso, o uso da espectroscopia no infravermelho próximo associado à Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) permitiu a obtenção de um método rápido, simples, não destrutivo e confiável para a classificação entre as sementes de milho haploides e diploides.

Agradecimentos

Os autores agradecem à pesquisadora Casiane Tibola - Embrapa Trigo, pelo empréstimo do equipamento MicroNIR, e ao Instituto Nacional de Ciências e Tecnologias Analíticas Avançadas – INCTAA, pelo apoio no tratamento dos dados. Ao CNPq e à Fapemig, pelo apoio financeiro na implantação dos experimentos de campo.

Referências

ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA [DE] GRÃOS: safra 2018/19: décimo segundo levantamento. Brasília, DF: Conab, v. 6, n. 12, set. 2019. 121 p.

BARKER, M.; RAYENS, W. Partial least squares for discrimination. **Journal of Chemometrics**, v. 17, n. 3, p. 166-173, 2003.

BERARDO, N.; MAZZINELLI, G.; VALOTI, P.; PAOLO, L.; REDAELLI, R. Characterization of maize germplasm for the chemical composition of the grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 6, p. 2378-2384, 2009.

BOTELHO, B. G.; REIS, N.; OLIVEIRA, L. S.; SENA, M. M. Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA. **Food Chemistry**, v. 181, p. 31-37, 2015.

BITICA, A. R.; GIURA, A. General aspects regarding the recognition of maize Haploid kernels according to the size and intensity of anthocyanin coloration. **Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies**, v. 19, p. 25-25, 2015.

CHASE, S. S.; NANDA, D. K. Comparison of variability in inbred lines and monoploid-derived lines of maize (*Zea mays* L.). **Crop Science**, v. 5, p. 275-276, 1965.

CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A.; CORREA, L. A.; FERREIRA, F. T. F.; OLIVEIRA, M. R. **Cultivares e sementes**. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/AG01_28_168200511158.html>.

Acesso em: 25 set. 2019.

CUI, Y.; GE, W.; LI, J.; ZHANG, J.; AN, D. Screening of maize haploid kernels based on near infrared spectroscopy quantitative analysis. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 158, p. 358-368, 2019.

GUIMARÃES, L. J. M.; TRINDADE, R. S.; PARENTONI, S. N.; GUIMARÃES, P. E. O. Desenvolvimento de linhagens. In: DELIMA, R. O.; BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de milho**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2018. p. 102-129.

KENNARD, R. W.; STONE, L. A. Computer aided design of experiments. **Technometrics**, v. 11, n. 1, p. 137-148, 1969.

HONG, Q.; JING-YI, M. A.; SHAO-JIANG, C.; YAN-LU, Y.; WEI-JUN, L.; PING, W.; JIN, L. Identification of haploid maize kernel using NIR spectroscopy in reflectance and transmittance modes: A comparative study. **Spectroscopy and Spectral Analysis**, v. 36, n. 1, 292-297, 2016.

LI, J.; YU, X.; GE, W.; AN, D. Qualitative analysis of maize haploid kernels based on calibration transfer by near-infrared spectroscopy. **Analytical Letters**, v. 52, p. 249-267, 2018.

OSBORNE, B. G.; DOUGLAS, S. Measurement of the degree of starch damage in flour by near infrared reflectance analysis. **Journal of the Science of Food and the Agriculture**, v. 32, n. 4, p. 328-332, 1981.

PASQUINI, C. Near infrared spectroscopy: a mature analytical technique with new perspectives: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1026, p. 8-36, 2018.

PIERRE, P. M. O.; DAVIDE, L. M. C.; COUTO, E. G. O.; SILVA, T. N.; RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. Duplo-haploides: estratégias para obtenção e importância no melhoramento genético do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 10, n. 11, p. 1-16, 2011.

PRASANNA, B. M.; CHAIKAM, V.; MAHUKU, G. (Ed.). **Doubled haploid technology in maize breeding: theory and practice**. Mexico, DF: CIMMYT, 2012. 50 p.

PRIGGE, V.; MELCHINGER, A. E. Production of haploids and doubled haploids in maize. In: LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. (Ed.). **Plant cell culture protocols**. 3rd ed. New York: Springer-Verlag, 2011.

SIMEONE, M. L. F.; PIMENTEL, M. A. G.; GONTIJO NETO, M. M.; PAES, M. C. D.; SILVA, D. D. da. Uso da espectroscopia no infravermelho próximo e calibração multivariada para avaliar a composição química do milho. In: TIBOLA, C. S.; MEDEIROS, E. P. de; SIMEONE, M. L. F.; OLIVEIRA, M. A. de (Ed.). **Espectroscopia no infravermelho próximo para avaliar indicadores de qualidade tecnológica e contaminantes em grãos**. Brasília, DF: Embrapa, 2018. p. 51-62.

TRINDADE, R. dos S.; GUIMARÃES, L. J. M.; NETTO, D. A. M.; SOUZA, I. R. P. de; GUIMARÃES, P. E. de O.; SILVA, A. C. A. da; GUIMARÃES, S. A.; MARIZ, B. L. **Características agronômicas de indutores de haploidia adaptados ao ambiente tropical**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2017. 36 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 161).

WAKHOLI, C.; KANDPAL, L. M.; LEE, H.; BAE, H.; PARK, E.; KIM, M.; MO, C.; LEE, W.; CHO, B. Rapid assessment of corn seed viability using short wave infrared line-scan hyperspectral imaging and chemometrics. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 255, p. 498-507, 2018.

WILLIAMS, P. C.; SOBERING, D.; DAVES, A. M. C. How do we do it: a brief summary of the methods we use in developing near infrared calibrations. In: WILLIAMS, P. C. (Ed.). **Near infrared spectroscopy: the future waves**. Chichester: NIR Publications, 1996. p. 185-188.

YU, L.; LIU, W.; LI, W.; QIN, H.; XU, J.; ZUO, M. Non-destructive identification of maize haploid seeds using nonlinear analysis method based on their near-infrared spectra. **Biosystems Engineering**, v. 172, p. 144-153, 2018.

Embrapa

Milho e Sorgo



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

